

氏名	中川 沙紀		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5699号		
学位授与の日付	平成30年3月23日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	真菌二次代謝産物である(+)-terrein がマウス骨髄由来マクロファージにおいて RANKL 誘導性破骨細胞分化に及ぼす影響と標的分子の解明		
論文審査委員	岡村 裕彦 教授	中野 敬介 准教授	川邊 紀章 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

近年、自身の歯が多数残る高齢者数が増加している。一方、自身の歯が残る事に伴い歯周炎に罹患する高齢者数も増加傾向にあり、その対策を構築することが求められている。歯周炎が進行すると、破骨細胞の過剰形成による病的な歯槽骨破壊が生じる。破骨細胞の分化調節機構においては、receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL) 誘導性シグナル経路が重要な役割を果たす。これまでの研究でRANKLとマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony stimulating factor : M-CSF) が破骨細胞分化に必須因子であること、そして、nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1 (NFATc1) の発現が破骨細胞分化に必要な最終転写因子であることが報告されている。したがって、炎症性骨吸収を主病態とする歯周炎の病態を制御するためには、NFATc1をはじめとした破骨細胞の分化機能を制御する手段を検討することが重要である。

一方、破骨細胞をターゲットとした骨吸収抑制薬 (ビスフォスフォネート製剤等) の使用に伴い、薬剤関連顎骨壊死 (medicine osteonecrosis of the jaw : MRONJ) などの重篤な副作用が報告されている。そのため、破骨細胞の機能制御作用を有し、かつ、生体安全性に優れた新たな抗炎症性骨吸収抑制薬の開発が求められている。

申請者は、真菌 *Aspergillus terreus* から二次代謝産物として分離された低分子化合物、(+)-terrein の効果に着眼した。これまでの先行知見から、有機化学合成された(+)-terrein は抗炎症作用を有することから、破骨細胞の分化や機能に影響を及ぼす可能性が示唆されているが、未だ詳細は不明である。

そこで本研究では、(+)-terrein のRANKL誘導性破骨細胞分化に及ぼす影響を検討するとともに、破骨細胞分化最終転写因子NFATc1への影響の検討を行い、(+)-terrein の骨代謝に及ぼす作用効果と作用機序の解明を図った。

【材料と方法】

1. 試薬 : (+)-terrein は L-酒石酸から合成したものをを用いた (岡山大学大学院自然科学研究科 萬代大樹博士提供)。破骨細胞分化因子として RANKL と M-CSF をを用いた。
2. 細胞培養 : 細胞は、雄性マウス (C57BL6/J, 6 週齢) の大腿骨から分離・培養した樹状様細胞を BMMs として用いた (岡山大学動物実験委員会承認 : OKU-2016277)。培養は、10%ウシ胎児血清を含むイーグル最小必須培地 α 改変型培地 (MEM α) を用いて、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 下, 95% 湿潤下で行った。
3. RANKL 誘導性破骨細胞分化誘導の方法 : BMMs を 1.0×10^5 cells/cm² の密度で播種し、同時に RANKL (100 ng/mL) および M-CSF (100 ng/mL) を添加して分化誘導を行った。
4. (+)-terrein の細胞傷害性試験 : BMMs 播種と同時に(+)-terrein (0~1,000 μ M) を添加し、24 時間培養後、MTS 法を用いて検討した。

5. (+)-terreirin が破骨細胞分化に及ぼす影響の検討：分化誘導開始と同時に(+)-terreirin (10 μ M) を添加し、細胞播種から 5 日後に酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP) 染色を用いて評価した。なお、3 核以上有する破骨細胞を成熟破骨細胞とみなした。
6. (+)-terreirin が硬組織吸収能に及ぼす影響の検討：無機結晶性リン酸カルシウムがコーティングされたオステオアッセイ 96-well plate に BMMs を播種し、分化誘導開始と同時に(+)-terreirin (10 μ M) を添加した。細胞播種から 5 日後に画像解析ソフトを用いて 1 well あたりの吸収窩の面積を計測して、硬組織吸収能を評価した。
7. (+)-terreirin が NFATc1 の遺伝子発現に及ぼす影響の検討：分化誘導開始と同時に(+)-terreirin (10 μ M) を添加し、細胞播種から 1 日後に回収した全 RNA を用いて、NFATc1 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で評価した。
8. (+)-terreirin が NFATc1 のタンパク質産生に及ぼす影響の検討：分化誘導開始と同時に(+)-terreirin (10 μ M) を添加し、細胞播種から 2 日後に回収したタンパク質を用いて、NFATc1 のタンパク質産生量をウエスタンブロットティング法で評価した。
9. (+)-terreirin が破骨細胞の分化に影響を及ぼす時期の検討：(+)-terreirin (10 μ M) を、分化誘導と同時に添加した系 (時期①)、分化誘導開始後 24 時間後に添加した系 (時期②)、分化誘導開始後 48 時間後に添加した系 (時期③) において、細胞播種から 5 日後に TRAP 染色を用いて評価した。時期①と時期②においては、細胞播種から 2 日後に回収したタンパク質を用いて、NFATc1 のタンパク質産生量をウエスタンブロットティング法で評価した。
10. 統計解析：3 群間以上の差の検定には one-way analysis of variance (one-way ANOVA)、多重比較検定には Tukey/Kramer test を用いた。2 群間の検定には Student's *t*-test を用いた。p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. BMMs における(+)-terreirin の細胞傷害性：(+)-terreirin は 10 μ M 以下では細胞傷害性がみられなかった ($p < 0.05$)。
2. (+)-terreirin が破骨細胞分化および硬組織吸収能に及ぼす影響：(+)-terreirin (10 μ M) を破骨分化誘導開始と同時に添加すると、破骨細胞分化を抑制し ($p < 0.05$)、硬組織吸収能を抑制した ($p < 0.05$)。
3. (+)-terreirin が NFATc1 に及ぼす影響：(+)-terreirin (10 μ M) を破骨細胞分化開始と同時に添加すると、NFATc1 の遺伝子発現およびタンパク質産生は抑制された ($p < 0.05$)。
4. (+)-terreirin の作用時期が破骨細胞分化誘導に及ぼす影響：(+)-terreirin (10 μ M) を時期①、時期②、時期③で作用させた場合全てにおいて破骨細胞分化は抑制された ($p < 0.05$)。また、時期①、時期②において NFATc1 のタンパク質産生は抑制された ($p < 0.05$)。

