HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Lactoferrin directly suppresses osteoclastogenesis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	加藤, 展教
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12153号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62139
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiromichi_Kato_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　加　藤　展　教

学　位　論　文　題　名

Lactoferrin directly suppresses osteoclastogenesis

（ラクトフェリンは破骨細胞の分化誘導を直接抑制する）

【緒言】ラクトフェリンは生体内に元来存在し、抗菌作用、抗炎症作用、骨形成作用、抗がん作用など多くの働きを持つ糖タンパク質である。近年、ラクトフェリンが骨芽細胞に作用し、RANKL の発現を抑制することで破骨細胞の分化誘導を間接的に抑制することが報告されているが、ラクトフェリンが直接的に破骨細胞への分化誘導過程にどの様な影響を与えるのかに関しての報告はない。本研究では、破骨細胞の分化誘導過程におけるラクトフェリンの直接的な影響を検討することを目的とした。

【材料と方法】マウス腹水由来の単球マクロファージである RAW264.7 細胞を RANKL 添加培養液を用いて、24 穴プレートで 6 日間培養した。培養 1、3、5 日目にラクトフェリン（濃度 1、10、25、100 μg/ml）をそれぞれ 10 μl 添加した。対照群では PBS を 10 μl 添加した。培養終了後 TRAP 染色にて、総破骨細胞（2 核以上）数、核数別の破骨細胞（2～7 核、8 核以上）数を測定した。また、同様の実験を表面をリン酸カルシウムコーティングされたプレートを用いて行い、破骨細胞による吸収窩を観察した。

ラクトフェリンが破骨細胞分化誘導過程のどの時期に作用しているのかを検討するため、ラクトフェリン濃度を 25 μg/ml とし、培養 1 日目のみ添加、3 日目のみ、5 日目のみ、1 日目と 3 日目、1 日目と 5 日目、3 日目と 5 日目、1 日目と 3 日目と 5 日目（培養期間全て添加）および無添加と、ラクトフェリン添加の場合分けを行った。6 日間培養後 TRAP 染色にて、総破骨細胞数、および核数別の破骨細胞数を測定した。

ラクトフェリンの RAW264.7 細胞に対する細胞毒性を検討するため、RANKL 無添加培養液を用いてラクトフェリン添加の場合分けを行い、6 日間培養した。培養終了後、細胞に CCK8 を加えマイクロプレートリーダーで生細胞数を測定した。

ラクトフェリンによる破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現状況を確認するため、ラクトフェリン添加 3、6、12、24 および 48 時間後に RNA を回収し、リアルタ

イム PCR 法を用いて破骨細胞のマスタースイッチである nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 (NFATc1)、破骨細胞のマーカー遺伝子である receptor activator of nuclear factor-κB (RANK)、細胞融合に関わる dendritic cell specific transmembrane protein (DC-STAMP)および osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP)の発現量を測定した。

【結果】RAW264.7 細胞を RANKL 添加培養液を用いて、各種濃度のラクトフェリンを添加し、6 日間培養した結果、ラクトフェリンの濃度依存的に総破骨細胞数は減少し、各核数別の、破骨細胞数も減少した。ラクトフェリンを 100 μg/ml 加えて培養した場合では、破骨細胞の分化誘導はほぼ完全に抑制された。また、破骨細胞による吸収窩を比較した結果、ラクトフェリンの濃度依存的に吸収窩の割合は減少した。

ラクトフェリン添加の場合分けの結果、培養 1 日目のみ、1 日目と 3 日目、1 日目と 5 日目および 1 日目と 3 日目と 5 日目にラクトフェリンを添加した場合、無添加群と比較して総破骨細胞数は有意に抑制され、また、8 核以上の巨大破骨細胞数も有意に減少した。

RAW264.7 細胞を RANKL 無添加で培養し、ラクトフェリン添加の場合分けを行った結果、生細胞数の有意な差は認められなかった。

NFATc1 および RANK の mRNA 発現量は RANKL およびラクトフェリンの添加後 6、12、24 時間において有意に抑制が認められた。さらに、破骨細胞の細胞融合に必須の遺伝子である DC-STAMP および OC-STAMP の mRNA 発現量は、RANKL およびラクトフェリン添加後 12 時間および 48 時間では有意に減少が認められた。

【考察】ラクトフェリンは、破骨細胞の分化誘導を骨芽細胞等を介して間接的に抑制していることが報告されている。これは、ラクトフェリンが骨芽細胞に作用し RANKL の発現を抑制し、また抗炎症作用により TNF-α等の産生を抑制することで、炎症性サイトカインの刺激によって誘導される RANKL の発現も抑制する結果である。そこで、破骨細胞分化誘導過程に直接ラクトフェリンを作用させた場合、破骨細胞の分化誘導にどのような影響を与えるかについて検討した。ラクトフェリンの濃度依存的に総破骨細胞数が減少し、核数別でみても、2～7 核の各破骨細胞数と 8 核以上の巨大破骨細胞数がともに減少したことから、ラクトフェリンは直接的に破骨細胞の分化誘導を抑制し、かつ多核化も抑制していることが示唆された。また吸収窩面積もラクトフェリンの濃度依存的に減少したことから、ラクトフェリンは骨吸収を抑制することが示唆された。ラク

トフェリン添加の場合分けの結果より、培養１日目にラクトフェリンを作用させた場合に、総破骨細胞数と 2〜7 核および 8 核以上の破骨細胞数の有意な減少が認められた。従って、ラクトフェリンが直接的に破骨細胞の分化誘導に影響を与えるのは、RAW264.7 細胞が破骨細胞への分化を開始する RANKL 添加 48 時間以内であることが示唆された。また、ラクトフェリンが RAW264.7 細胞に毒性を持つことで、破骨細胞数が減少した可能性も考えられたため、RAW264.7 細胞を RANKL 無添加で培養しラクトフェリンを作用させた結果、生細胞数の有意な差は認められなかった。従って、ラクトフェリンは RAW264.7 細胞に対して毒性を持たないことが認められた。この結果から、単球系細胞の破骨細胞への分化誘導過程においてラクトフェリンが作用し、破骨細胞への分化を抑制し、単球系細胞には影響を与えないことが示唆された。

破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量について計測した結果、マスタースイッチである NFATc1、破骨細胞のマーカー遺伝子である RANK の mRNA 発現量が RANKL 作用後 48 時間の間で減少した。このことからラクトフェリンは RANKL により破骨細胞への分化が開始した 48 時間以内において、破骨細胞関連遺伝子の発現量を減少させ、破骨細胞の分化誘導を抑制していることが示唆された。また、DC-STAMP および OC-STAMP の mRNA 発現量は、ラクトフェリン添加後 12 時間から 48 時間において減少が認められたことから、ラクトフェリンは破骨細胞の融合も抑制していることが示唆された。

【結論】以上の結果より、ラクトフェリンは破骨細胞への分化開始 48 時間以内に作用させた場合、破骨細胞関連遺伝子の発現を抑制し、直接的に破骨細胞の分化誘導を抑制し、破骨細胞前駆細胞に影響を与えないことが示唆され、骨粗鬆症予防薬としての可能性が示唆された。