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_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　加藤　展教

審 査 担 当 者
主査　教授　山崎　裕
副査　教授　鈴木　邦明
副査　教授　土門　卓文
副査　准教授　吉村　善隆

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）

審査は,審査担当者全員の出席の下,はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ,審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

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。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。

RAW264.7細胞をRANKL添加培養液を用いて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。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。次に,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。

さらに破骨細胞関連遺伝子のmRNA発現状況を確認するため,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NFATc1,破骨細胞のマーカー遺伝子であるRANK,細胞融合に関わるDC-STAMPおよびOC-STAMPの発現量を測定した。

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,RAW264.7細胞を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,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。

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。

以上より,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。

引き続き論文内容及び関連事項について,以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

1) ラクトフェリンに注目することに至った理由について。
2) 核数別の破骨細胞数において２核が多い理由について。
3) 破骨細胞の核数による機能の違いについて。
4) ラクトフェリンの体内での代謝方法について。
5) 体内におけるラクトフェリンと同様の働きを持つ物質について。
6) 牛乳におけるラクトフェリンの濃度と今回の研究における濃度の比較について。
7) ラクトフェリンの歯科的な臨床応用の今後の展開について。
8) 骨芽細胞の破骨細胞への間接的な抑制のメカニズムについて。

以上の質問に対して申請者から適切かつ明確な回答が得られた。審査担当者との質疑応答を通じて,申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分なされており,幅広い知識を有し,本研究のさらなる発展が期待された。

以上のことから,審査委員会は全員,本研究が学位論文に十分に値し,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。