

博士論文

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)

江頭 敬

略語一覧

Ti	チタンディスク
TCPD	組織培養ポリスチレンディッシュ
AMPK	AMP 活性化プロテインキナーゼ
BMP-2	Bone morphogenetic protein-2
OIM	骨芽細胞分化誘導培地
AICAR	Acadesine
BIC	骨-インプラント接触
Sa	三次元算術平均高さ
3-MA	3-methyladnine
APN	AdipoRon
CCK8	Cell Counting Kit-8 assay
cDNA	相補的 DNA
mRNA	メッセンジャーRNA
Runx2	Runt-related transcription factor 2
Osx	Osterix/Sp7
Becn1	Beclin-1
Prkn	Parkin
LC3	MapLC3a
Ulk1	ULK1
Itg β 3	Integrin β 3
Itg β 1	Integrin β 1
Itg α 2	Integrin α 2
Itg α V	Integrin α V
Ocn	Osteocalcin
WB	ウェスタンブロット

目次

要 旨	P4-5
緒 言	P6-8
材料と方法	P9-16
結 果	P17-32
考 察	P33-37
結 語	P38
参考文献	P39-44
謝 辞	P45

要旨

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、私をはじめに、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) 上で培養した前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人に比べて遅く、不良である。2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 活性化によるオートファジーが前骨芽細胞の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 上での前骨芽細胞の増殖や分化に対する AMPK 活性化剤の効果について調べた。

マウス前骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞を骨芽細胞分化のために Bone morphogenetic protein-2 (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 Acanthoside (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ト解析を用いて、前骨芽細胞の増殖や骨芽細胞分化、インテグリンの発現を 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メカニズムを Ti 上で評価した。

前骨芽細胞の増殖率は、Ti と TCPD の間で差はなかったが、Ti 上の前骨芽細胞は TCPD 上の細胞よりも転写活性が増加し、骨芽細胞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。

AICAR の添加により、Ti 上での前骨芽細胞の増殖が促進された。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増加させた。AICAR は同時に Ti 上のオートファジー関連分子、特に LC3-II の発現を増加させた。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 上の骨芽細胞形成関連分子の発現を増加させた。

Ti 上の細胞は、TCPD 上の細胞よりも転写活性の増加、骨芽細胞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遺伝子発現が増加した。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芽細胞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、アディポネクチン受容体の活性化とその下流の AMPK の活性化は、オートファジーを介して Ti 上での前骨芽細胞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。

緒言

インプラント治療の成功に必要なオッセオインテグレーションは、インプラント表面が骨と接触している状態である。チタン製インプラントにおいて、骨芽細胞の接着とその分化にはインテグリンの関与が報告されている。インテグリンは18種類の α サブユニットと8種類の β サブユニットの二量体からなる。前骨芽細胞のインテグリンが、インプラント表面に付着した接着性タンパク質を認識し結合することにより骨芽細胞の分化が起こる [1]。まず、私は前骨芽細胞のチタンディスク (Ti) 上と組織培養ポリスチレンディッシュ (TCPD) 上の骨芽細胞分化に何か違いあるのではないかと考えて評価を試みた。

AMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK) は、細胞のエネルギー状態のセンサーとして保存されていることが報告されている [2]。AMPKは代謝ストレスによって活性化され、異化経路を活性化する一方、生合成経路を不活性化させ細胞内のエネルギー平衡を維持することが以前に報告されている [3]。

AMPKの活性化は、細胞の生存能とミトコンドリアの生合成および分裂を促進し、抗酸化酵素の発現を促進する [4]。骨芽細胞分化誘導培地 (OIM) を用いて、TCPD上の前骨芽細胞において、AMPKが前骨芽細胞の骨芽細胞分化と石灰化を促進するという報告もある [5, 6]。さらに、AMPK活性化剤であるAcadesine (AICAR) は、TCPD上の間葉系幹細胞/間葉系細胞を含む骨芽細胞系譜において、オートファジーのシグナル伝達経路を刺激した [7, 8]。我々は近年、AICARはTi上の前骨芽細胞が石灰化を促進することを報告した [9]。

しかし、多くの報告は、OIMを用いてTCPD上で培養した前骨芽細胞から得られたものであり、Ti上の培養についてはほとんど検討されていない。また、

Ti上で培養した前骨芽細胞の分化をオートファジーが介在したメカニズムを検証した報告はない。

アディポネクチンは脂肪細胞由来のアディポカインの一種であり、AMPKの活性化を介して組織レベルでエネルギー代謝のバランスを制御する重要な役割を果たしている [10, 11]。2型糖尿病患者では血清中のアディポネクチン濃度が有意に低下しており、糖尿病による骨量減少を引き起こしているという報告がある [12]。そのため、アディポネクチンの下流シグナル伝達分子であるAMPKは、特に2型糖尿病患者において、骨-インプラント接触（BIC）やオッセオインテグレーションを促進する治療標的となる可能性が報告されている [13]。

本研究では、AMPKの活性化によりオートファジーを促進することで、インプラント周囲骨における前骨芽細胞の分化が促進され、糖尿病患者であっても、より早く、より強固な骨とBICおよびオッセオインテグレーションの促進につながるという仮説を立てた（図1）。そこで、続いて私は、AMPK活性化が骨芽細胞分化関連分子の発現に及ぼす影響について検討した。

本研究の目的は、1) TiとTCPD上との培養において前骨芽細胞の増殖や骨芽細胞分化に違いがあるか、2) AMPK活性化促進によりTi上の前骨芽細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響とその下流シグナル伝達のメカニズムを評価することである。

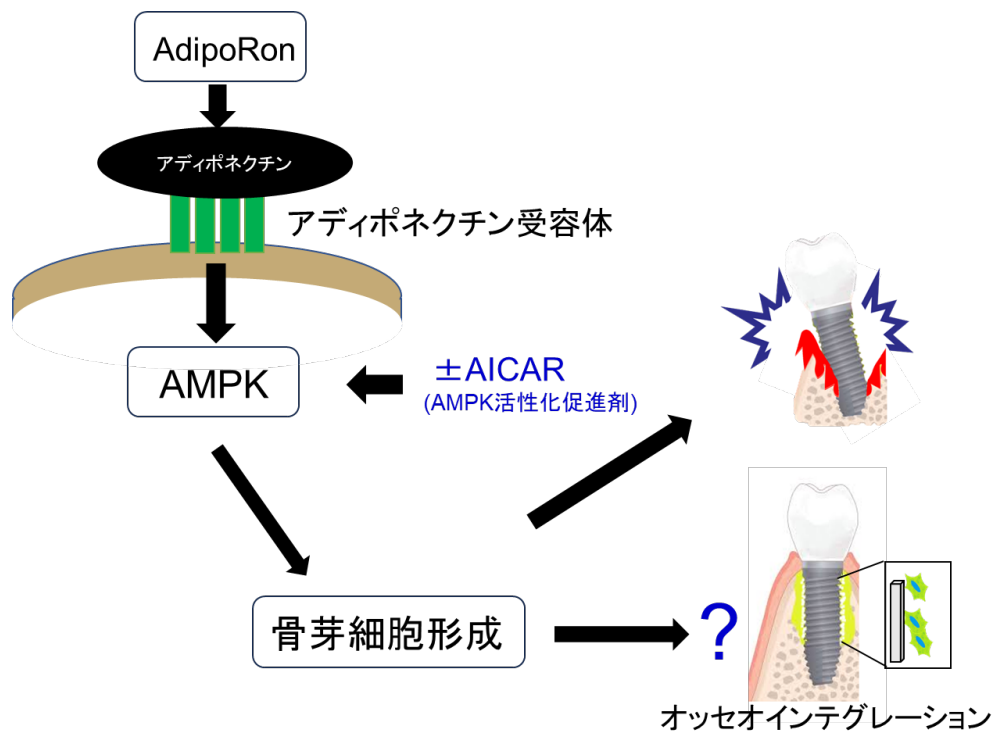


図1 AMPKがTi周囲の前骨芽細胞の骨芽細胞分化を促進しオッセオインテグレーションを促進するという仮説の模式図

材料と方法

1. Ti の処理

Ti (縦 10.0 mm×横 10.0 mm×厚さ 1.0 mm; NANTOH Co., Ltd., Shizuoka, Japan) および ϕ 55 mm×厚さ 1.0 mm ディスク (TIG Co., Ltd, Osaka, Japan) は, JIS4 規格であり, 三次元算術平均高さ (Sa) は, $0.176.6\pm 0.054 \mu\text{m}$ であった. これは, 市販インプラントにおいて機械研磨に相当するものであった.

2. Ti の表面形状

Ti の表面粗さは, レーザー顕微鏡 (MD-F3000, Keyence, Osaka, Japan) を用いて, 表面の Sa をパラメータとして評価した (図 2A, B). Ti 上で MC3T3-E1 細胞を 24 時間培養し, 細胞が Ti 上で接着していることを確認した (図 2C). 細胞は 10 %ホルマリンで固定し, エタノールで脱水し, 臨界点乾燥機を用いて液化二酸化炭素で乾燥させた. サンプルを金で 2 分間スパッタリングし, 走査型電子顕微鏡 (JSM-6330F, JEOL Co., Ltd, Tokyo, Japan) で観察した.

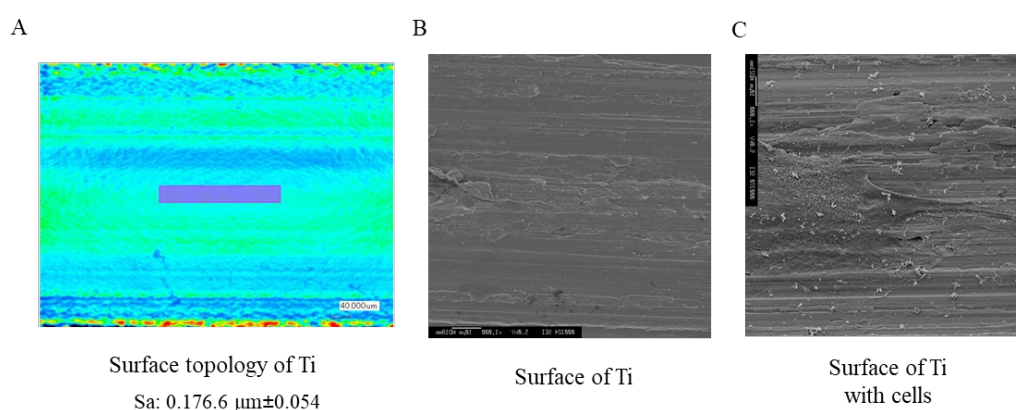


図 2 チタン表面の形状.

