

## 論 文 要 旨

区 分	㊦・乙	氏名	江頭 敬	㊦
-----	-----	----	------	---

AMPK の活性化はオートファジーを介してチタンディスク上の骨芽細胞分化を促進する  
(AMPK activation enhances osteoblast differentiation on a titanium disc via autophagy)

## 研究目的

インプラント治療の成功には、オッセオインテグレーションの獲得が不可欠である。チタン製インプラントにおいて、周辺に存在する骨関連細胞の初期接着と新規の骨形成にはインテグリンの関与が報告されている。その内、チタンと骨芽細胞との接着は、チタンに吸着したタンパク質を介して細胞膜上のインテグリンに結合する。そこで、私は、はじめに、チタンディスク (Ti) と組織培養ポリスチレンディッシュ (TCPD) 上で培養した骨芽細胞では増殖や分化能が異なるのではないかと考えた。

糖尿病患者では、インプラント治療中のオッセオインテグレーションの獲得が健常者に比べて遅く、不良である。II型糖尿病患者の血清中アディポネクチン濃度は、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の抑制を介して健常者よりも低い。したがって、AMPK の活性化はインプラント周囲の骨形成を促進し、その結果、オッセオインテグレーションの獲得が改善されるという仮説を立てた。本研究の目的は、AMPK 活性化が骨芽細胞分化に及ぼす影響、その下流シグナル伝達のメカニズムを Ti 上で評価することである。さらに、糖尿病患者においても、より確実に早期のオッセオインテグレーションの獲得を目指す目的で、Ti 上での骨芽細胞の増殖や分化に対する AMPK 活性化薬の効果について調べた。

## 材料および方法

マウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/well) を骨芽細胞分化のために BMP-2 存在下 [一部骨芽細胞分化誘導培地 (OIM)] で培養した。また、AMPK 活性化剤である AICAR の存在下または非存在下で BMP-2 とともに培養した。CCK8 アッセイ、ルシフェラーゼアッセイ、定量的 RT-PCR 法、およびウェスタンブロッティング分析を用いて、骨芽細胞増殖や分化、インテグリン発現を TCPD と Ti で比較、評価した。さらに、骨芽細胞分化に対する AMPK 活性化の影響とその下流のシグナルメカニズムを Ti 上で評価した。

## 結 果

骨芽細胞の増殖率は、Ti と TCPD の間で差はなかったが、Ti 上の骨芽細胞は TCPD 上の細胞よりも転写活性が増加し、骨分化が促進されたことを発見した。これは、インテグリンの発現の違いが関与している可能性が高いと考えられた。

AMPK 活性化剤である AICAR の添加により、Ti 上での骨芽細胞の増殖がわずかに促進された。AICAR は Ti 上での BMP-2 依存的な転写活性を増強し、骨形成関連分子の発現を上昇させた。AICAR は同時に Ti 上のオートファジー関連分子、特に LC3-II の発現を上昇させた。アディポネクチン受容体 type1/type2 活性化因子である AdipoRon は AMPK を活性化し、Ti 上の骨形成関連分子の発現を上昇させた。

## 考 察

Ti 上の細胞は、TCPD 上の細胞よりも転写活性の増加、骨形成関連遺伝子とタンパク質、オートファジー関連遺伝子とそのタンパク質とインテグリンの発現が増加した。インテグリンは特異的に発現しており、下流シグナルがオートファジーや骨分化に影響を及ぼしている可能性があることが示唆された。さらに、AMPK の活性化は、オートファジーを介して Ti 上での骨芽細胞分化を促進し、インプラント治療中のオッセオインテグレーションの獲得を促進することが示唆された。

## 結 論

これらの結果は、糖尿病患者であっても、インプラント埋入後、末梢歯槽骨において骨芽細胞の分化と石灰化が促進され、早期に良好なオッセオインテグレーションとインプラントの安定性が得られることを示唆している。

