



Title	エダラボンは破骨細胞の分化誘導を抑制する [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	大西, 香織
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13859号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78200
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kaori_Onishi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 大西 香織

学 位 論 文 題 名
エ达拉ボンは破骨細胞の分化誘導を抑制する

キーワード（5つ）エ达拉ボン，抗酸化作用，破骨細胞，破骨細胞分化誘導，RAW264.7 細胞

超高齢社会となった現在，骨粗鬆症による骨密度の低下が原因で惹起される骨折を予防することが，高齢者の健康寿命を延伸し Quality of life（QOL）を高めると考えられる．近年，骨粗鬆症の治療薬としてビスフォスフォネート（BP）製剤が使用されているが，ビスフォスフォネート関連顎骨壊死（BRONJ）が問題視されるようになった．現在では BRONJ と同様な顎骨壊死を引き起こす可能性があるデノスマブや血管新生阻害作用を持つ抗がん剤も注目されており，薬剤関連顎骨壊死（MRONJ）と呼ばれている．

骨粗鬆症は骨形成と骨吸収のバランスが不均衡となり，相対的に骨吸収が加速された結果であるが，その骨のリモデリングに関与している細胞の1つが破骨細胞である．副作用なく破骨細胞の分化誘導を制御することが出来れば，より安全に骨粗鬆症を予防することが可能となる．

本研究では急性期の脳梗塞に対し既に臨床応用されているエ达拉ボンに注目し

た．エ达拉ボンは点滴静注される世界初の脳保護剤として使用されている．エ达拉ボンは脳梗塞の急性期に投与すると酸化される対象が脳神経ではなく，エ达拉ボンとなることで脳神経を間接的に保護する抗酸化物質である．しかし，エ达拉ボンの破骨細胞の分化誘導に与える影響についての報告はない．本研究は RAW264.7 細胞（RAW 細胞）を用いて破骨細胞分化誘導系に対するエ达拉ボンの作用を明らかにするとともに，それが破骨細胞の分化誘導過程のどの時期に作用するのかを検証した．

まず，エ达拉ボン無添加で破骨細胞数の変化を観察した．50 ng/ml RANKL を添加した RAW 細胞は破骨細胞へ分化誘導され，RANKL 添加日を 1 日目とした場合，2, 3 日目から少数核の破骨細胞が少数観察されるようになり，その後，総破骨細胞数，核数別の総破骨細胞数とも 4 日目から顕著に増加，5 日目を最大とし，その後減少した．したがって，本実験では破骨細胞の分化・融合が最大となった 5 日目を上限とした．破骨細胞は分化・融合が完了した後はアポトーシスにより消滅することが報告されている．アポトーシスの影響を受けない期間で実験を進めた．

次に，RANKL 無添加の RAW 細胞に各濃度のエ达拉ボン（10, 25, 50, 75, 100 μ M）を添加し，生存細胞数の測定を行った．エ达拉ボンの濃度が 75 μ M 以下では Control 群と比較し RAW 細胞の生存細胞数に有意差を示さなかったため，濃度を 50 μ M, 75 μ M に設定し実験を進めた．

また，破骨細胞分化誘導系のどの時期にエ达拉ボンを添加すると，より高い効果が得られるのかを検証するために，RANKL 添加日を 1 日目とした場合，エ达拉ボンの添加を 1 日目と 3 日目の両日（A 群），1 日目のみ（B 群），3 日目のみ（C 群）と日程を場合分けした．50 μ M エ达拉ボン添加により，A, B, C 群ともに Control 群と比較し有意に総破骨細胞数が減少した．75 μ M エ达拉ボンの添加では，A 群で総破骨細胞数が有意に減少せず，8 核以上の巨大破骨細胞数は減少したものの，少

