

論文の内容の要旨

氏名：武 田 ひとみ

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：プロポフォールが RAW264.7 細胞における破骨細胞様細胞の形成に及ぼす影響

プロポフォールは、鎮静、催眠、健忘あるいは制吐作用を有する静脈麻酔薬であり、生体内での蓄積性が低く、早い作用発現と短い半減期などの利点を有する。プロポフォールは、顎骨への侵襲を伴う長時間の口腔外科処置など様々な手術時の鎮静や全身麻酔に頻用されており、骨リモデリングに関与する骨芽細胞と破骨細胞もまた、プロポフォールの曝露を受けると考えられる。破骨細胞は、骨吸収で中心的な役割を担う多核の巨細胞であり、破骨細胞前駆細胞が互いに融合して破骨細胞へと分化する。骨芽細胞やリンパ球が産生する receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand (RANKL) が破骨細胞前駆細胞に発現する RANK に結合すると、破骨細胞の分化が強く誘導され、破骨細胞性骨吸収は促進する。dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) と osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) は、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化の過程で発現が増加し、破骨細胞前駆細胞の融合に関与する。また、破骨細胞と破骨細胞前駆細胞は、RANK と相反する機能を有する受容体、leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 (LGR4) を発現する。さらに、破骨細胞の細胞上の eph-receptor interacting protein (Ephrin)B2 が骨芽細胞の EphB4 受容体と結合すると、そのシグナルは破骨細胞側にも伝達されて分化が抑制される。

プロポフォールが破骨細胞の分化に及ぼす影響を調べた先行研究では、細胞の培養期間を通じて継続的に破骨細胞や骨芽細胞をプロポフォールで刺激しており、一時的なプロポフォールによる曝露の影響は検討されていない。そこで本研究では、RANKL 誘導性の破骨細胞分化の過程におけるプロポフォールによる一時的あるいは継続的な刺激が、破骨細胞の分化に及ぼす影響について検討した。

本研究では、マウス単球/マクロファージ由来の RAW264.7 細胞を破骨細胞前駆細胞として用いた。RAW264.7 細胞を 24-well または 96-well プレートに播種し、10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含有した α -minimal essential medium で、37°C、5%CO₂ の条件で一晩、培養した。その後、50 ng/ml の可溶性 RANKL と 0 (コントロール)、10、20 または 30 μ M のプロポフォールを含む培地に交換し、5 時間、1.5 日間または 4 日間培養して RAW264.7 細胞を刺激した。培養期間は 4 日間とし、5 時間と 1.5 日間プロポフォールで刺激した後は、プロポフォールを含まない RANKL 添加培地で培養を継続した。培養 4 日目に tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色キットを用いて細胞を染色して破骨細胞様細胞の形成を確認した。また、細胞から全 RNA を抽出した後に cDNA を合成し、これを鋳型として DC-STAMP、OC-STAMP、LGR4、RANK および EphrinB2 の遺伝子発現を real-time PCR 法で調べた。

DC-STAMP と OC-STAMP の発現は、5 時間の刺激では、すべてのプロポフォール濃度で影響は認められなかった。一方、1.5 日間と 4 日間の刺激では、コントロールに比べて 10、20 または 30 μ M のプロポフォールで DC-STAMP と OC-STAMP の発現が低下した。LGR4 の発現は、5 時間の刺激では、コントロールに比べて 20 μ M と 30 μ M のプロポフォールで上昇したが、1.5 日間の刺激では、プロポフォールの影響は認められなかった。また、4 日間の刺激では、すべての濃度のプロポフォールで LGR4 の発現が上昇した。RANK の発現は、コントロールに比べて 20 μ M のプロポフォールによる 5 時間の刺激で低下し、30 μ M では僅かに増加した。また、1.5 日間と 4 日間の刺激では、コントロールと比較して 10、20 または 30 μ M のプロポフォールで RANK の発現が低下した。一方、EphrinB2 の発現は、5 時間、1.5 日間および 4 日間の刺激で、コントロールと比較して 20 μ M と 30 μ M のプロポフォールで上昇した。

TRAP の染色性は、5 時間のプロポフォール刺激では、30 μ M の濃度で僅かに低下したが、10 μ M と 20 μ M のプロポフォールでは、コントロールと同程度であった。一方、1.5 日間と 4 日間の継続刺激では、プロポフォールの濃度依存的に TRAP 陽性の破骨細胞様細胞の形成が抑制された。TRAP 陽性細胞を核数別に 3 から 5 核、6 から 9 核、10 核以上に分類して比較した結果、5 時間の刺激では、い

れの分類の TRAP 陽性細胞の数も 30 μ M のプロポフォールでわずかに減少し、10 μ M と 20 μ M のプロポフォールによる変化は観察されなかった。一方、1.5 日間の刺激では、いずれの分類の TRAP 陽性細胞数も、コントロールに比べて 10 μ M、20 μ M および 30 μ M のプロポフォールで減少した。この減少傾向は、4 日間の継続的な刺激でも同様に認められた。

本研究では、プロポフォールで 4 日間継続的に刺激された RAW264.7 細胞だけでなく、一過性 (1.5 日間) のプロポフォール刺激の後に RANKL 存在下での培養を続けた RAW264.7 細胞でも、DC-STAMP と OC-STAMP の発現低下が認められた。さらに、プロポフォールで 4 日間、継続的に刺激された細胞と 1.5 日刺激された細胞の両方で RANK の発現の低下が認められた。一方、破骨細胞の分化に抑制的に働く RANKL 受容体である LGR4 の発現は、プロポフォールの 1.5 日刺激では変化せず、4 日間の継続刺激で増加した。これらの結果から、プロポフォールによる一時的な刺激が 1 日を超えると RANK 発現の低下を介して、また、刺激がさらに継続するとこれに加えて LGR4 発現が増加して、RANKL 誘導性の破骨細胞分化が抑制されると考えられた。また、本研究では、EphrinB2 の遺伝子発現は、いずれの刺激時間においてもプロポフォールで増加した。すなわち、プロポフォールは、RANKL/RANK 経路だけでなく、EphrinB2/EphB4 経路にも影響を与え、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、数時間で低濃度のプロポフォール投与は、RANKL 誘導性の破骨細胞分化に顕著な影響を及ぼさないが、数日間のプロポフォールによる曝露を受けると、その後、投与を中断しても破骨細胞の分化が抑制されると考えられた。すなわち、プロポフォールの持続投与は、骨リモデリングのバランスを損なう可能性が示唆された。