A : レーザー顕微鏡によるチタンの表面形状

B : 走査型電子顕微鏡を用いた Ti 表面

C : MC3T3-E1 細胞播種後, 24 時間培養後の表面形状

3. 細胞培養

マウス前骨芽細胞 (MC3T3-E1; Subclone14) は, American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) から入手した. この細胞は, 10 %ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) およびペニシリン-ストレプトマイシン (Fujifilm Wako, Tokyo, Japan) を添加した最小必須培地- α (MEM- α ; Fujifilm Wako, Tokyo, Japan) で, 細胞が 70 %のサブコンフルエントに達するまで Ti 上と TCPD 上で培養した. サブコンフルエントに達した後, 細胞 (1.0×10^5 cells/mL) を Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2; Pepro Tech. Inc., NJ, USA., 25–50 ng/mL) または OIM (including glycerophosphate and ascorbic acid) と 72 時間作用させた. 並行して, 細胞は BMP-2 と Acadesine (AICAR; Cayman Chemical, Michigan, USA., 500 μ M) を加えて培養した. また, オートファジーを介した AICAR の骨芽細胞分化への影響を明らかにするために, PI3 Kinase 阻害剤である 3-Methyladnine (3-MA; Fujifilm Wako, Tokyo, Japan., 5 mM) を細胞に 72 時間作用させた. さらに, アディポネクチン Type1/Type2 受容体を介して骨芽細胞分化を促進するかどうかを調べるために, AdipoRon (APN; Enzo Life Sciences, NY, USA., 50 μ M) を細胞に 72 時間作用させた (図 3, 4) .

4. CCK-8 アッセイ

細胞増殖は, Cell Counting Kit-8 assay (CCK-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて測定した. 細胞を 500 μ L の MEM- α 中に 1.0×10^4 cells/mL で 24 ウェルプレート上に Ti と TCPD 上に播種した. 各培養後, CCK-8 試薬 (10 μ L) を各ウェルに添加し, 37 °C で 1 時間培養した. 各ウェルから条件培養液 (100 μ L) を回収した後, マイクロプレートリーダー (Mode 680; Bio-Rad) を用いて 450 nm の吸光度を測定した. CCK-8 試薬を加え無細胞の培養液をブランクコン

トロールとして用いた.

5. カルセイン染色

MC3T3-E1 細胞 (10×10^4 cells/mL) を 24 ウェルプレート (500 μ L/well) に設置した Ti と TCPD 上で培養した. 7 日間培養後, Ti 上の細胞をカルセイン-AM 溶液 (1 μ L/mL, DOJINDO) で染色した. Ti 上の細胞数を蛍光顕微鏡で観察した.

6. 転写活性アッセイ

プロモーターアッセイでは, Id プロモーターを pGL4 塩基性ルシフェラーゼプラスミド (Promega; Madison, WI, USA) にクローニングし, Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher, CA, USA) を用いて MC3T3-E1 細胞に導入した. ルシフェラーゼ活性は, ルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega) を用いて測定した. pCMV- β -ガラクトシダーゼレポータープラスミド (Promega) も同時に導入し, β -ガラクトシダーゼ活性を同時に測定することで導入効率を標準正規化した.

7. RNA 単離と定量性 RT-qPCR 法

TRIzol 試薬を用いて細胞から全 RNA を抽出した。ReverTra Ace 逆転写酵素 (TOYOBO CO., LTD, Osaka, Japan) を用いて, 3 μ g の全 RNA から, プロトコルに従って相補的 DNA (cDNA) を合成した。相対的なメッセンジャー RNA (mRNA) 発現を検出するために, 得られた cDNA の塩基配列に基づいて特異的プライマーを選択した (表 1, 2)。mRNA 発現は, SYBR Green 法を用いて β -actin に対する mRNA の発現レベルとの比を $\Delta\Delta$ Ct 法で解析した。

Genes	Forward and reverse primers (5'-3')	Position	Product size (bp)	Acc No
Runx2	5'-aagtgcggtgcaaactttct	41-60	175	NM_009820.6
	5'- acgcatagtcctcctctttt	215-196		
Osx	5'- agaggttcaactcgtctgagga	1088-1106	115	NM_130458.4
	5'- ttgctcaagtggctgcttctg	1202-1182		
Ocn	5'- tgacaaagccttcatgtcca	141-160	175	NM_007541.3
	5'- tttgtaggcggtcttcaagc	315-296		
Becn-1	5'- ggacgtggagaaaggcaaga	1339-1358	89	NM_019584.4
	5'- tccactgctcctccgagta	1427-1408		
Bnip3	5'- cgcacagctactctcagcat	507-526	119	NM_009760.4
	5'- ccaatggccagcagatgaga	625-606		
Prkn	5'- cctgcaaacaagcaaccctc	610-629	82	NM_016694.5
	5'- tcaccactcatccggtttgg	691-672		
MapLc3a	5'- taatctgagcaatgcgattgtgg	642-664	129	NM_175121.4
	5'- agatggacggagtatagcgaana	770-748		
Ulk1	5'- aagttcgagttctctcgaag	394-414	190	NM_009469.3
	5'- cgatgtttctgcttttagttcc	583-561		
β -actin	5'- taccaggcattgctgacag	1025-1044	115	NM_007393.5
	5'- agccaccaatccacacagag	1139-1120		

bp, base pairs; Acc No, accession number

表 1 実験に使用したプライマー

Genes	Forward and reverse primers (5'-3')	Position	Product size (bp)	Acc No
Itgβ3	5'- GCTCATTGGCCTTGCTACTC	2279-2298	92	NM_016780.2
	5'- TGGCTCGTTCTTCCTCAAAT	2370-2351		
Itgβ1	5'- GCGTGGTTGCTGGAATTGTT	2510-2529	140	NM_010578.2
	5'- AGGATTTTCACCCGTGTCCC	2649-2630		
Itgα2	5'- GCTGCCAGCCATTCAAACCTC	2573-2592	126	NM_008396.3
	5'- TCAGAAAACCTCGGCCAGGAC	2698-2679		
IthαV	5'- AGCCAGTTGGAACCTGCTTT	738-757	96	NM_001398691.1
	5'- AAAATCCCTGGCCATCAGCA	833-814		

bp, base pairs; Acc No, accession number

表 2 実験に使用したプライマー

8. ウェスタンブロット解析

細胞を TNT 緩衝液 [0.1 M Tris-HCl (pH,7.5) , 0.15 M NaCl, 0.05 % Tween-20; Roche, Basel, Switzerland] で溶解した. タンパク質定量は, BCA アッセイキット (Thermo Fisher, CA, USA) を用いて測定した. その後, 各タンパク質 20 μ g を 12.5 % ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, 分離したタンパク質を 80 V, 4 °C で 1.5 時間, ポリフッ化ビニリデン膜に電気泳動し, 転写した. この膜を, Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Osterix/Sp7 (Osx; Abcam, Cambridge, UK), p-Smad1/5/9, Smad1, Smad5, P-AMPK, AMPK, Beclin-1, LC3B, p-ULK1, ULK-1, (Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan), および β -actin (Sigma-Aldrich Co) 5 % BSA, Tween-20 含有 トリス緩衝生理食塩水 (TBST; 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.25 % Tween-20) で希釈 (1:1000) したものを 4 °C で一晩使用した. メンブレンを TBST で洗浄し, 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギまたは抗マウス IgG 抗体を 2 次抗体として 1 時間インキュベートした. 抗体は 5 % 脱脂乳で希釈 (1:2000) し, enhanced chemiluminescent system (GE Healthcare, Tokyo, Japan) を用いて検出した.

9. 統計分析

データは平均値 \pm 標準誤差で表した. 有意差は一元配置分散分析およびシェッフェの多重比較検定によって分析した. P 値 $<$ 0.05 を有意とした.

