

論文の内容の要旨

氏名：加藤 健 悟

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：アジスロマイシンが MC3T3-E1 細胞の骨形成機能と破骨細胞分化促進因子の発現に及ぼす影響

アジスロマイシンは、細菌のリボソームに結合してタンパク質合成を阻害するマクロライド系の抗菌薬であり、広域スペクトルを示す抗菌作用に加え、免疫調節作用や抗炎症作用を有する。また、アジスロマイシンは広く組織に浸透し、その濃度は血中で低下した後も組織内で維持される。骨芽細胞と破骨細胞は、骨量と骨質を保つ上で重要な骨リモデリングに関与する。骨芽細胞はアルカリホスファターゼ (ALPase) 活性が高く、骨基質タンパクを産生するなどの骨形成機能を有するとともに、破骨細胞分化促進因子である receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL) を発現して破骨細胞の分化にも関与する。一方、破骨細胞は H^+ とプロテアーゼを分泌し、骨組織の無機ならびに有機成分を分解する。これまでに、アジスロマイシンが破骨細胞の分化と骨吸収能を抑制することや、歯肉線維芽細胞における骨代謝に関連する炎症性サイトカイン産生を阻害することが明らかにされている。しかし、アジスロマイシンの骨芽細胞への作用を調べた研究は報告されておらず、詳細は不明である。そこで、本研究では、アジスロマイシンが骨芽細胞の機能に及ぼす影響を検討することを目的とし、骨芽細胞様細胞としてマウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) をアジスロマイシンで継続的に刺激し、*in vitro* での石灰化物形成、ALPase 活性、骨基質タンパク発現、および RANKL 発現に及ぼす影響を調べた。

MC3T3-E1 細胞を培養プレートに播種して一昼夜、培養後、dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解したアジスロマイシンを 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度になるように培地に添加して細胞を刺激した。コントロールである無刺激の細胞も 0.1 % DMSO を添加した培地で培養した。細胞数は、Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。ALPase 活性は、8 mM *p*-nitrophenyl phosphate を含む反応液を加え、酵素反応の結果、生じる *p*-nitrophenol 量を測定して求めた。石灰化物形成は、50 mM β -グリセロリン酸と 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アスコルビン酸を含む培地にアジスロマイシンを加え 14 日間培養後、アリザリンレッド S で染色して調べた。コラーゲン性および非コラーゲン性の骨基質タンパクと RANKL の遺伝子発現は、real-time PCR 法で調べた。培養上清中のオステオポンチンのタンパク量は、ELISA 法で測定した。

培養 5 日と 7 日目の細胞数は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で減少したが、0.1 と 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシンでは、顕著な変化は認められなかった。また、培養 10 日目では、いずれの濃度のアジスロマイシン刺激も細胞数に影響しなかった。培養 10 日目の ALPase 活性は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で低下した。さらに、アリザリンレッドの染色性は、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アジスロマイシン刺激で低下した。培養 7 日と 10 日目のオステオポンチンと骨シアラタンパクの遺伝子発現は、0.1, 1 または 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。また、培養 10 日目のオステオカルシンの遺伝子発現も、これらの濃度のアジスロマイシン刺激で増加した。一方、I 型コラーゲンの遺伝子発現は、培養 7 日目では 0.1 および 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で減少し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。また、培養 10 日目では、1 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で I 型コラーゲンの遺伝子発現が低下した。ALPase はヒドロキシアパタイトの結晶成長を阻害するピロリン酸を加水分解することが知られている。また、I 型コラーゲンは石灰化の足場となり、骨シアラタンパクとオステオカルシンは石灰化の開始に関与する。本研究結果から、高濃度のアジスロマイシン刺激で骨芽細胞の ALPase 活性が低下すると、これらの骨基質タンパクの発現変化にもかかわらず石灰化物形成が低下すると考えられた。

本研究では、MC3T3-E1 細胞の培養上清中のオステオポンチンのタンパク量は、培養 7 日と 10 日目に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。また、培養上清からリン酸化タンパクを抽出した試料中のオステオポンチンも、培養 10 日目において 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。リン酸化したオステオポンチンは、ヒドロキシアパタイト形成を阻害し、ALPase はこの阻害作用を弱めることが知られている。すなわち、高濃度 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のアジスロマイシンは、ALPase の活性低下と

リン酸化オステオポンチンの産生増加を介して、石灰化物形成を抑制すると考えられた。

さらに、本研究では、MC3T3-E1 細胞の RANKL の遺伝子発現は、培養 7 日目において 0.1, 1 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアジスロマイシン刺激で増加した。本結果から、アジスロマイシンは、骨芽細胞を介した破骨細胞分化を抑制する可能性が示唆された。

結論として、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下のアジスロマイシンは MC3T3-E1 細胞の骨形成機能に影響を及ぼさないものの、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上では、ALPase の活性低下とリン酸化オステオポンチンの産生増加を介して、MC3T3-E1 細胞の骨形成機能を抑制することが明らかとなった。また、アジスロマイシンは、MC3T3-E1 細胞の RANKL 発現を低下させ、破骨細胞分化を抑制する可能性が示唆された。