

氏名	坂井田 京佑		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第6363号		
学位授与の日付	令和3年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	骨粗鬆症モデルマウスにおける真菌二次代謝産物(+)-Terrein が骨代謝に及ぼす影響		
論文審査委員	岡元 邦彰 教授	上岡 寛 教授	西田 崇 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

超高齢社会を迎えた日本では骨粗鬆症患者数は約1,300万人に達し、病的骨折リスクの低下を目的とした医療を提供することが喫緊の課題である。一方、骨粗鬆症治療薬として主に用いられるビスフォスフォネート製剤等には顎骨壊死の副作用が多数報告されている。近年、8020運動の効果もあり、多数の歯を保有する高齢者数は激増しており、同剤を使用中の高齢者に対する歯科治療の機会が増加している。そのため、顎骨壊死のリスクのない生体に優しい新たな骨粗鬆症治療薬の開発が望まれている。

我々は、真菌 *Aspergillus terreus* が産生する二次代謝産物(+)-Terrein の抗炎症効果に着目して研究を進めている。これまでに、①(+)-Terrein の有機化学的大量合成経路の確立、② Interleukin (IL) -6 誘導性の血管内皮細胞増殖因子の分泌抑制効果、③ receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 誘導性破骨細胞分化に対する抑制効果を報告した。そして、(+)-Terrein の骨破壊疾患治療薬としての応用を検討しているが、(+)-Terrein の骨代謝に及ぼす機序は未だ不明な点が多い。

本研究では、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウス (OVX マウス) を用いて、(+)-Terrein の大腿骨頭部海綿骨の骨代謝に及ぼす影響を X 線学的および組織学的に検討するとともに、マウス骨髄由来マクロファージ様細胞 (mBMMs) を用いて、(+)-Terrein の RANKL シグナル伝達系に及ぼす影響を検討した。さらに、マウス頭蓋冠由来細胞 (MC3T3-E1 細胞) を用いて、(+)-Terrein の骨芽細胞の分化に及ぼす影響について評価した。

【材料と方法】

1. 試薬：(+)-Terrein は L-酒石酸から合成したものをを用いた (岡山大学大学院自然科学研究科・萬代大樹博士 [現岐阜医療科学大学保健科学部臨床検査学科] から提供を受けた)。
2. マウス骨粗鬆症モデルの作成：8 週齢の C57BL/6 野生型雌性マウスの両側卵巣摘出術を行い、OVX マウスを作成し、10 週齢時から(+)-Terrein, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS), ゴレドロン酸水和物 (ZOL) を腹腔内に投与した。また、卵巣摘出術に対する陰性対照として sham (偽手術) マウスを設けた。
3. 画像解析：マイクロ CT (computed tomography) 解析を用いて、骨密度 (BMD, mg/cm³), 骨量 (BV/TV, %), 骨梁数 (Tb.N, / μ m), 骨梁空隙 (Tb.Sp, μ m) をそれぞれ測定した。
4. 組織学的解析：ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin : HE) 染色, 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP) 染色および免疫組織化学 (immunohistochemistry : IHC) 染色 (抗 cathepsin-K 抗体) を用い、組織像を観察した。
5. 血清中炎症性サイトカイン濃度の解析：血液を採取後に遠心分離を行い、血清を回収した。ELISA 法 (enzyme-linked immunosorbent assay) を用いて、血清中 TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCS-F の濃度を定量した。
6. 細胞培養：mBMMs と MC3T3-E1 細胞は 10%ウシ胎児血清を含む MEM α を用いて既知の方法で培養し、実験に供した。
7. (+)-Terrein が PKC のタンパク質リン酸化に及ぼす影響の検討：(+)-Terrein が RANKL シグナル伝達系における protein kinase-C (PKC) のタンパク質リン酸化に及ぼす影響について、ウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