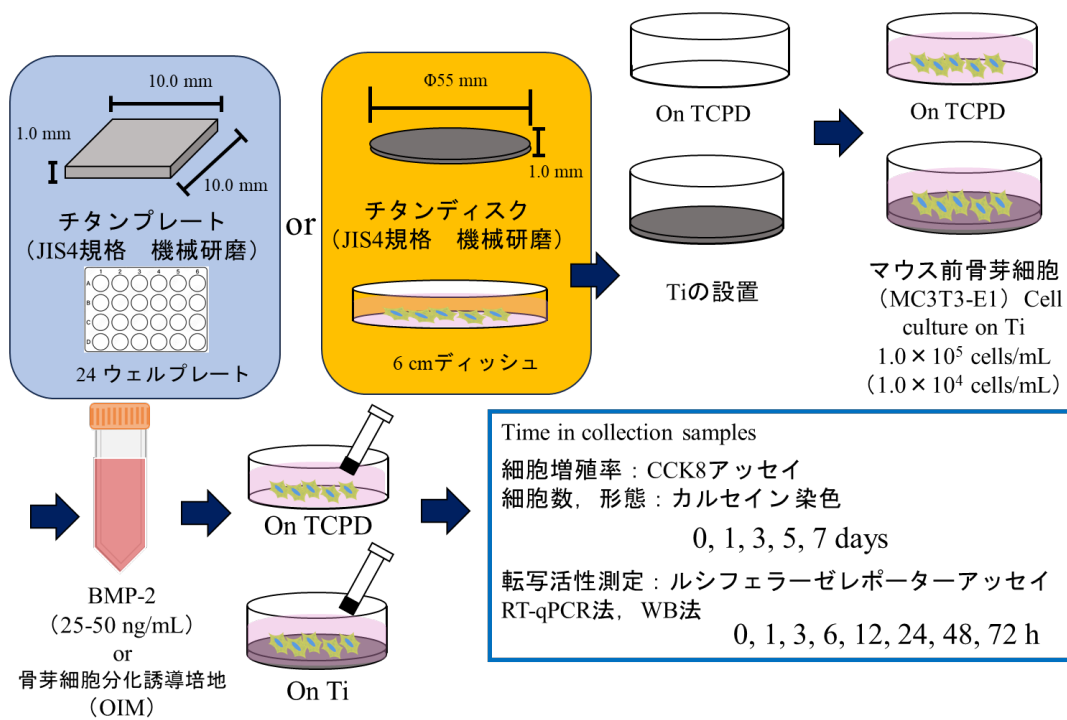


図3 実験1 Ti上とTCPD上の細胞実験の概略図

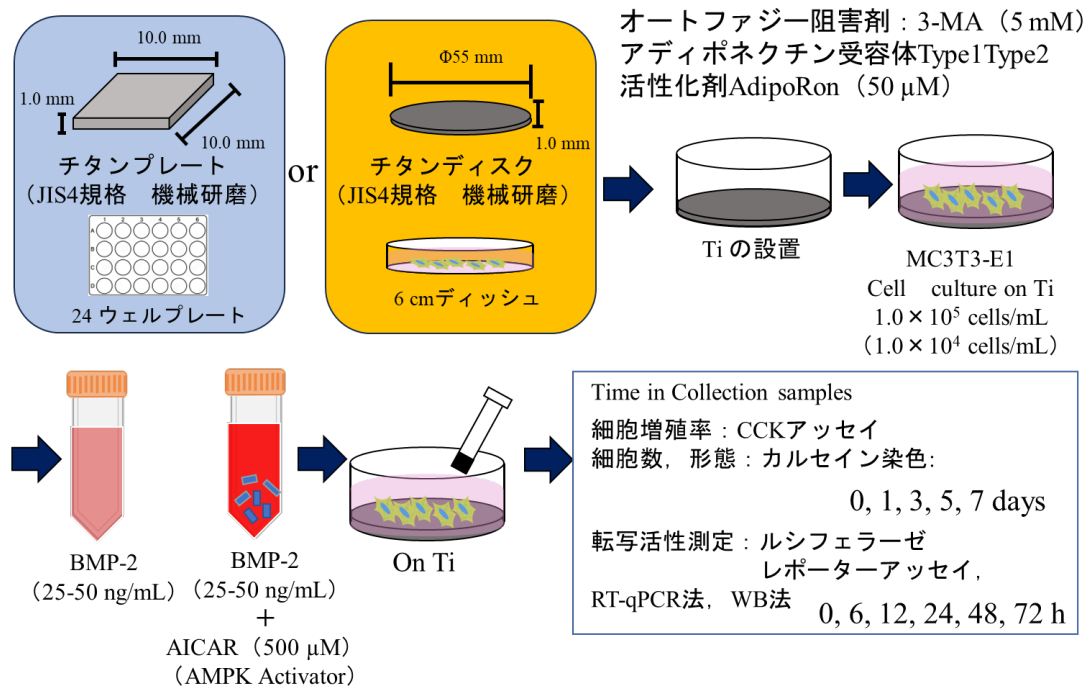


図4 実験2 Ti上のMC3T3-E1細胞でAICAR存在下, 非存在下での実験の概略図

結果 1 : TCPD と Ti の比較

1-1. Ti 上と TCPD 上の MC3T3-E1 細胞の増殖率に有意な差はなかった

Ti 上と TCPD 上の MC3T3-E1 細胞の接着と生存能を明らかにするために、カルセイン染色と CCK-8 アッセイを用いて、両者の細胞形態と増殖を調べた。カルセイン染色では、強拡大図において、機械研磨の Ti 表面には、MC3T3-E1 細胞の形態が変化していることが観察された。Ti 上の MC3T3-E1 細胞は細胞突起を溝に伸展していることを確認した (図 5A)。

BMP-2 (50 ng/mL) は、時間依存的に両者の細胞の増殖を促進した。Ti 上の増殖細胞数は、BMP-2 処理後 5 日目にわずかに TCPD よりも減少し、7 日目では TCPD 上の細胞と比較して、有意な差はなかった。Ti 上でも TCPD 上でも、増殖に対する影響はわずかであった (図 5B)。

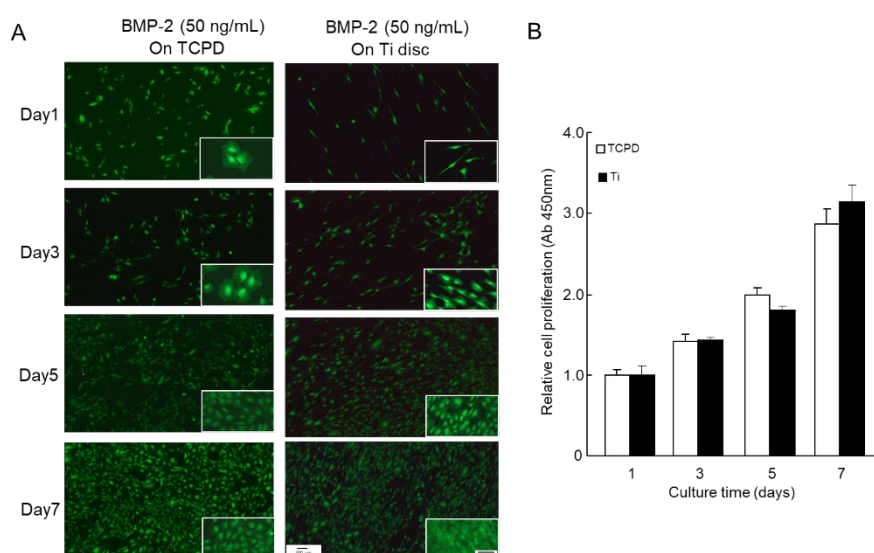


図 5 A : Ti 上と TCPD 上の MC3T3-E1 細胞の、BMP-2 (50 ng/mL) 刺激下における Calcein-AM による染色像。

B : BMP-2 (50 ng/mL) で処理した細胞を Ti 上で BMP-2 (50 ng/mL) 存在下で培養し、CCK-8 アッセイを用いて細胞増殖率を測定した。

棒グラフは 5 つの培養ウェルの平均 (平均±標準誤差) を示す。

1-2. Ti 上の MC3T3-E1 細胞は TCPD 上の細胞よりも転写活性が増加し、骨関連遺伝子の発現が増加した

Ti 上と TCPD 上の MC3T3-E1 細胞において、分化の影響を調べるために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて調べた。

Ti 上の前骨芽細胞は、BMP-2 の下流シグナル遺伝子である Id の転写活性を一過性に大きく増加させた (図 6A)。6 時間をピークに増加し、12 時間、24 時間においても発現が増加した。Ti 上の MC3T3-E1 細胞が TCPD 上の MC3T3-E1 細胞よりも転写活性因子が増加したため、骨芽細胞分化関連遺伝子の発現を解析した。BMP-2 は、MC3T3-E1 細胞において、BMP-2 の下流シグナル遺伝子である Runx2, Osx, Osteocalcin (Ocn) の転写活性を一過性に大きく増加させた (図 6B-D)。Runx2 の 12 時間、48 時間、72 時間、Osx では 12 時間、72 時間、Ocn では 48 時間、72 時間で TCPD 上よりも Ti 上で発現が増加した。

ウェスタンブロット (WB) 解析においては、Runx2 では Ti 上の発現が増加して、Osterix では 48 時間、72 時間において発現が増加した。Smad5 においても時間依存性に増加した。Ti 上では骨芽細胞分化遺伝子、タンパク質の発現が増加した (図 6E)。

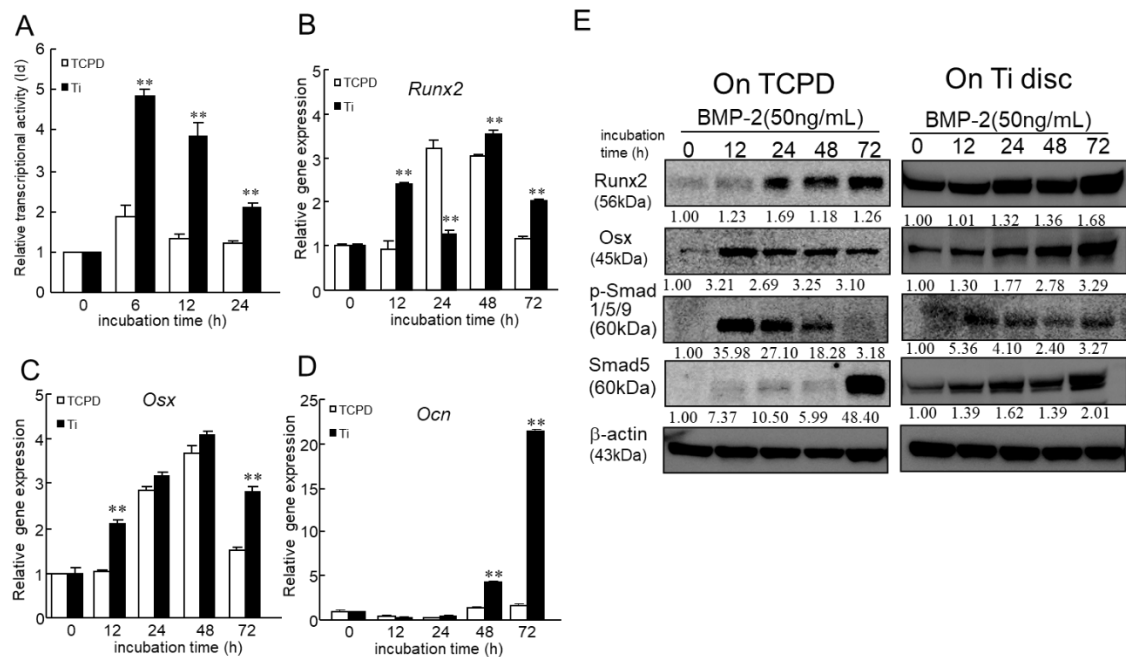


図6 A : Id プロモーター部位をもつ pGL4 プラスミドを, Lipofectamine 3000 を用いて MC3T3-E1 細胞に導入した. この細胞を BMP-2 (50 ng/mL) 存在下で培養し, ルシフェラーゼ活性を Id 転写活性の指標として評価した. データは 4 つの培養ウェルからの平均値である (平均±標準誤差).

** は TCPD に対する $P < 0.01$ を示す.

B-D : MC3T3-E1 細胞を TCPD 上と Ti 上で BMP-2 と培養した. BMP-2 (50 ng/mL)

と培養後の MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化関連遺伝子 Runx2, Osx, Ocn の発現を示す. サンプルは定量性 RT-qPCR 法によって分析され, β -actin mRNA に対して正規化された. データは 6 つの培養ウェルからの平均値である (平均±標準誤差).

** は TCPD に対する $P < 0.01$ を示す.

E : 細胞を BMP-2 (50 ng/mL) で処理した. 標的抗体と β -actin 抗体を用いて

WB 解析を行った. 4 回の独立した実験で同様の結果が得られた.

