

MC3T3-E1 細胞による石灰化物形成に及ぼす アジスロマイシンの影響について

加藤健悟¹, 尾崎愛美^{2,3}, 中井久美子^{2,3}, 好士亮介², 田中秀樹^{2,3}, 加藤伸依¹, 福澤京子¹, 外木守雄¹, 川戸貴行^{2,3}

¹日本大学大学院歯学研究科歯学専攻, ²日本大学歯学部衛生学講座,
³日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門, ⁴日本大学歯学部口腔外科学第1講座

目的

アジスロマイシンは、菌の増殖だけでなく炎症反応や破骨細胞の骨吸収能を抑制することが報告されている。一方、骨芽細胞は高いアルカリホスファターゼ (ALPase) 活性を有し、骨代謝における骨形成を担う。本研究では、アジスロマイシンが骨芽細胞の骨形成機能に及ぼす影響を検討した。

材料及び方法

MC3T3-E1 細胞 (マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞)

培養条件: 37°C, 5% CO₂ 存在下

培地: 実験① MEM-α (10% FBS, 1% 抗生物質溶液を添加)
実験② 上記の MEM-α + アスコルビン酸と β-グリセリン酸
+
アジスロマイシン
(0, 0.1, 1, 10 μg/ml)

→ 実験①

• ALPase 活性
3, 5, 7, 10日後
• 遺伝子発現 (real-time PCR)
7, 10日後

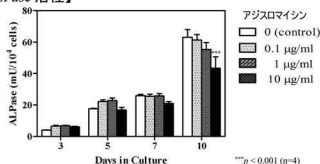
→ 実験②

• 石灰化物をアリザリンレッド染色
14日後

MC3T3-E1 細胞を培養 plate に播種し, 0 (control), 0.1, 1 および 10 μg/ml のアジスロマイシンを加えた培地で10日間培養した。ALPase 活性は、*p*-nitrophenol phosphate を含む反応液を加えた後、酵素反応で生じる *p*-nitrophenol 量を測定して調べた。Type I コラーゲン、骨シアロタンパク質またはオステオポンチンの遺伝子発現は、real-time PCR 法で調べた。石灰化物形成は、アスコルビン酸および β-グリセリン酸を含む石灰化誘導培地にアジスロマイシンを添加して細胞を14日間培養後、アリザリンレッド染色で調べた。

結果

【ALPase 活性】



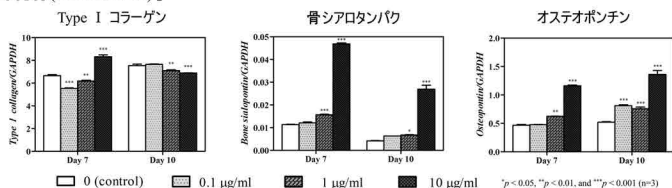
ALPase 活性はいずれの条件においても培養10日目が最も高かった。
また、培養10日目ではコントロールに比べ、10 μg/ml のアジスロマイシン添加で ALPase 活性が有意に低下した。

【アリザリンレッド染色】



培養14日目のアリザリンレッドの染色性は、0.1 および 1 μg/ml のアジスロマイシン添加ではコントロールと同程度であった。それに対し、10 μg/ml のアジスロマイシン添加では、コントロールと比較し明らかな染色性の低下を認めた。

【遺伝子発現 (Real-time PCR)】



Type I コラーゲンの遺伝子発現は、培養7日目では、コントロールに比べて0.1 μg/ml と 1 μg/ml のアジスロマイシン添加で有意な低下と 10 μg/ml のアジスロマイシン添加で有意な増加を、また培養10日目では、1 μg/ml と 10 μg/ml のアジスロマイシン添加で有意な低下を認めた。

さらに、骨シアロタンパク質とオステオポンチンの遺伝子発現は、培養7日目と10日目に0.1 μg/ml, 1 μg/ml または 10 μg/ml のアジスロマイシン添加で有意な増加を認めた。また、これらの発現増加は10 μg/ml のアジスロマイシンで最も顕著であった。

結論

ALPase はリン酸化合物を分解する酵素で、本研究ではアジスロマイシンを添加すると低下した。また、アジスロマイシンの添加によって発現が増加した骨基質タンパクのうち、オステオポンチンはリン酸化修飾された状態ではヒドロキシアパタイト結晶に結合し石灰化を抑制する効果がある。これらの知見と本研究結果から、高濃度 (10 μg/ml) のアジスロマイシンは、ALPase 活性の低下とオステオポンチンの発現増加により、骨芽細胞による骨形成機能を抑制する可能性が考えられた。