8. (+)-Terrein が破骨細胞分化因子の遺伝子発現に及ぼす影響の検討：(+)-Terrein が破骨細胞分化因子の遺伝子発現に及ぼす影響について、リアルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現量を定量し検討した。
9. (+)-Terrein が骨芽細胞の分化に及ぼす影響の検討：アリザリンレッド染色、アルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase : ALP) 染色および IHC 染色 (抗 ALP 抗体) を用い、細胞活性および組織中の ALP 陽性細胞像を観察した。
10. 統計解析：2 群間の差の検定には Student's *t*-test を用いた。3 群間以上の差の検定には one-way analysis of variance, 多重比較検定には Tukey-Kramer test を用いた。p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. マイクロ CT による大腿骨吸収の評価：(+)-Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、BMD, BV/TV, Tb.N はそれぞれ 7 %, 239 %, 130 % 増加したが、Tb.Sp は 17 % 減少した ($p < 0.01$)。すなわち、OVX マウスにおいて(+)-Terrein は大腿骨吸収を有意に抑制した。
2. 破骨細胞分化の評価：HE 染色において、PBS を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した sham マウスに対して、成長板直下の大腿骨吸収が観察された。TRAP 染色において、(+)-Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、破骨細胞数が有意に抑制された ($p < 0.01$)。IHC 染色において、(+)-Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、cathepsin-K 陽性細胞数が有意に抑制された ($p < 0.01$)。
3. OVX マウスの体重変動および炎症性サイトカイン濃度の評価：投与期間中、各群間で体重変動に有意な差はなかった。また(+)-Terrein を投与した OVX マウスと、PBS を投与した OVX マウスとの間には TNF- α , IL-1 β , M-CSF の血清中濃度に差はなかった。なお、ZOL を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、TNF- α , IL-1 β , M-CSF の血清中濃度が有意に増加した。 ($p < 0.05$)。
4. (+)-Terrein がリン酸化 PKC α / β II の発現に及ぼす影響：mBMMs に RANKL を添加すると、添加 30 分後に PKC α / β II タンパク質のリン酸化が強く誘導された。一方、(+)-Terrein 投与群では PKC α / β II タンパク質のリン酸化が有意に抑制された ($p < 0.05$)。なお、(+)-Terrein は PKC α のタンパク質発現には影響を及ぼさず、PKC δ のタンパク質のリン酸化にも影響を及ぼさなかった。
5. (+)-Terrein が破骨細胞分化因子の発現に及ぼす影響：(+)-Terrein は、RANKL を添加した mBMMs において、*Ocstamp*, *Dcstamp*, *Calcr*, *Atp6v0d2*, *Oscar*, *Itgb3* の mRNA 発現を有意に抑制した ($p < 0.01$)。
6. (+)-Terrein が骨芽細胞の分化に及ぼす影響：MC3T3-E1 細胞に(+)-Terrein を投与したところアリザリンレッド染色、ALP 染色ともに非投与群と比較して発色に大きな差はなく、活性も促進しなかった。

【考察】

本研究の結果から、(+)-Terrein が、mBMMs において、RANKL 誘導性の PKC $\cdot\cdot\cdot$ II のタンパク質リン酸化および破骨細胞分化因子である *Ocstamp*, *Dcstamp*, *Calcr*, *Atp6v0d2*, *Oscar*, *Itgb3* の mRNA 発現を抑制することが明らかとなった。また、OVX マウスにおいて破骨細胞の分化を抑制し、大腿骨吸収抑制作用を有することが明らかになった。さらに、(+)-Terrein は骨芽細胞の分化に影響を及ぼさないことも明らかになった。

先行研究にて、(+)-Terrein が NFATc1 とその下流の骨吸収関連遺伝子の発現を阻害し、RANKL 誘導性破骨細胞分化と骨吸収を抑制する一方、(+)-Terrein は RANKL による NF- κ B, MAPKs (ERK1/2 および p38MAPK) のリン酸化を抑制しないことが明らかになっている。本研究では、(+)-Terrein が RANKL によって誘導される Ca²⁺/カルシニューリンシグナル伝達経路に存在する古典的な PKC 経路の一つである PKC $\cdot\cdot\cdot$ II のタンパク質のリン酸化を抑制することを明らかにした。破骨細胞分化の新たな阻害メカニズムの解明につながる可能性がある。

本研究において、(+)-Terrein 投与マウス群と非投与マウス群との間で体重変化に大きな差が無いことを確認した。一方、血清中の炎症性サイトカイン量は、既存のビスフォスフォネート製剤の一つである ZOL を投与すると、TNF- \cdot , IL-1 \cdot , M-CSF の産生が有意に亢進したが、(+)-Terrein を投与しても血清中の炎症性サイトカインの産生は亢進しなかった。すなわち、(+)-Terrein は ZOL に比べて生体に対する毒性という観点から安全性が高い可能性が示唆される。

今後、(+)-Terrein の骨破壊疾患への治療薬として応用するためには、ビスフォスフォネート製剤などの既存の骨粗鬆症治療薬と比較して、(+)-Terrein の有効性を証明する必要がある。ビスフォスフォネート製剤の半減期の長さは、骨粗鬆症治療における問題点の一つである。また、過度な骨硬化は、逆に骨折のリスクが高まる。(+)-Terrein は低分子化合物であるため、ビスフォスフォネート製剤よりも半減期が短い可能性が考えられる。そのため、初期の骨粗鬆症患者では、骨硬化を過度に増加させるリスクがあるビスフォスフォネート製剤を投与するのではなく、適度に骨吸収抑制効果が期待される(+)-Terrein を投与する、という新たな治療戦略への応用が期待される。今後は、実用化を検討する上で(+)-Terrein の代謝を含めた安全性の検証がさらに必要である。

