HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	スダチチ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)	蓑崎, 誠治
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13865号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78216
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Seiji_Hegozaki_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　蔓　崎　誠　治

学　位　論　文　題　名
スダチチンは破骨細胞の分化誘導を抑制する

キーワード（５つ）スダチチン，ポリメトキシフラボノイド，抗酸化作用，破骨細胞，RAW264.7 細胞

超高齢社会において，骨粗鬆症などの骨疾患の患者数は増加しており，骨折による寝たきりなどといったQuality of life（QOL）の低下が問題となっている．骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返し，骨のリモデリングを営むことにより形態や機能を維持している．しかし，骨のリモデリングのバランスが様々な因子の原因で崩れることにより，破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上回り，骨粗鬆症などの骨量が減少する疾患へとつながる．そのため，破骨細胞は骨疾患の治療における標的細胞として注目されており，破骨細胞抑制の機能を有する安全性の高い治療薬の開発が期待されている．

破骨細胞は造血幹細胞から分化した単球・マクロファージ系の骨の吸収能を持つ多核巨細胞であり，単核の破骨細胞前駆細胞同士の融合により形成され，様々な融合因子を発現しながら活性化した多核の成熟破骨細胞へと成長する．最近の研究では，抗酸化物質が破骨細胞形成を抑制することが報告され，抗酸化物質による破骨細胞への影響が注目されている．

近年，香酸柑橘類であるスダチの果皮から，ポリメトキシフラボノイドの一つであるスダチチンが発見された．そして，これまでに強力な抗酸化作用を始め，様々な生理活性があることが報告されているが，破骨細胞の分化誘導系において破骨細胞の動態を確認した報告はない．本研究では，スダチチン投与後の破骨細胞数を核数別に測定することで，スダチチンが破骨細胞の分化誘導系に与える影響を検討することを目的とした．また，Real-time-PCR を用いて破骨細胞関連遺伝子の発現に対するスダチチンの影響を検討した．

初めに，単球マクロファージ系の細胞である RAW264.7 細胞が破骨細胞へ分化する経時的変化を観察するため，分化誘導培地にて培養 7 日目まで分化誘導させた．その結果，破骨細胞は，2，3 日目から少量観察されるようになり，5 日目には全ての核数において最大となり 6，7 日目の間に減少傾向を示した．そのため，本実験系においては培養 5 日目を上限とし実験を行った．また，培養 1，2 日目を分化初期，3，4 日目を分化中期，5 日目を分化後期とした．

次に，スダチチンの濃度を設定するために，RAW 細胞内 ATP の生物発光を検出した．スダチチン濃度が10μM以上の場合，有意に生存細胞数は低下したため，スダチチン濃度を 7.5μM に設定した．そこで，スダチチンが破骨細胞の分化誘導のどの時期で作用するか比較検討した．分化誘導培地にてスダチチンを培養 1 日目，3 日目ともに投与したA群，スダチチンを培養1日目のみに投与したB群，スダチチンを培養3日目のみに投与したC群，とスダチチンを添加する日数に場合分けを行い，5 日後，同様に総破骨細胞数および核数別の破骨細胞数を計測した．総破骨細胞数では，A，B，C 群のいずれも Control 群と比較し，破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した．また，A 群は B，C 群と比較し，破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した．核数別の破骨細胞数では，A 群は Control 群と比較し，すべての核において破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した．また，B，C 群では Control 群と比較すると，8

核以上ではどちらも破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した．さらに，8 核以上では B 群と比較し C 群の方が有意に抑制した．このことから，スダチチンは破骨細胞の分化誘導過程において特に 48 時間(3 日目)以降に作用していることが示唆された．また，核数別に比較すると8核以上の破骨細胞が顕著に抑制されていたことからスダチチンは破骨細胞の多核化を主に抑制していることが示唆された．

そこで，破骨細胞関連遺伝子の発現に対するスダチチンの影響を検討するために mRNA 発現量を Real-time-PCR 法にて定量し，破骨細胞関連遺伝子ついて検討した．NFATc-1 は Control 群と比較し，スダチチン添加後 1 時間後,3 時間後の場合，有意に発現量の減少を認めた．これは NFATc-1 が破骨細胞分化初期に RANK シグナルによって発現レベルが上昇するためと示唆された．破骨細胞前駆細胞が発現する RANK は Control 群と比較し，スダチチン投与 1 時間後，3 時間後，6 時間後，24 時間後と分化初期に有意に発現量の減少を認めた．RANKL が RANK に結合すると RANK/RANKL のシグナルが細胞内に伝達され，破骨細胞への分化が強く誘導される．破骨細胞前駆細胞は分化後期には少なく，相対的に RANK は分化初期に発現量が多いことが示唆される．よって RANK の発現量が減少したことは，スダチチンが破骨細胞の分化初期に作用していることが示唆された．TRAP は，Control 群と比較し，スダチチン投与 24 時間後，96 時間後と分化初期から後期にかけて有意に発現量の減少を認めた．TRAP は破骨細胞のマーカー遺伝子であり，破骨細胞の増減に関与している．CD47 は Control 群と比較し，スダチチン投与 12 時間後，24 時間後と分化初期の場合，有意に発現量の減少を認めた．CD47 は単核の前破骨細胞を含む細胞融合を促進すると報告されているため，今回の結果においても分化初期に発現量が減少したと示唆される．抗酸化物質は ROS の生成と破骨細胞形成を抑制することが報告されており，抗酸化物質による破骨細胞への影響が注目されている．破骨細胞の形成や機能には ROS が不可欠であり，RANKL 刺激により破骨細胞前駆細胞

内 ROS 濃度は上昇し，ROS は破骨細胞分化を制御すると報告されている．このことからも抗酸化物質であるスダチチンはROS濃度を低下させて破骨細胞分化初期にも作用していることが考えられる．

細胞融合に関与しているDC-STAMPにおいては，Control群と比較し，いずれの時間でも今回は有意差を認めなかった．逆にOC-STAMPは，Control群と比較し，スダチチン投与24時間後，96時間後と分化初期から後期にかけても有意に発現量の減少を認めた．OC-STAMP は破骨細胞の多数核の融合に関与していることが報告されている．そのため，スダチチンは破骨細胞融合における多核化も有意に抑制していることが示唆された．DC-STAMP および OC-STAMP は RANKL 刺激によって誘導され，NFATc1 によって制御されており，破骨細胞の形成と分化を促進している．どちらも7回膜貫通型タンパク質であり構造上非常に似ていることが報告されている．しかし，DC-STAMP は OC-STAMP 欠損単核破骨細胞でも発現し，逆に OC-STAMP は DC-STAMP 欠損単核破骨細胞でも通常発現する．つまり DC-STAMP および OC-STAMP は互いの発現を調節しないことが報告されている．今回，スダチチンは破骨細胞の分化誘導系においてDC-STAMPには作用せず，OC-STAMPのみに作用したと示唆されるが，その機序においては今後の研究課題である．

以上の結果より，Real-time-PCR法ではスダチチンは破骨細胞の分化誘導系の初期から後期にかけて作用するが，破骨細胞数測定の結果から特に中期(3日目以降)から後期にかけて8核以上の巨大破骨細胞の分化・融合を抑制していることが示唆された．