HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Rosmarinic acid and arbutin suppress osteoclast differentiation by inhibiting superoxide and NFATc1 downregulation in RAW264.7 cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大森, 晶奈
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11265号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56251
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Akina_Ohmori_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏名　大　森　晶　奈

主査　教授　鈴木　邦明
審査担当者　副査　教授　田村　正人
副査　教授　網塚　憲生

学位論文題名
ロスマリン酸とアルブチンはスーパーオキシド除去作用と NFATc1 の発現抑制によって RAW264.7 細胞からの破骨細胞分化を抑制する

審査は審査担当者が一同に会して約 1 時間かけて行った。まず申請者に本論文の概要の説明を求め、口頭試問形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

【目的】ポリフェノールは植物の色素や苦み成分であり、分子内に複数のフェノール性水酸基を有している。この構造は活性酸素除去作用を示すことから、様々な慢性疾患の予防効果が期待されている。また近年では、骨粗鬆症に有効であることが報告されている。ロスマリン酸(Ra)とアルブチン(Ab)はポリフェノールの一種であるが、骨への影響に関してほとんど報告されていない。本研究では Ra と Ab が破骨細胞分化誘導系に与える影響について検討した。
【材料と方法】RAW264.7 (RAW)細胞を RANKL 含有培養液を用いて、実験群には種々濃度の Ra もしくは Ab を添加し、一定期間培養した。TRAP 染色にて破骨細胞(2 核以上)数および巨大破骨細胞(8 核以上)数を測定した。さらに各種キットを用いて、細胞毒性試験、細胞内外のスーパーオキシド量ならびにスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性を測定した。破骨細胞関連遺伝子の発現量の変化はリアルタイム PCR にて解析し、吸収能への影響は pit assay にて観察した。
【結果】Ra と Ab は、濃度依存的に TRAP 陽性破骨細胞数および巨大破骨細胞数を減少させた。また、破骨細胞を抑制できる濃度において、破骨細胞前駆細胞である RAW 細胞の生存率に影響を与えなかった。さらに Ra と Ab は、細胞内および培養液中に産生されたスーパーオキシド量を濃度依存的に減少させた。また、SOD 活性には影響を示さなかった。破骨細胞関連遺伝子(NFATc1、TRAP、MMP-9、cathepsin-K)の mRNA 発現量は有意に減少した。さらにリン酸カルシウムの吸収面積も Ra と Ab の濃度依存的に減少した。

【考察】近年、活性酸素種(ROS)は破骨細胞分化の必須因子であることが明らかになっている。本研究において、Ra と Ab はスーパーオキシドの除去酵素である SOD 活性に影響を与えることなく、細胞内および培養液中に産生されたスーパーオキシド量を濃度依存的に減少させた。ポリフェノールの有する水酸基はスーパーオキシドを含めた ROS の不対電子を除去することが明らかになっていることから、本研究においても Ra と Ab の有する水酸基が細胞内外のスーパーオキシドを除去したことが示唆された。また、スーパーオキシドはヒドロキシラジカルや過酸化水素などの様々な ROS の発生源になっており、破骨細胞数の減少はスーパーオキシドの抑制により、相対的な ROS が抑制されたためであることが示唆された。また本研究では、Ra と Ab によって、破骨細胞の分化のマスター遺伝子である NFATc1 の mRNA 発現量は有意に減少した。さらに、NFATc1 によって制御される破骨細胞のマーカー遺伝子である TRAP、骨吸収因子である MMP-9 ならびに cathepsin-K の発現量も有意に減少した。これらの遺伝子の発現抑制により、破骨細胞の吸収活性も低下したことが示唆された。また、Ra と Ab は破骨細胞前駆細胞である RAW 細胞の生存率に影響を与えることなく、Ra と Ab の濃度依存的に破骨細胞数および巨大破骨細胞数を減少させた。この結果より、Ra と Ab は骨粗鬆症の予防および治療の補助作用があることが示唆されたが、臨床的な応用にはさらなる研究が必要である。
【結論】Ra と Ab により破骨細胞の分化が抑制された。これは、Ra と Ab の有する水酸基が、破骨細胞の分化過程におけるスーパーオキシドを含めた活性酸素種を除去したために、破骨細胞の分化ならびに骨吸収が抑制されたことによることが示唆された。

以上の論述に対して、各審査委員が行った主な質問は、以下の通りである。
１）Ra と Ab の骨芽細胞への効果について
２）ポリフェノールの水酸基とスーパーオキシドに対する反応機序について
３）Ra と Ab の破骨細胞内への取り込みについて
４）Ra と Ab を経口的に摂取した時の血中濃度ならびに代謝について
５）本研究の今後の方向性について

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答と説明が得られ、関連する分野に関しても十分な知識を有していると認めた。さらに今後の研究の発展性についても明確な展望を持っていると判定した。
以上のことから、審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。