1-3. Ti 上の MC3T3-E1 細胞はオートファジー関連遺伝子を増加させた

TCPD 上で、前骨芽細胞の骨芽細胞分化にはオートファジーを誘導するという報告があり、Ti 上の細胞でも実験を行った。定量性 RT-qPCR 法では Ti 上の細胞は TCPD よりも ULK1 (Ulk1), Beclin-1 (Becn1), BNIP3 (Bnip3), Map1LC3a (LC3) の発現を時間依存性に増加させた (図 7A-D)。WB 解析では Ti 上の細胞は P-AMPK を発現させた。P-ULK1 は特に Ti 上で有意に発現した。オートファジーの最終マーカーである LC3-II は TCPD 上より Ti 上でわずかに発現が増加した (図 7E)。

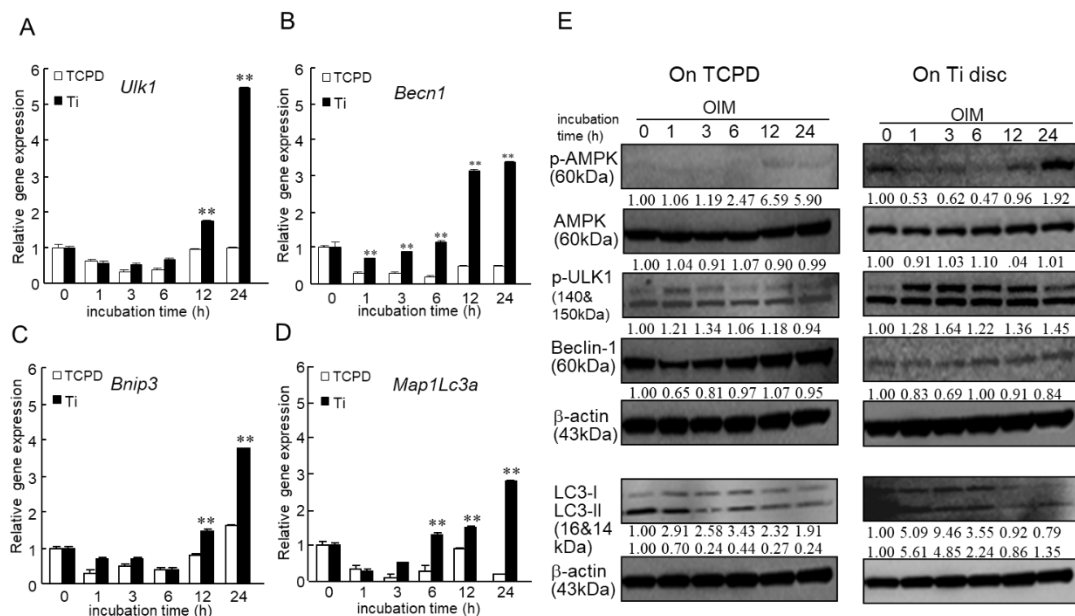


図 7 A-D : MC3T3-E1 細胞を TCPD 上と Ti 上で OIM と培養した。OIM と培養後の MC3T3-E1 細胞におけるオートファジー関連遺伝子 ULK1 (Ulk1), Beclin-1 (Becn1), BNIP3 (Bnip3), Map1LC3a (LC3) の発現を示す。サンプルは定量性 RT-qPCR 法によって解析し、 β -actin の mRNA に対して正規化した。データは 6 つの培養ウェルからの平均値である (平均 \pm 標準誤差)。** は、TCPD に対する $P < 0.01$ を示す。

E : TCPD 上と Ti 上で細胞を OIM で処理した。標的抗体と β -actin を用いて WB 解析を行った。同様の結果が 3 つの独立した実験で得られた。

1-4. Ti 上の MC3T3-E1 細胞は BMP2 刺激においてインテグリンの発現が 増加した

Ti における骨芽細胞分化は、インテグリンの関与が報告されているため、BMP-2 刺激下における Ti と TCPD 上の細胞のインテグリンの変化を調べるために、RT-PCR 法を用いて解析した。Integrin $\alpha 2$ の 12 時間、Integrin αV の 12 時間、24 時間、Integrin $\beta 1$ では 6 時間、12 時間、Integrin $\beta 3$ の全時間で TCPD よりも発現が増加した (図 8A-D)。

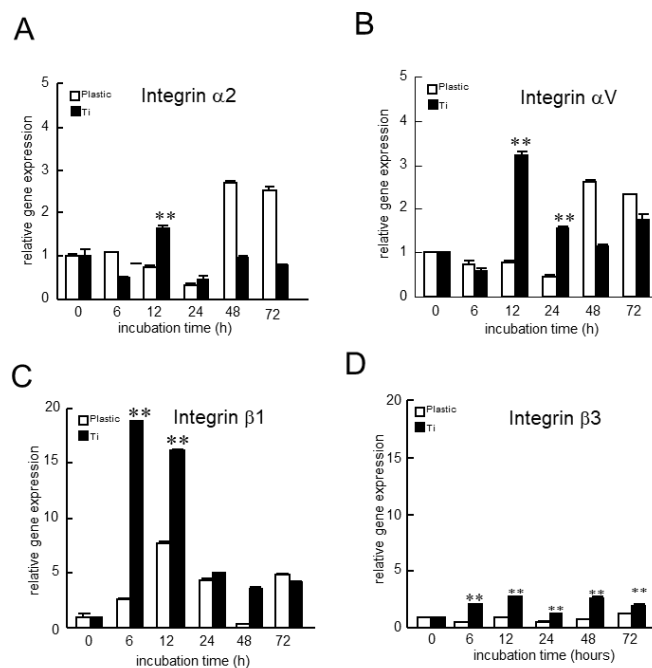


図 8 A-D : MC3T3-E1 細胞を TCPD 上と Ti 上で BMP-2 と培養した。

BMP-2 (25 ng/mL) と培養後の MC3T3-E1 細胞におけるインテグリン関連遺伝子 Integrin $\alpha 2$, Integrin αV , Integrin $\beta 1$, Integrin $\beta 3$ の発現を示す。

サンプルは定量性 RT-qPCR 法によって分析され、 β -actin の mRNA に対して正規化された。データは 6 つの培養ウェルからの平均値である (平均 \pm 標準誤差)。** は、TCPD に対する $P < 0.01$ を示す。

小括

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関連遺伝子の発現が増加した。チタン上には Integrin α V, Integrin β 1, Integrin β 3 が TCPD よりも発現していた。これらのインテグリンの発現は下流シグナルのオートファジーや骨芽細胞分化に影響を及ぼしていることが示唆された。

TCPD よりも Ti 上で，骨芽細胞分化やオートファジーが促進されたことから，AMPK 刺激下において，Ti 上の骨芽細胞分化のメカニズムを評価することとした。

結果 2 AMPK における Ti 上の骨芽細胞の影響

2-1. AICAR は Ti 上の骨芽細胞の増殖と分化を促進した

Ti 上での MC3T3-E1 細胞の接着と生存率を明らかにするために、まずカルセイン染色と CCK-8 アッセイを用いて Ti 上の細胞形態と増殖を調べた (図 9A). BMP-2 (50 ng/mL) は、時間依存的に Ti 上での細胞の増殖を促進した (図 9A, B). AICAR 存在下での増殖細胞数は、BMP-2 投与後 5 日間にわたって一定か、5 日目からわずかに減少し、その結果、AICAR の存在下でも非存在下でも、増殖に対する影響はわずかであった (図 9A). 一方、AMPK 活性化剤である AICAR (500 μ M) 存在下での BMP-2 (50 ng/mL) は、BMP-2 による増殖と比較して、Ti 上での細胞増殖を時間依存的にわずかに増加させた (図 9B).

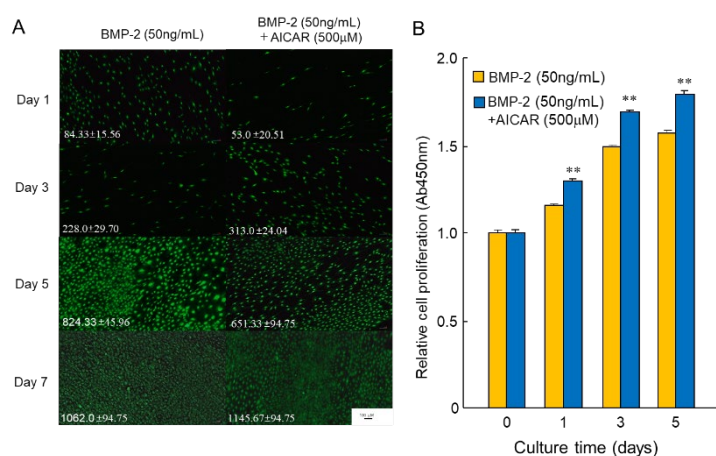


図 9 A : MC3T3-E1 細胞を AICAR (500 μ M) の存在下または非存在下で BMP-2 (50 ng/mL) で処理し、カルセイン-AM を用いて Ti 上で染色した。AICAR (500 μ M) で処理し、Ti 上でカルセイン-AM を用いて染色した。各写真の左下に挿入した数字は、3 枚の Ti 上の陽性細胞数の平均を示す (平均 \pm 標準誤差)。

B : BMP-2 (50 ng/mL) で処理した細胞を Ti 上で AICAR (500 μ M) の存在下、または非存在下で培養し、CCK-8 アッセイを用いて細胞増殖率を測定した。棒グラフは 5 つの培養ウェルの平均 (平均 \pm 標準誤差) を示す。**は BMP-2 単独投与に対する P < 0.01 を示す。

2-2. AICAR は Ti 上で BMP-2 依存性の転写活性を増強し、

骨芽細胞分化関連分子の発現を促進した

AICAR が Ti 上の MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化を制御しているかどうかを明らかにするために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて転写活性に対する AICAR の影響を調べた。BMP-2 は、Ti 上の MC3T3-E1 細胞において、BMP-2 の下流シグナル遺伝子である Id の転写活性を一過性に大きく増加させた (図 10A) 。 Id の転写活性の増加は、BMP-2 処理後 6 時間でピークに達し、24 時間で減少した。さらに、AICAR を添加すると、Ti 上の細胞では 12 時間にピークが観察され、転写活性が持続的に増加した。さらに、BMP-2 は骨芽細胞分化マーカーである Runx2, Osx, Ocn 遺伝子の発現も時間依存的に誘導した (図 10B, C, D) 。 さらに、AICAR の添加はこれらの遺伝子の発現を時間依存的に増加させた。AICAR の存在下または非存在下でのタンパク質の発現の増加は、WB 解析を用いて確認した (図 10E) 。 定量性 RT-PCR 法の結果と同様の結果が得られた。AICAR を 24 時間以上投与すると、MC3T3-E1 細胞の Runx2, Osx, p-AMPK の発現が、BMP-2 単独投与と比較して増加することが示された。同様の結果が、OIM 培地と OIM+AICAR 培地を用いたサンプルの WB 解析において確認した (未発表データ) 。 また、AICAR 単剤投与は、OIM 存在下での AICAR 投与と比較して、骨芽細胞分化関連分子の発現をわずかに増加した (未発表データ) 。

