［課程―２］

審査の結果の要旨

氏名 若林　義賢

本研究は、HIV 感染者に骨粗鬆症の有病率が高いという報告を元に、骨芽細胞の分化に対する抗 HIV 薬の影響を明らかに目的で、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を試験管内で分化誘導させ、抗 HIV 薬が及ぼす影響を解析した。

１）MC3T3-E1 細胞を Ascorbic acid、Hydrocortisone、β-Glycerophospate を含む分化メディウムで培養し、ALP 活性の測定と、リアルタイム PCR 法による I 型コラーゲン mRNA 測定によって分化を確認した。また、アリザリンレッド染色によって石灰化を確認した。さらに抗 HIV 薬である ritonavir, darunavir, atazanavir, lopinavir, abacavir, lamivudine, tenofovir, emtricitabine を、治療量での血中薬物濃度の最大値(Cmax)となるよう各々分化メディウムに添加し、MC3T3-E1 細胞を培養した。ritonavir(RTV)を添加した分化メディウムで培養した場合のみ、MC3T3-E1 細胞の分化及び石灰化の抑制が抑制された。

２）RTV の濃度別に MC3T3-E1 分化への影響を調べたところ、RTV が 5 μg/mL および 10 μg/mL の濃度で分化抑制を認めた。しかし、それ以下の濃度では分化抑制は認められなかった。

３）骨芽細胞分化過程において重要な役割を果たす転写因子 RUNX2 のmRNA や蛋白質の発現に及ぼす抗 HIV 薬の影響をリアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法によって解析した。いずれの方法でも、分化メディウムのみで培養した場合には RUNX2 発現の増強が認められるものの、RTV を添加した場合には RUNX2 の発現が抑制された。

４）RTV による細胞毒性が骨芽細胞分化を抑制している可能性を除外するため、LDH アッセイによる細胞生存率を算出した。RTV を Cmax 濃度で添加した群と非添加群を比較したが、2 群間に有意差はなく高い細胞生存率であった。そのため、RTV による骨芽細胞分化の抑制は細胞毒性によるものではないと判断された。

以上、本論文は、抗 HIV 薬の一つである RTV が骨芽細胞分化に必須の転写因子 RUNX2、もしくはその上流を抑制することによってマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 の分化を

抑制することを明らかにした。重要な問題点としては、RTV は現在の HIV 治療において他の薬剤の血中濃度を上昇させるためのブースターとして少量投与されるため、実際の血中濃度は最高で 1.5μg/mL までしか上昇しない。この濃度で今回の実験を行うと、MC3T3-E1 の分化には影響を認めなった。そのため、この研究結果が生体における薬剤性骨粗鬆症に直結するか否かについては更なる検証が必要と考えられた。しかし *in vitro* での研究で、今まで RTV が骨芽細胞の分化、石灰化を抑制するといった報告はなく、HIV 感染者の骨粗鬆症の原因解明に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられた。