

# P450c24による骨代謝制御機構について

飯田 俊二 [北海道大学大学院歯学研究科／助手]

## 背景・目的

骨組織は骨格の維持、生体内カルシウムの恒常性を担っている。ビタミンDは骨代謝に重要な役割をはたしており、カルシウム、リンの腸管からの吸収を促進させることが知られているが、骨組織への直接的作用についての詳細は明らかではない。また近年、骨格、骨密度の維持には骨組織への機械的刺激が重要であることが明らかにされた。そこで本研究では機械的刺激とビタミンDによる骨代謝に関連性があるのかを検討するため、機械的刺激によりビタミンD代謝酵素であるP450c24の発現レベルが変動するのか解析をおこなった。

## 内容・方法

PDL(ヒト歯根膜)細胞およびUMR106細胞を10%血清添加D-MEMを用いてBioFlex培養プレート上に培養。コンフルエント後、100nM dexamethasoneと各種濃度(0,1,10nM)1,25D添加無血清 D-MEMに交換し、機械的刺激を与えた。機械的刺激(ストレス群)はcyclic tension forceを15%伸展とし、1分あたり60cycleを6時間作用させた。コントロール群として刺激を与えないものを用い、ともにメディア交換後6時間にISOGENによりtotal RNAの抽出を行った。UMR106細胞においてはGAPDH, ALP(アルカリ性ホスファターゼ), P450c24に対するprimerを用いてRT-PCR法により、またPDL(ヒト歯根膜)細胞についてはノーザンブロッティング法にてP450c24のmRNA発現レベルについて解析をおこなった。

## 結果・成果

### 〈結果〉

UMR106細胞におけるRT-PCR解析:コントロール群およびストレス群より抽出したtotal RNAを用いてRT反応後、PCR法にてP450c24遺伝子発現レベルの変化を検討した。コントロール群においては、ビタミンDの濃度依存的にP450c24遺伝子発現の亢進が認められた。一方、機械的刺激を与えたストレス群においては、ビタミンD添加によるP450c24遺伝子発現の変化は生じなかった。さらに、骨芽細胞および骨形成のマーカー遺伝子であるALP遺伝子の発現を検討したところ、ストレス群ビタミンD無添加において最も発現が亢進していた。GAPDHは機械的刺激、ビタミンDに応答しない遺伝子としてRT-PCR解析のコントロールとした。

PDL(ヒト歯根膜)細胞におけるノーザンブロッティング解析:歯牙を支持している歯根膜においてもUMR106細胞と同

様な結果を得ることができるので確認した。P450c24RNAに対するプローブを反応させた結果、UMR106細胞におけるRT-PCR解析と同様にストレス群と比べ機械的刺激を与えないコントロール群においてP450c24遺伝子発現の亢進が認められた。

### 〈考察〉

本研究では、機械的刺激の付加によりビタミンD代謝酵素であるP450c24の遺伝子発現が抑制されることを明らかにできた。以前、我々はUMR106細胞にビタミンDとPTHを加えることにより、ビタミンD濃度依存的にP450c24の発現が増加することを報告した。この結果は、UMR106細胞においてビタミンD応答性にP450c24を発現させビタミンD代謝を亢進させるネガティブフィードバック機構の存在を示唆すると考えられる。また多量のビタミンDをin vitroにおいて直接、骨組織に作用させると骨吸収の亢進が生じることが報告されている。本研究結果およびこれらの報告から、機械的刺激の付加は骨系細胞においてビタミンD依存的なP450c24遺伝子発現変化を抑制していることから、ビタミンDに対する感受性を低下させている可能性がある。さらにALP遺伝子の発現が機械的刺激により亢進することから、骨組織という局所において機械的刺激は骨系細胞に対してビタミンDに対する感受性を変化させ、骨形成を促進させる方向に作用するのではないかと考察する。

## 今後の展望

歯科の分野では補綴処置を行う上で頸堤形態の良、不良が治療の予後に大きく影響を及ぼす。そこでなるべく抜歯後の頸堤吸収を抑えるために、また逆に頸堤形態を良好なものへ転化するために骨代謝活性の分子レベルでの知識が必要となる。今回の結果から、機械的負荷によりビタミンD代謝に関与する酵素であるP450c24の活性が低下したことがわかった。このことはある程度の機械的刺激を骨系細胞に与えることにより骨形成を促進させることが出来る可能性を示唆している。

今後の課題としては機械的刺激の強さや種類を変えることによりどのような変化が出てくるのかを確認したい。