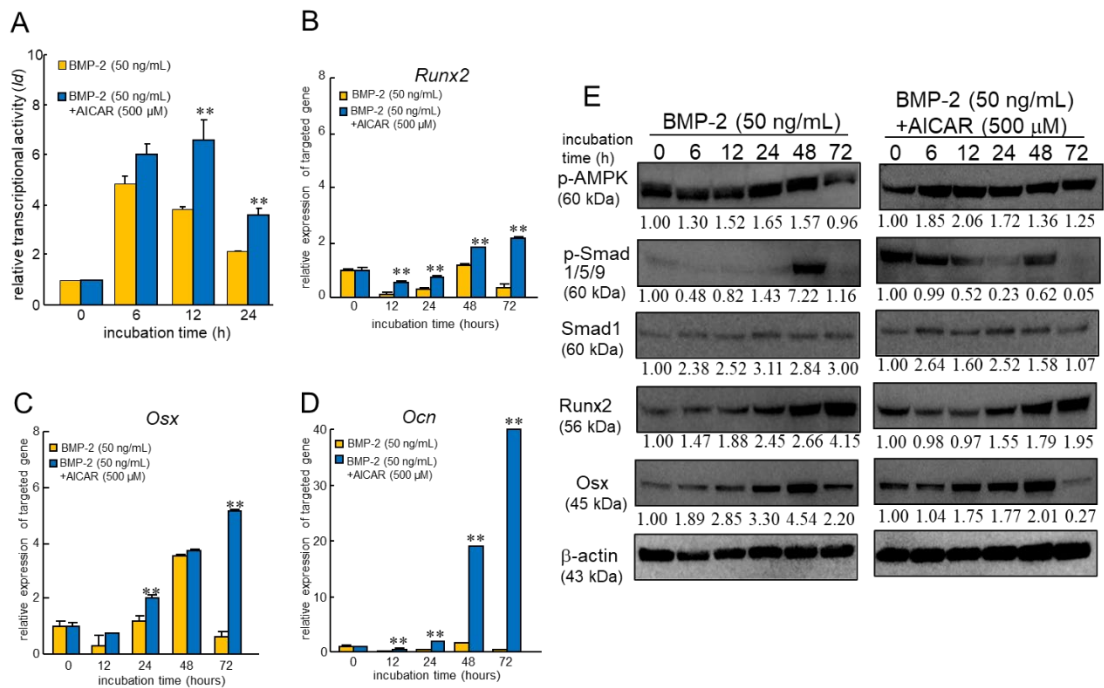


図 10 A : Id プロモーター部位をルシフェラーゼもつ pGL4 プラスミドを, Lipofectamine 3000 を用いて MC3T3-E1 細胞に導入した. この細胞を, AICAR (500 μM) 存在下または非存在下の BMP-2 (50 ng/mL) で培養し, ルシフェラーゼ活性を Id 転写活性の指標として評価した. データは 4 つの培養ウェルからの平均値である (平均±標準誤差). ** は BMP-2 単独投与に対する P < 0.01 を示す.

B-D : MC3T3-E1 細胞を AICAR (500 μM) の存在下または非存在下で BMP-2 と培養した. BMP-2 (50 ng/mL) と培養後の MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化関連遺伝子 Runx2, Osterix/Sp7 (Osx), Osteocalcin (Ocn) の発現を示す.

サンプルは定量性 RT-qPCR 法によって分析され, β-actin mRNA に対して正規化された. データは 6 つの培養ウェルからの平均値である (平均±標準誤差).

** は P < 0.01 対 BMP-2 単独処理を示す.

E : AICAR (500 μM) の存在下または非存在下で, 細胞を BMP-2 (50 ng/mL) で処理した. 標的抗体と β-actin 抗体を用いて WB 解析を行った.

4 回の独立した実験で同様の結果が得られた.

2-3. AICAR は同時に、Ti 上の MC3T3-E1 細胞における

BMP-2 誘導性オートファジー関連分子の発現を増強した

骨芽細胞の分化は、オートファジーによって制御されていることが報告されている [14, 15] . AMPK の活性化が Ti 上の MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化を促進するかどうかを明らかにするために、BMP-2 で処理した Ti 上の MC3T3-E1 細胞のオートファジーに関する AICAR の効果を調べた。BMP-2 は、Ti 上の MC3T3-E1 細胞において、Ulk1, Beclin-1, Map1Lc-3, Parkin などのオートファジー関連遺伝子の発現を時間依存的に誘導し、AICAR 添加によりその発現が増加した (図 11A, B, C, D) . タンパク質の発現に関しても同様の結果が得られ、BMP-2 は、Ti 上の MC3T3-E1 細胞において、LC3-I からオートファゴソーム形成に重要である LC3-II への変換を徐々に増加させた (図 11E) . さらに、AICAR を 12 時間以上添加すると、Ti 上の MC3T3-E1 細胞において、P-AMPK, 特に LC3-II の発現の増加とともに、それらのオートファジー関連分子の発現が増加した。LC3-II の変換変化は、MC3T3-E1 細胞におけるオートファジーのマーカーである Beclin-1 の増加と相関していた。OIM 培地と OIM+AICAR 培地のサンプルにおいて、WB 解析の結果は同様のものを示した (未発表データ) . 一方、AICAR 単独においては、オートファジーマーカーの発現の増加はわずかであった (未発表データ) .

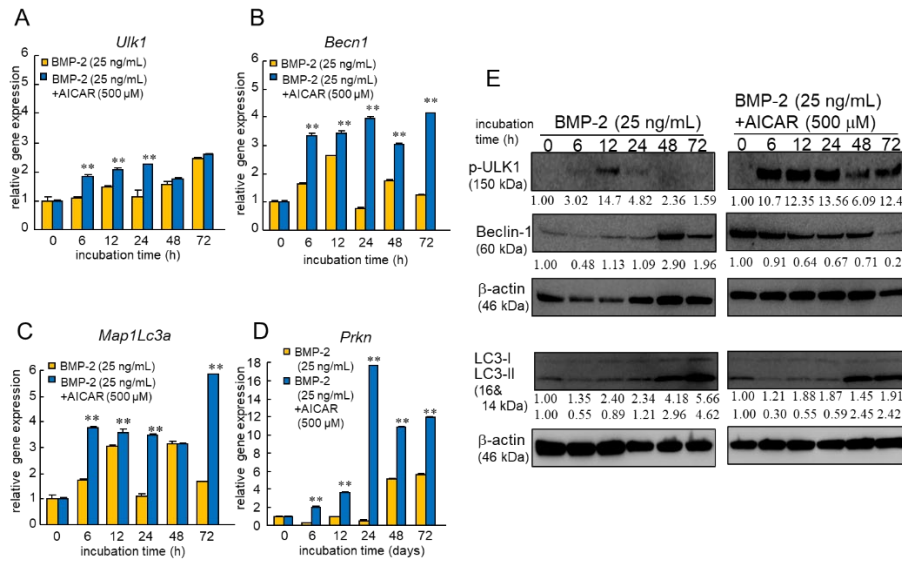


図 11 A-D : MC3T3-E1 細胞を AICAR (500 μM) 存在下または非存在下で BMP-2 と培養した。BMP-2 (25 ng/mL) と培養後の MC3T3-E1 細胞におけるオートファジー関連遺伝子 *Ulk1* (ULK1) , *Becn1* (Beclin-1) , *MapLc3a* (LC3) , *Prkn* (Parkin) の発現を示す。サンプルは定量性 RT-qPCR 法によって分析され、β-actin mRNA に対して正規化された。データは 6 つの培養ウェルからの平均値である (平均±標準誤差) 。** は、BMP-2 単独処理に対する P < 0.01 を示す。

E : AICAR (500 μM) の存在下または非存在下で、細胞を BMP-2 (25 ng/mL) で処理した。標的抗体と β-actin 抗体を用いて WB 解析を行った。同様の結果が 3 つの独立した実験で得られた。

オートファジー関連分子が骨芽細胞形成を制御しているかどうかを確認するために、オートファジー阻害剤であり、PI3 K の活性化を阻害する 3-MA の骨芽細胞分化抑制効果を調べた。オートファジーは初期段階と後期段階で評価されるが、初期段階の阻害剤である 3-MA を用いて、オートファジーが初期段階の骨芽細胞分化に関与しているかどうかを調べた。3-MA で処理すると、Ti 上の MC3T3-E1 細胞の Beclin-1 と p-ULK1 の発現が抑制された (図 12A) 。この処理により、Runx2 や Osx などの骨芽細胞分化マーカーも同時に抑制された (図 12B, C) 。さらに、AICAR の存在下では、Ti 上の MC3T3-E1 細胞における 3-MA の Runx2 および Osx の発現抑制を減弱させたことから、骨芽細胞の分化は、特に初期段階においてオートファジーの活性化によって制御されていることが示された (図 12D) 。

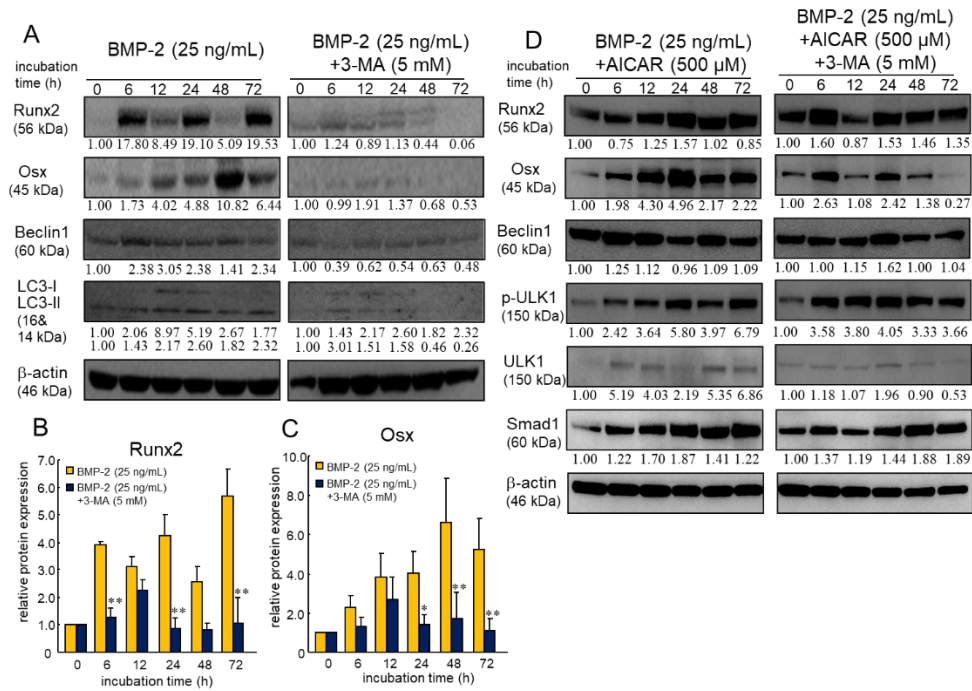


図 12 A : BMP-2 (25 ng/mL) で誘導された骨芽細胞分化分子は、オートファジーのシグナルを媒介した。細胞は、PI3 K 阻害剤である 3-MA (5 mM) の存在下または非存在下で BMP-2 と培養した。