【結論】

本研究では、(+)-Terrein が RANKL 誘導性の PKC α / β II のリン酸化を抑制することによって破骨細胞分化を抑制し、骨芽細胞の分化に影響することなく、OVX マウスにおける大腿骨吸収を抑制することを明らかにした。本研究結果は、骨粗鬆症を含む骨吸収疾患に対する骨吸収抑制薬としての(+)-Terrein の可能性について新たな知見を提供するものである。

論文審査結果の要旨

超高齢社会を迎えた日本では骨粗鬆症患者数は約 1,300 万人に達し、病的骨折リスクの低下を目的とした医療を提供することが喫緊の課題である。一方、骨粗鬆症治療薬として主に用いられるビスフォスフォネート製剤等には歯科治療に伴う顎骨壊死の副作用が多数報告されているため、顎骨壊死のリスクのない新たな骨粗鬆症治療薬の開発が望まれている。

申請者は、真菌 *Aspergillus terreus* が産生する二次代謝産物(+)-Terrein の抗炎症効果に着目した。これまでに、①(+)-Terrein の有機化学的大量合成経路の確立、② interleukin (IL) -6 誘導性の血管内皮細胞増殖因子の分泌抑制効果、③ receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 誘導性破骨細胞分化に対する抑制効果が報告されているが、(+)-Terrein の骨代謝に及ぼす影響は未だ不明な点が多い。

本研究では、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウス (OVX マウス) を用いて、(+)-Terrein の骨代謝に及ぼす影響を X 線学のおよび組織学的に検討するとともに、マウス骨髄由来マクロファージ様細胞 (mBMMs) を用いて、(+)-Terrein の RANKL シグナル伝達系に及ぼす影響を検討した。さらに、マウス頭蓋冠由来細胞 (MC3T3-E1 細胞) を用いて、(+)-Terrein の骨芽細胞の分化に及ぼす影響について検討した。

1. **マイクロ CT による大腿骨吸収の評価** : (+)-Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、大腿骨吸収が有意に抑制された ($p < 0.01$)。
2. **破骨細胞分化の評価** : (+)-Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、TRAP 陽性破骨細胞数が有意に抑制された ($p < 0.01$)。また、(+)-Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、cathepsin-K 陽性細胞数が有意に抑制された ($p < 0.01$)。
3. **OVX マウスの体重変動および血清中の炎症性サイトカイン濃度の評価** : 試験薬投与期間中、各群間で体重変動に有意な差はなかった。また、(+)-Terrein を投与した OVX マウスと、PBS を投与した OVX マウスとの間には炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6, M-CSF) の血清中濃度に差はなかった。
4. **(+)-Terrein がリン酸化 PKC α / β II の発現に及ぼす影響** : mBMMs に RANKL を添加すると、添加 30 分後に PKC α / β II タンパク質のリン酸化が強く誘導された。一方、(+)-Terrein 投与群では、PKC α / β II タンパク質のリン酸化が有意に抑制された ($p < 0.05$)。
5. **(+)-Terrein が破骨細胞分化因子の発現に及ぼす影響** : (+)-Terrein は、RANKL を添加した mBMMs において、*Ocstamp*, *Dcstamp*, *Calcr*, *Atp6v0d2*, *Oscar*, *Igfb3* の mRNA 発現を有意に抑制した ($p < 0.01$)。
6. **(+)-Terrein が骨芽細胞の分化に及ぼす影響** : MC3T3-E1 細胞に(+)-Terrein を投与したところ、石灰化の指標となるアリザリンレッド染色では、非投与群と比較して発色に大きな差はなく、また、ALP による活性染色も促進しなかった。

以上のことから、(+)-Terrein が、mBMMs において、RANKL 誘導性の PKC α / β II のリン酸化および破骨細胞分化因子の mRNA 発現を抑制することが明らかとなった。さらに、OVX モデルマウスにおいて破骨細胞の分化を抑制し、大腿骨吸収抑制作用を有することが明らかになった。一方、(+)-Terrein は骨芽細胞の分化に影響を及ぼさないことも明らかになった。本研究の結果は、骨粗鬆症を含む骨吸収疾患に対する骨吸収抑制薬としての(+)-Terrein の可能性について新たな知見を提供するものである。

よって本審査委員会は、本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。