【考察】

本研究において、(+)-terreirinはRANKL誘導性破骨細胞分化を抑制し、最終転写因子であるNFATc1の発現を抑制した。また、(+)-terreirinは分化誘導開始24, 48時間後に添加しても、破骨細胞分化を抑制し、分化誘導開始24時間後においてもNFATc1を抑制する可能性を示した。

(+)-terreirinは低分子化合物であることから、受容体を介さずに細胞膜を通過して細胞内に侵入する可能性がある。そのため、NFATc1に直接作用、もしくはそのシグナル上流因子に作用する可能性が示唆される。また、(+)-terreirinは分化誘導開始24時間後、48時間後に添加しても同様の作用効果を示したため、一度活性化されたNFATc1やNFATc1によって活性化される他の破骨細胞分化誘導シグナル因子に対して作用する可能性が示唆される。(+)terreirinは有機化学的に合成可能であり、破骨細胞分化機能を維持したまま、より副作用の少ない新たな誘導体を合成することが可能である。そのため、安価で簡便に内服可能な新規骨吸収抑制薬への応用が可能と考える。

今後は、RANKL誘導性シグナル経路における(+)-terreirinの標的因子の同定および、実験動物を用いた*in vivo*における(+)-terreirinの作用効果、そして重篤な副作用の有無の検討が必要である。超高齢社会が求める、副作用の少ない、新たな骨吸収抑制薬としての(+)-terreirinの可能性を今後さらに検討することが望まれる。

【結論】

(+)-terrein は BMMs において、RANKL 誘導性破骨細胞分化を抑制し、RANKL 誘導性破骨細胞分化シグナル経路の最終転写因子である NFATc1 の発現を抑制する可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

歯周炎が進行すると破骨細胞の過剰形成による病的な歯槽骨吸収が生じる。Receptor activator for NF- κ B ligand (RANKL) 誘導性シグナル経路は、破骨細胞分化の主要な調節機構であり、破骨細胞分化に必須の転写因子 nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1 (NFATc1) の発現を誘導することが報告されている。したがって、炎症性骨吸収を惹起する歯周炎の病態を制御するためには、NFATc1を介した破骨細胞分化機構を制御する手段を検討することが重要である。一方、現在用いられている破骨細胞を標的にした骨吸収抑制薬は、薬剤関連顎骨壊死などの重篤な副作用が報告されている。そのため、破骨細胞の機能制御作用を有し、かつ生体安全性に優れた新たな抗炎症性骨吸収抑制薬の開発が求められている。本研究では、真菌 *Aspergillus terreus* から二次代謝産物として分離された低分子化合物 (+)-terrein の効果に着眼し、RANKL誘導性破骨細胞分化に及ぼす作用を検討するとともに、NFATc1の発現への影響を検討し、(+)-terrein の骨代謝に及ぼす作用とその機序の解明を目的とした。実験には、マウス骨髄から採取・培養した骨髄由来マクロファージ (bone marrow derived macrophages : BMMs) を用いた (岡山大学動物実験委員会 : 承認番号OKU-2016277)。破骨細胞の分化誘導には、マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony stimulating factor : M-CSF) とRANKLを用いた。得られた結果は以下の通りである。

1) BMMs に対する(+)-terreinの細胞傷害性 :

10 μ M 以下の濃度の (+)-terrein は、培養 BMMs に対して細胞傷害性を示さなかった。

2) (+)-terrein が破骨細胞分化および硬組織吸収能に及ぼす影響 :

破骨細胞分化誘導開始と同時に 10 μ M (+)-terrein を添加すると、破骨細胞への分化を抑制し、硬組織吸収能を抑制した。

3) (+)-terrein がNFATc1に及ぼす影響 :

破骨細胞分化誘導開始と同時に 10 μ M (+)-terrein を添加すると、NFATc1のmRNA発現およびタンパク質産生は抑制された。

4) (+)-terrein の作用時期が破骨細胞分化誘導に及ぼす影響 :

破骨細胞分化誘導開始したのち、24, 48時間経過後に 10 μ M (+)-terrein を添加した場合もNFATc1の発現および破骨細胞の分化を抑制した。

以上のことから、(+)-terrein は骨髄由来マクロファージにおいて、NFATc1の発現を阻害することで、RANKL 誘導性破骨細胞分化を抑制する可能性が示された。

本研究で得られた結果は、新たな抗炎症性骨吸収抑制薬としての (+)-terrein の有効性の一部を解明したものであり、今後の歯周病をはじめとする骨代謝疾患の克服に寄与すると考えられる。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認めた。