数核（2~7 核）の破骨細胞数には有意差が認められなかった．これは 50 μ M エ达拉ボンが破骨細胞の分化誘導を抑制する最適濃度であり，それ以上に濃度が高い 75 μ M エ达拉ボンでは破骨細胞の分化誘導抑制に最適な条件範囲を逸脱し，分化誘導が抑制されなかった可能性が考えられる．これらエ达拉ボン添加後の破骨細胞数の結果から，エ达拉ボンの濃度を 50 μ M に設定し，以下の実験を行った．

50 μ M エ达拉ボン添加後の A, B, C 群間で総破骨細胞数を比較すると Control 群と比較し A, B 群では有意に総破骨細胞数が減少したが，C 群では有意差を認めなかった．したがって，RANKL 添加後，48 時間以内にエ达拉ボンを添加することで，より大きな作用が得られることが示唆された．また，核数別の破骨細胞数の計測においては，A, B 群では 2~7 核の少数核の破骨細胞数と 8 核以上の巨大破骨細胞数ともに有意な減少を認め，C 群では 8 核以上の巨大破骨細胞数においてのみ有意な減少を認めた．したがって，RANKL 添加後，48 時間以内にエ达拉ボンを投与した場合，破骨細胞分化誘導過程の初期から後期にかけて分化誘導の抑制作用が発現していること，一方，48 時間以降であった場合には，すでに分化誘導されつつある破骨細胞の巨大化のみを抑制することが示唆された．

Real-time-PCR 法による破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量の検証においては，エ达拉ボンを添加して 3, 6, 12, 24, 48 時間後の DC-STAMP, OC-STAMP, NFATc1, Cathepsin K, RANK, TRAP, Syncytin-A の mRNA 発現量を検証した．RANKL は破骨細胞特有のマーカーでもある RANK と特異的に結合すると，NF- κ B や MAPKs などのシグナル伝達を刺激し，これらの経路が破骨細胞の分化誘導過程のマスタースイッチである NFATc1 と相互作用する．NFATc1 は破骨細胞特有のマーカーである TRAP や Cathepsin K の表出を制御しており，また破骨細胞融合因子であり破骨細胞の形成や分化を促進させるタンパク質である DC-STAMP や OC-STAMP による破骨細胞の多核化にも関与している．

RANKL の添加により発現した RANK は Control 群と比較しエ达拉ボンの添加 3, 6 時間後に有意に減少した. NFATc1 は Control 群と比較しエ达拉ボンの添加 3, 6, 12, 48 時間後に有意に減少した. TRAP は Control 群と比較しエ达拉ボンの添加 3, 6 時間後に有意に減少し, その後増加した. Cathepsin K は Control 群と比較しエ达拉ボンの添加 6, 12, 24 時間で有意に減少した. DC-STAMP はいずれの時間においても有意差を認めなかった一方で, OC-STAMP は Control 群と比較しエ达拉ボンの添加 6 時間後に有意に減少した. Syncytin-A はいずれの時間においても有意差を認めなかった. エ达拉ボンの添加により多核の破骨細胞同士の融合は抑制されたことから, エ达拉ボンは DC-STAMP, OC-STAMP, Syncytin-A 以外の因子により多核の破骨細胞同士の融合を抑制していることが示唆された.

エ达拉ボンは最も強力な酸化力を有するフリーラジカル種であるヒドロキシルラジカルのみならず, 酸化力の強い他のフリーラジカルも消去し, 幅広い抗酸化活性を有することが示唆されている. アラキドン酸代謝系や一酸化窒素合成酵素などのフリーラジカル産生系が脳内に存在すること, また脳虚血もしくは脳血流再開通時に活性化したフリーラジカルが産生され, 脳神経の酸化障害が引き起こされることが報告されている. このフリーラジカルスカベンジャーであるエ达拉ボンの抗酸化活性により, 破骨細胞内のフリーラジカルが捕捉されたことにより分化誘導が抑制されたのではないかと考えられる.

以上より, エ达拉ボンの投与が RANKL 添加後, 48 時間以内であった場合, エ达拉ボンにより破骨細胞分化関連因子が抑制されることにより, 破骨細胞の分化誘導が分化初期から後期にかけて抑制される可能性が示唆された.