B, C : 棒グラフは 5 サンプルの平均値 (平均±標準誤差) . * および**はそれぞれ, BMP-2 単独での処理に対する $P < 0.05$ および $P < 0.01$ を示す。

D : 細胞を 3-MA (5 mM) の存在下または非存在下で, BMP-2 (25 ng/mL) と AICAR (500 μM) で処理した。標的抗体と β-actin 抗体を用いて WB 解析を行った。同様の結果が 3 つの独立した実験で得られた。

2-4. アディポネクチン受容体活性化剤である APN も骨形成関連分子を 増加させた

アディポネクチンは、ミクログリア、ラット初代骨芽細胞、乳がん細胞など様々な種類の細胞において、アディポネクチン受容体を介して AMPK を活性化する [16, 17, 18]. 一方、糖尿病患者では、血清中のアディポネクチン濃度が低下すると、AMPK の阻害を介して肝臓や筋肉でのグルコース取り込みが抑制された [19, 20]. そこで、アディポネクチンが Ti における骨芽細胞分化を活性化するかどうかを明らかにするために、Ti 上の MC3T3-E1 細胞において、AICAR の存在下または非存在下で、アディポネクチン受容体 type1/type2 活性化剤である APN が転写活性および骨芽細胞分化関連分子の発現に及ぼす影響を検討した. APN (50 μ M) は Id の転写活性を徐々に増加させた (図 13A). さらに AICAR を加えると、転写活性は大幅に増加した. APN は、Ti 上の MC3T3-E1 細胞において、時間依存的に Runx2, Osx および Ocn 遺伝子の発現を誘導した (図 13B). さらに、APN は骨芽細胞分化マーカーとオートファジー関連分子の発現を誘導した. AICAR の添加は、APN 単独での処理と比較して、24 時間以上にわたって両者の発現を増加させた (図 13C).

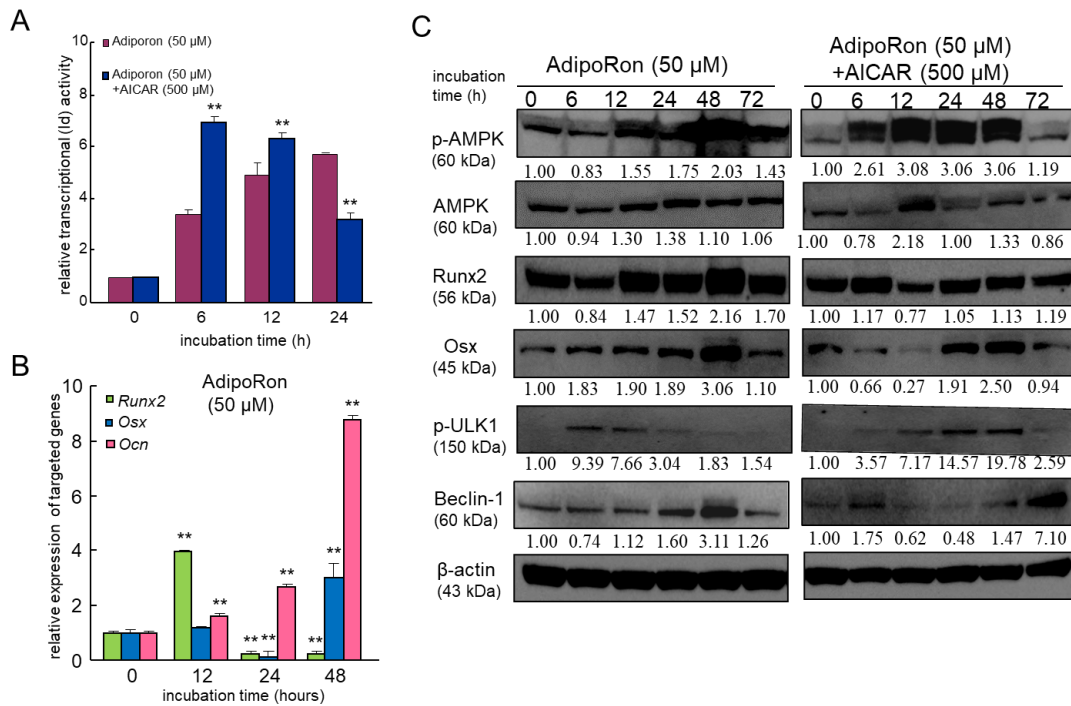


図 13 A : Id プロモーター部位に導入した pGL4 プラスミドを, Lipofectamine 3000 を用いて MC3T3-E1 細胞にトランスフェクションした. 細胞を培養中, AICAR (500 μ M) 存在下または非存在下の AdipoRon (APN, 50 μ M) でルシフェラーゼ活性を Id 転写活性の指標として評価した. データは 4 つの培養ウェルからの平均値である (平均 \pm 標準誤差).

** は, APN 単独投与に対する $P < 0.01$ を示す.

B : MC3T3-E1 細胞を APN と培養した. APN との培養後の MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化関連遺伝子 Runx2, Osx, Ocn の発現を示す. サンプルは定量性 RT-qPCR 法によって解析し, β -actin に対して正規化した. データは 6 ウェル培養の平均値を示す. (平均 \pm 標準誤差).

** は, APN 単独投与に対する $P < 0.01$ を示す.

C : 細胞を AICAR (500 μ M) の存在下または非存在下で APN により処理した. 標的抗体と β -actin 抗体を用いて WB 解析を行った. 4 回の独立した実験で同様の結果が得られた.

小括

AMPK 活性化促進剤である AICAR は、BMP-2 の存在下において Ti 上の MC3TE-E1 細胞の増殖を促進した。また、骨芽細胞分化遺伝子とタンパク質の発現を促進し、それにはオートファジーを介していたことが分かった。

また、AMPK の上流にあるアディポネクチンの活性化は、転写活性を増加させ、さらに AICAR の存在下ではそれを促進した。RT-PCR 法と WB 解析では、APN 単剤において、骨芽細胞分化マーカーとオートファジー関連分子を発現させた。AICAR 併用すると APN 単剤と比較して、24 時間以上にわたり骨芽細胞分化マーカーとオートファジー関連分子を発現させた。

考察

インプラント治療は、多く臨床で行われている。オッセオインテグレーションを獲得するために、主に使用されているチタン製インプラントは、さまざまなデザイン、表面性状を有している。チタンの処理方法は酸エッチング処理とチタン粉によるサンドブラストを組み合わせたSLA処理、陽極酸化による処理など多くものが報告されている。その表面処理方法により、接着や分化のメカニズムは様々である。

インテグリンは細胞の初期接着に重要なタンパク質である。Ti上において、前骨芽細胞や間葉系幹細胞の表面に発現するインテグリンによって、骨芽細胞分化を促進するという報告がされている [1]。今回我々は、歯科インプラントに広く使用されているJIS4種のTiに機械研磨処理 (Sa:176.6 $\mu\text{m}\pm 0.0054$) をしたものを用いた。機械研磨上のMC3T3-E1細胞においても、Integrin $\alpha 2$, Integrin αV , Integrin $\beta 1$, Integrin $\beta 3$ の発現がTCPDと比較して増加した。また、骨芽細胞分化マーカーの発現とタンパク質の発現が増加した。この結果は、他の報告と一致している [21]。また、細胞の増殖においてもTCPDよりもTi上の細胞が増殖率も高かった。Integrin $\alpha 5$ はTi表面の粗さに関係なくTi上の骨芽細胞の分化と増殖を制御していると報告がある [22]。また、Integrin $\alpha 2$, Integrin $\beta 1$ は複合体をなし、骨芽細胞分化をするという報告もある [23, 24]。このことにより、今回の実験においても、TCPDに比べてIntegrin $\alpha 2$, Integrin αV , Integrin $\beta 1$ が発現することにより、BMP-2の効果を相乗的に促進した可能性がある。異なる表面性状の報告では、ナノ構造をもつTiは、Integrin αV が発現すると骨芽細胞分化を促進すると報告している [25]。Integrin $\beta 3$ においても骨芽細胞分化を促進する報告があり、インテグリンの発現による効果はさらなる研究が必要である [26]。インテグリンによるシグナル伝達で下流のメカニズムでは

FAK, MAPK, Wntシグナルとの関連性が報告されている [1] . また, 陽極酸化処理されたTi表面はIntegrin β 1を介してFAKのリン酸化とMAPK経路を阻害し, 破骨細胞への分化を抑制すると報告している [27] . そして, その下流のシグナル伝達にはWnt/ β -Cateninシグナルの制御によって骨芽細胞分化するという報告をしている [28] . この実験においてもWnt/ β -Cateninシグナル, FAK, MAPKのシグナルに変化があった可能性があるが, さらなる研究が必要である.

AICARによって惹起されるAMPK活性化は, MC3T3-E1細胞においてSmad1/5/8のリン酸化を促進し, TCPD上での骨芽細胞分化をもたらす [29] . また, BMP-2はSmad1/5をリン酸化し, 骨芽細胞分化をもたらす [30] . 本実験では, BMP-2はTi上でのMC3T3-E1細胞の増殖比率を時間依存的に誘導したが, AMPK活性化物質であるAICARの添加により, Ti上での増殖比率はわずかに増加した. さらに, AICARはTi上でもTCPDと同様にSmad1/5リン酸化を介してMC3T3-E1細胞のBMP誘導Id転写活性と骨形成関連分子の発現を増加させた. さらに, AICAR存在下でのBMP-2は, Ti上で培養したMC3T3-E1細胞において, TCPD上で観察されるよりも高い程度に, それらの骨芽細胞分化関連分子の発現を誘導した. 我々は最近, AICARがTi上のMC3T3-E1細胞の石灰化を促進することを報告した [9] . 本研究の結果と同様に, これらの結果は, AMPKの活性化が, TCPD上で報告されたものと同様に, Ti上のMC3T3-E1細胞における骨芽細胞分化を有意に促進することを示し, AICARが, 少なくとも部分的に, Smad1/5シグナル伝達経路を介してBMP誘導性骨芽細胞分化を相乗的に促進することを示唆している.

