

## 論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査) 教授 佐藤 秀 一

(副査) 教授 外木 守 雄

教授 川戸 貴 行

教授 鈴木 直 人

アジスロマイシンは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<sup>+</sup>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、骨芽細胞様細胞として 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。培養 3 日、5 日、7 日および 10 日目に 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 ALPase 活性を調べた。また、石灰化物形成は、50 mM  $\beta$ -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。培養 7 日と 10 日目に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 の遺伝子発現を real-time PCR 法で調べた。培養 7 日と 10 日目の培養上清中のオステオポンチンのタンパク量を ELISA 法で測定した。

その結果、以下の結論を得ている。

1. ALPase 活性は 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアジスロマイシン刺激で減少した。
2. 石灰化物形成量は 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アジスロマイシン刺激で低下した。
3. オステオポンチン、骨シアロタンパク、オステオカルシンの遺伝子発現は、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。
4. I 型コラーゲンの遺伝子発現は 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は培養 7 日目に増加、培養 10 日目に減少した。
5. オステオポンチンとリン酸化オステオポンチンのタンパク量は 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアジスロマイシン刺激で増加した。
6. RANKL の遺伝子発現は、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。

以上のように、本研究は、アジスロマイシン刺激で骨芽細胞の骨形成機能と破骨細胞分化調節機能に変化し、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上のアジスロマイシンでは ALPase 活性の低下とリン酸化オステオポンチン産生の増加によって骨形成機能が低下することを明らかにしたものであり、歯科医学領域における研究発展に寄与するところが大きい。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 4 年 3 月 1 0 日