

論文の内容の要旨

論文題目 Molecular biological studies on the bioactive substances related to bone inflammation
(骨の炎症機構に関わる生理活性物質の分子生物学的研究)

引地尚子

序論

骨は硬組織であるが、静的な組織ではなく、動的代謝を行っている組織である。骨組織はそのホメオスタシスを保つため、常にリモデリングを繰り返している。著者は、骨代謝研究のうち特に骨の炎症機構の解明に取り組み、いくつかの成果を得た。その成果は以下のように3つに分けられる。

第一章 骨と一酸化窒素

一酸化窒素 (NO) の骨芽細胞分化に対する検討を行った¹⁾。その後骨炎症における役割についても検討を行った。

一酸化窒素 (NO) の骨芽細胞の分化に対する効果を、マウス初代骨芽細胞を用いて検討した。炎症性サイトカイン TNF- α と IL-1 β は、構成的に発現する血管内皮細胞 NO 合成酵素 (ecNOS) 遺伝子発現に影響しなかったが、誘導 NO 合成酵素遺伝子発現 (iNOS) を増加した。NO 産生は TNF- α と IL-1 β により増加したが、NOS 阻害剤 L-NMMA の前処理によって抑制された。しかし、アルカリホスファターゼ (ALPase) 活性は減少したが、L-NMMA によって回復しなかった。さらに、NO ドナーのニトロプルシドナトリウムと Ethanamine, *N*-ethyl-, compound with 1,1-diethyl-2-hydroxy-2-nitrosohydrazine は、それぞれ ALPase 活性と osteocalcin 遺伝子発現を増加させた。以上より、NO が骨芽細胞の分化を直接促進すること、サイトカインによる ALPase 活性の抑制は NO 以外のメカニズムによることが示された。

発表当時、骨代謝においては、iNOS に起因する炎症性変化、すなわち骨吸収作用のみが検討されていたが、本研究で初めて、NO そのものは骨芽細胞の分化、すなわち骨形成作用につながる現象を引き起こすことが示された。

その後、マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を用いて、iNOS 誘導に起因する炎症性変化は、産生された NO そのものによるものではなく、NO と炎症の際に産生されるラジカルであるスーパーオキシドとの相互作用により最終的に産生されるパーオキシナイトライトによるものであることが示された²⁾。

以上より、NO は生理的な骨代謝にも関与し、骨の炎症にも関与していることが示された。

第二章 骨と生理活性脂質

著名な起炎生理活性脂質のプロスタグランジン (PG) と NO は共通する特性を持つ生理活性物質であり、それぞれの合成酵素はシクロオキシゲナーゼ (COX) と NOS であるが、NOS は NO を産生することにより COX の発現を上流で調節する。一般に生理活性脂質の多くは強い起炎作用を持ち、リゾリン脂質、ロイコトリエン類など様々な種類がある。しかしながら、骨代謝領域においては、PGE₂ 以外の生理活性脂質はほとんどその機能が検討されていなかった³⁾。

そこで、ロイコトリエン B₄ (LTB₄) について検討し、LTB₄ が骨吸収機構に大きく関与していることを明らかにした⁴⁾。

代表的 LTB₄ レセプターである BLT1 の遺伝子欠損マウスを用いて骨吸収モデルを作成し、骨吸収における BLT1 の役割を検討した。骨密度、骨塩量、骨形態計測パラメーターの測定により、BLT1 遺伝子欠損マウスではかなり骨吸収が軽減されることが示された。また、BLT1 遺伝子欠損マウス由来の破骨細胞は、野生型マウス由来破骨細胞と比較してカルシウム吸収活性が減弱していることも示された。なお野生型マウス由来破骨細胞では別の LTB₄ レセプター-BLT2 は検知できなかったが、BLT1 遺伝子は発現しておらず、破骨細胞は、オートクリン/パラクリンに LTB₄ を産生していた。さらに、LTB₄ は、BLT1-Gi タンパク質-Rac1 シグナリング経路を通じて、破骨細胞の細胞形態を変化させた。破骨細胞形態と骨吸収活性の間に関係があるとするれば、破骨細胞から生じたオートクリン/パラクリン LTB₄ が BLT1-Gi タンパク質-Rac1 シグナリング経路を通じて骨吸収活性を増加することが示唆された。

第三章 骨と G タンパク質共役受容体

生理活性脂質の受容体の多くは G タンパク質共役受容体 (GPCR) である。GPCR の分子系統分析から新たな骨代謝関連 GPCR を見出し、検討した。すなわち proton sensing receptor である T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) が骨吸収性機構に関与していることを示し、その細胞内シグナル伝達を明らかにした⁵⁾。

骨代謝において破骨細胞が産生した酸が骨基質を溶解することはよく知られている。しかし、骨代謝のプロトン感知受容体の機能は十分に検討されていない。そこで、骨吸収過程で T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) がプロトン感知受容体として関与するか否かを検討した。すなわち TDAG8 遺伝子ノックダウンマウスの骨塩量および骨形態計測パラメーターの測定により、病的骨吸収は遺伝子ノックダウンにより増悪することが示された。また、TDAG8 遺伝子ノックダウンマウス由来破骨細胞は野生型マウス由来破骨細胞よりカルシウム吸収活性が増強していることも示された。酸性環境で破骨細胞形成は通常阻害されるが、Tdag8 遺伝子ノックダウンマウス由来破骨細胞では阻害されなかった。酸性環境は、TDAG8-Rho signaling 経路によりその細胞形態を変化させた。以上より、TDAG8 は骨吸収を抑制して、骨代謝を維持するのに役立っていることが示唆された。

結論

著者はいくつかの骨炎症機構に関わる分子の研究を行って、骨代謝における役割を明らかにした。骨以外の組織でその重要性が知られている分子でも、骨代謝学の領域ではあまり検討されていないことも多い。これらの骨炎症の機構の解明は、将来的に骨炎症性疾患の治療にも寄与すると思われる。

文献

1. Hikiji H (他 6 名) . Direct action of nitric oxide on osteoblastic differentiation. FEBS letters 410: 238-242, 1997.
2. Hikiji H (他 7 名). Peroxynitrite production by TNF- α and IL-1 β . Implication for suppression of osteoblastic differentiation. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 278: E1031-1037, 2000.
3. Hikiji H (他 3 名). The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. Progress Lipid Res. 47:107-126, 2008.
4. Hikiji H (他 4 名). A distinctive role of the leukotriene B4 receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss. Proc Natl Acad Sci U S A. 106:21294-21299, 2009.
5. Hikiji, H (他 11 名). TDAG8 activation inhibits osteoclastic bone resorption. FASEB J. 28: 871–879, 2014.