オートファジーは, 骨組織の恒常性維持に必要な役割を果たしていることが報告されている [31] . 興味深いことに, 未分化間葉系幹細胞では, オートフ

ファジーのフラックスが停止している状態で、未分解のオートファジー液胞が多数蓄積しており [32] , これらの蓄積したオートファジー液胞が、間葉系幹細胞の分化をサポートするために、速やかに産生されるエネルギーの供給源として機能している可能性が示唆されている [14, 33] . 骨芽細胞は間葉系に由来する特殊な細胞であり、骨形成に関与している。そのため、骨芽細胞におけるオートファジーの障害は、骨量の減少につながる [15, 34, 35] .

今回観察されたものを含め、AMPKの活性化は、オートファジーを誘導し、骨髄や歯根膜の間質/幹細胞から骨芽細胞への分化を誘導した [7, 14, 36] . 本実験において、BMP-2は、TCPD上だけでなく、Ti上のMC3T3-E1細胞においても、Beclin-1, Bnip3, LC3-IIなどのオートファジー関連分子の発現を誘導した。さらに、AMPK活性化物質であるAICARは、BMP-2存在下でもオートファジー関連分子の発現を増加させることを見出した。オートファジー関連分子、特にLC3-IIの発現を増加させた。対照的に、PI3 K阻害剤である3-MAは、オートファジー関連分子および骨芽細胞分化関連分子の発現を抑制した。OIMは部分的にAMPK活性化を介して、TCPD上の間葉系間質細胞からの骨芽細胞分化を刺激することが報告されているが、BMP-2はTi上のAMPKのリン酸化にほとんど影響を及ぼさなかった。今回の実験では、AMPKの活性化が、オートファジーの活性化を介して、Ti上のMC3T3-E1細胞からの骨芽細胞分化を促進した。これらの結果は、AMPKがオートファジーを活性化し、Ti上の前骨芽細胞であるMC3T3-E1細胞の骨芽細胞分化を促進することを示した。

アディポネクチンは脂肪細胞由来のペプチドホルモンであり、AMPKシグナル伝達経路を介してグルコースの分解および脂肪酸酸化を促進することにより、インスリン抵抗性および代謝障害を減少させる同化作用を発揮する [37, 38, 39] . AMPKの活性化は、Tiではなく、TCPD上の間葉系幹細胞/間質細胞

を含む骨芽細胞系において、Wnt/ β -Catenin [40] , eNOS [41] , ERK [42] , オートファジー [7] などのいくつかの下流シグナル伝達経路を刺激することが報告されている。加えて、アディポネクチン受容体 type1 は、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞に発現している [43] 。

APN は、アディポネクチン受容体 type1/type2 に結合し、インスリン抵抗性と耐糖能異常を改善することが報告されている [44] 。 APN は、ラットの糖尿病モデルにおいて、軟骨内骨化障害による骨修復遅延を介した糖尿病ラットの新生骨形成を促進した [17, 45] 。 また、APN の特性は骨髄由来の間葉系幹細胞の可動化や補充を誘導し、組織修復に関与させることが報告されている [46, 47] 。 しかし、*in vitro* で歯科インプラントを埋入したげっ歯類のオッセオインテグレーションにおける APN のメカニズムについては、ほとんど知られていない。本研究では、APN が TCPD と同様に Ti 上で AMPK を活性化し、前骨芽細胞における骨芽細胞分化およびオートファジー関連分子の発現を増加させることを見出し、*in vitro* における Ti 上のオッセオインテグレーション中の骨芽細胞分化に対する AMPK 活性化因子の増強効果を示唆した。

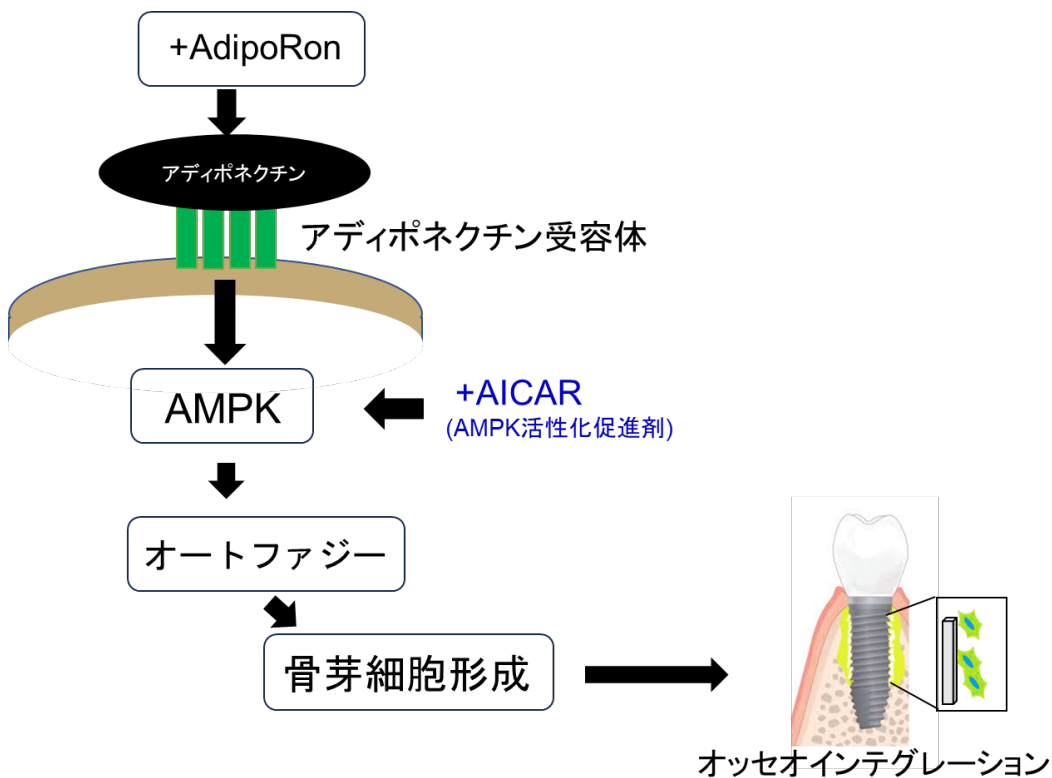
近年、2型糖尿病患者において、歯科インプラント埋入後の初期段階での失敗の割合が、後期段階での失敗の割合よりも高いことが報告されている [48, 49] 。 2型糖尿病患者では、血清中のアディポネクチン濃度が低下していることが報告されている [50, 51] 。 組織学的研究において、糖尿病モデルラットは、歯科用インプラント周囲の歯槽骨において、BIC の低下や未熟な骨形成を認めた [52] 。 さらに、インスリンで治療中の糖尿病モデルラットでも、新生骨の骨質とオッセオインテグレーションが著しく低下していた [53, 54, 55, 56] 。 したがって、糖尿病患者におけるオッセオインテグレーションの低下は、歯科インプラント治療中に改善すべき臨床的に重要な現象である。今回の

AMPK 活性化による骨芽細胞の分化促進は、糖尿病環境下においても骨芽細胞分化を活性化させる可能性がある。今後は、糖尿病環境下における *in vitro* 実験、また、糖尿病モデルのラットを用いた *in vivo* 実験を行い、オッセオインテグレーションの改善、促進がされるかどうか、研究を遂行したい。

結語

本研究において、Ti 上の前骨芽細胞は骨芽細胞分化を TCPD 上より促進し、オートファジーの亢進とインテグリンの発現を増加させた。また、アディポネクチンとその下流の AMPK シグナルが骨芽細胞分化を促進することを見出した。さらに、この分化亢進はオートファジー（自食作用）シグナルによって制御されていた。

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、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。



引用文献

1. Siebers MC, Ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials*. 2005; 26: 137–146.
2. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. *Chem Biol*. 2012; 19:1222-1236.
3. Burkewitz K, Zhang Y, Mair WB. AMPK at the Nexus of Energetics and Aging. *Cell Metab*. 2014;20:10-25.
4. Wu SB, Wu YT, Wu TP, Wei YH. Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014; 1840:1331-1344.
5. Mu W, Wang Z, Ma C, Jiang Y, Zhang N, Hu K, et al. Metformin promotes the proliferation and differentiation of murine preosteoblast by regulating the expression of sirt6 and oct4. *Pharmacol Res*. 2018; 129:462-474.
6. Ko FC, Kobelski MM, Zhang W, Grenga GM, Martins JS, Demay MB. Phosphate restriction impairs mTORC1 signaling leading to increased bone marrow adipose tissue and decreased bone in growing mice. *J Bone Miner Res*. 2021; 36:1510-1520.
7. Li Y, Su J, Sun W, Cai L, Deng Z. AMP-activated protein kinase stimulates osteoblast differentiation and mineralization through autophagy induction. *Int J Mol Med*. 2018; 41:2535-2544.
8. Kanazawa I, Takeno A, Tanaka K ichiro, Notsu M, Sugimoto T. Osteoblast AMP-activated protein kinase regulates glucose metabolism and bone mass in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 503:1955-1961.
9. Vansana P, Kakura K, Taniguchi Y, Egashira K, Matsuzaki E, Tsutsumi T, et al. The effect of AMP kinase activation on differentiation and maturation of osteoblast cultured on titanium plate. *J Dent Sci*. 2022; 17:1225-1231.
10. Shetty S, Kusminski CM, Scherer PE. Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies. *Trends Pharmacol Sci*. 2009; 30:234-239.

11. Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin Receptor as a Key Player in Healthy Longevity and Obesity-Related Diseases. *Cell Metab.* 2013; 17:185-196.
12. Khan MP, Kumar Singh A, Joharapurkar AA, Yadav M, Shree S, Kumar H, et al. Pathophysiological Mechanism of Bone Loss in Type 2 Diabetes Involves Inverse Regulation of Osteoblast Function by PGC-1 α and Skeletal Muscle Atrogenes: AdipoR1 as a Potential Target for Reversing Diabetes-Induced Osteopenia. *Diabetes.* 2015; 64:2609-2623.
13. Wu YC, Wang WT, Lee SS, Kuo YR, Wang YC, Yen SJ, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist Attenuates Autophagy to Ameliorate Pulmonary Arterial Hypertension through Drp1/NOX- and Atg-5/Atg-7/Beclin-1/LC3 β Pathways. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:3435.
14. Yasunaga M, Kajiya H, Toshimitsu T, Nakashima H, Tamaoki S, Ishikawa H, et al. The Early Autophagic Pathway Contributes to Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *J Hard Tissue Biol.* 2019; 28:63-70.
15. Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis. *Autophagy.* 2014; 10:1965-1977.
16. Jian M, Kwan JSC, Bunting M, Ng RCL, Chan KH. Adiponectin suppresses amyloid- β oligomer (A β O)-induced inflammatory response of microglia via AdipoR1-AMPK-NF- κ B signaling pathway. *J Neuroinflammation.* 2019;16:110.
17. Hu XF, Wang L, Lu YZ, Xiang G, Wu ZX, Yan YB, et al. Adiponectin improves the osteointegration of titanium implant under diabetic conditions by reversing mitochondrial dysfunction via the AMPK pathway in vivo and in vitro. *Acta Biomater.* 2017; 61:233-248.
18. Chung SJ, Nagaraju GP, Nagalingam A, Muniraj N, Kuppusamy P, Walker A, et al. ADIPOQ/adiponectin induces cytotoxic autophagy in breast cancer cells through STK11/LKB1-mediated activation of the AMPK-ULK1 axis. *Autophagy.* 2017; 13:1386-1403.
19. Li X, Wang Y-X, Shi P, Liu Y-P, Li T, Liu S-Q, et al. Icariin treatment reduces blood glucose levels in type 2 diabetic rats and protects pancreatic function. *Exp Ther Med.* 2020; 19:2690-2696.

20. Ziqubu K, Dlodla P V., Moetlediwa MT, Nyawo TA, Pheiffer C, Jack BU, et al. Disease progression promotes changes in adipose tissue signatures in type 2 diabetic (db/db) mice: The potential pathophysiological role of batokines. *Life Sci.* 2023; 313:121273.
21. Raz P, Lohmann CH, Turner J, Wang L, Poythress N, Blanchard C, et al. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Regulation of integrin expression is substrate dependent. *J Biomed Mater Res A.* 2004;71A:217–225.
22. Keselowsky BG, Wang L, Schwartz Z, Garcia AJ, Boyan BD. Integrin alpha (5) controls osteoblastic proliferation and differentiation responses to titanium substrates presenting different roughness characteristics in a roughness independent manner. *J Biomed Mater Res.* 2007; 80:700–710.
23. Lai M, Hermann CD, Cheng A, Olivares-Navarrete R, Gittens RA, Bird MM, et al. Role of $\alpha_2\beta_1$ Integrins in Mediating Cell Shape on Microtextured Titanium Surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2015; 103:564-573.
24. Wang X, Schwartz Z, Gittens RA, Cheng A, Olivares-Navarrete R, Chen H, et al. Role of integrin $\alpha_2\beta_1$ in mediating osteoblastic differentiation on three-dimensional titanium scaffolds with submicron-scale texture. *J Biomed Mater Res A.* 2015; 103:1907-1918.
25. Lopes HB, Freitas GP, Fantacini DMC, Picanço-Castro V, Covas DT, Rosa AL, et al. Titanium with nanotopography induces osteoblast differentiation through regulation of integrin α_V . *J Cell Biochem.* 2019; 120:16723–16732.
26. Lopes HB, Freitas GP, Elias CN, Tye C, Stein JL, Stein GS, et al. Participation of Integrin β_3 in Osteoblast Differentiation Induced by Titanium with Nano or Microtopography. *J Biomed Mater Res A.* 2019; 107:1303-1313.
27. He Y, Li Z, Ding X, Xu B, Wang J, Li Y, et al. Nanoporous titanium implant surface promotes osteogenesis by suppressing osteoclastogenesis via integrin β_1 /FAKpY397/MAPK pathway. *Bioact Mater.* 2022; 8:109–123.
28. Wang W, Zhao L, Ma Q, Wang Q, Chu PK, Zhang Y. The role of the Wnt/ β -catenin pathway in the effect of implant topography on MG63 differentiation. *Biomaterials.* 2012;33:7993–8002.

29. Jang WG, Kim EJ, Lee KN, Son HJ, Koh JT. AMP-activated protein kinase (AMPK) positively regulates osteoblast differentiation via induction of Dlx5-dependent Runx2 expression in MC3T3E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 404:1004-1009.
30. Zhou X, Xu SN, Yuan ST, Lei X, Sun X, Xing L, et al. Multiple functions of autophagy in vascular calcification. *Cell Biosci.* 2021; 11:159.
31. Guan JL, Simon AK, Prescott M, Menendez JA, Liu F, Wang F, et al. Autophagy in stem cells. *Autophagy.* 2013; 9:830-849.
32. Nuschke A, Rodrigues M, Stolz DB, et al. Human mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells consume accumulated autophagosomes early in differentiation. *Stem Cell Res Ther.* 2014; 5:140.
33. Pierrefite-Carle V, Santucci-Darmanin S, Breuil V, Camuzard O, Carle GF. Autophagy in bone: Self-eating to stay in balance. *Ageing Res Rev.* 2015; 24:206-217.
34. Li H, Li D, Ma Z, Qian Z, Kang X, Jin X, et al. Defective autophagy in osteoblasts induces endoplasmic reticulum stress and causes remarkable bone loss. *Autophagy.* 2018; 14:1726-1741.
35. Liu F, Fang F, Yuan H, Yang D, Chen Y, Williams L, et al. Suppression of autophagy by FIP200 deletion leads to osteopenia in mice through the inhibition of osteoblast terminal differentiation. *J Bone Miner Res.* 2013; 28:2414-2430.
36. Veldhuis-Vlug AG, Rosen CJ. Mechanisms of Marrow Adiposity and its Implications for Skeletal Health. *Metabolism.* 2017; 67:106-114.
37. Yamaguchi T, Sugimoto T. Bone metabolism and fracture risk in type 2 diabetes mellitus. *Bonekey Rep.* 2012; 1:36.
38. Okada-Iwabu M, Iwabu M, Yamauchi T, Kadowaki T. Structure and function analysis of adiponectin receptors toward development of novel antidiabetic agents promoting healthy longevity. *Endocr J.* 2018; 65:971-977.
39. Kim AY, Park YJ, Pan X, Shin KC, Kwak SH, Bassas AF, Sallam RM, Park KS, Alfadda AA, Xu A, Kim JB. Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance. *Nat Commun.* 2015; 6:7585.

40. Takatani T, Minagawa M, Takatani R, Kinoshita K, Kohno Y. AMP-activated protein kinase attenuates Wnt/ β -catenin signaling in human osteoblastic Saos-2 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2011; 339:114-119.
41. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. Activation of AMP kinase and inhibition of Rho kinase induce the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through endothelial NOS and BMP-2 expression. *Am J Endocrinol Metab.* 2009; 296: E139-E146.
42. Kim JE, Ahn MW, Baek SH, Lee IK, Kim YW, Kim JY, Dan JM, Park SY. AMPK activator, AICAR, inhibits palmitate-induced apoptosis in osteoblast. *Bone* 2008; 43:394-404.
43. Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, et al. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone.* 2004; 35:842-849.
44. Nicolas S, Rochet N, Gautier N, Chabry J, Pisani DF. The adiponectin receptor agonist AdipoRon normalizes glucose metabolism and prevents obesity but not growth retardation induced by glucocorticoids in young mice. *Metabolism.* 2020; 103:154027.
45. BoRui Huang, Wei Bi, Yang Sun, Ruixue Li, Xingwen Wu, Youcheng Yu. AdipoRon promotes the osseointegration of dental implants in mice with type 2 diabetes mellitus. *Front Physiol.* 2021; 12:697738.
46. Huang CY, Lee CY, Chen MY, Tsai HC, Hsu HC, Tang CH. Adiponectin increases BMP-2 expression in osteoblasts via AdipoR receptor signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2010; 224:475-483.
47. Lin YY, Chen CY, Chuang TY, Lin Y, Liu HY, Mersmann HJ, et al. Adiponectin receptor 1 regulates bone formation and osteoblast differentiation by GSK-3 β / β -Catenin signaling in mice. *Bone.* 2014; 64:147-154.
48. de Araújo Nobre M, Maló P, Gonçalves Y, Sabas A, Salvado F. Dental implants in diabetic patients: retrospective cohort study reporting on implant survival and risk indicators for excessive marginal bone loss at 5 years. *J Oral Rehabil.* 2016; 43:863-870.

49. Dubey RK, Gupta DK, Singh AK. Dental implant survival in diabetic patients; review and recommendations. *Nat J Maxillofac Surg.* 2013; 4:142-150.
50. Li S, Shin HJ, Ding EL, Van Dam RM. Adiponectin Levels and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.* 2009; 302:179-188.
51. Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Hirata A, Yamaguchi H, et al. Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study. *Diabetes Care.* 2003; 26:2015-2020.
52. Saito N, Mikami R, Mizutani K, Takeda K, Kominato H, Kido D, et al. Impaired dental implant osseointegration in rat with streptozotocin-induced diabetes. *J Periodontal Res.* 2022; 57:412-424.
53. Doll C, Hartwig S, Nack C, Nahles S, Nelson K, Raguse JD. Dramatic course of osteomyelitis in a patient treated with immediately placed dental implants suffering from uncontrolled diabetes: A case report. *Eur J Oral Implantol.* 2015; 8:405-410.
54. De Morais JAND, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E, Wenzel A, Scaf G. Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20:796-801.
55. McCracken MS, Aponte-Wesson R, Chavali R, Lemons JE. Bone associated with implants in diabetic and insulin-treated rats. *Clin Oral Implants Res.* 2006; 17:495-500.
56. Shyng YC, Devlin H, Ou KL. Bone formation around immediately placed oral implants in diabetic rats. *Int J Prosthodont.* 2006; 19:513-514.

謝辞

本研究の遂行と本論文作成に際し、ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに感謝の意を表する。

本学大学咬合修復学講座口腔インプラント学分野教授城戸寛史先生、准教授加倉加恵先生並びに本大学口腔医学研究センター教授大野純先生、本学分子生物学講座細胞生物学分野准教授鍛冶屋浩先生、口腔インプラント学分野の皆様に感謝申し上げます。

共同研究者

鍛冶屋 浩¹⁾²⁾，堤貴司³⁾，谷口祐介⁴⁾，加倉加恵⁴⁾，大野純²⁾，城戸寛史⁴⁾

1)福岡歯科大学 細胞分子生物学講座 細胞生理学分野

2)福岡歯科大学 口腔医学研究センター

3)福岡歯科大学 総合歯科学講座 訪問歯科センター

4)福岡歯科大学 咬合修復学講座 口腔インプラント学分野