鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名 田中 健
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第525号
学位授与年月日 令和5年3月31日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Intraperitoneal injection of Nrf2 activator inhibited calvarial bone destruction in mice
(Nrf2活性化剤全身投与による局所的骨吸収の人為的制御)
Dent Oral Maxillofac Res, 2021 doi: 10.15761/DOMR.1000375
論文審査委員 主査 教授 二藤 彰
副査 教授 奥村 敏 副査 教授 友成 博

内容の要旨

【緒言】

歯周病などの骨破壊性疾患は、破骨細胞による過剰な骨吸収が特徴である。破骨細胞の分化・活性化は主に Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand (RANKL) によって制御されており、その細胞内シグナル伝達に活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) が利用されている。我々は以前に、抗酸化酵素発現制御因子である Nuclear-factor E2-related Factor 2 (Nrf2) の局所活性化により破骨細胞分化を抑制し骨破壊を阻止できることを報告した (JBC 2013)。

本研究課題では、Nrf2 活性化剤を全身投与した際、破骨細胞の分化を抑制し、骨破壊を阻止できると仮説を立て、その検証を細胞培養実験と動物実験を用いて行った。

【資料および方法】

In vitro において、まずマウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 cell (RAW cell) 培養実験系を用いて各抗酸化剤の Nrf2 活性化能の有無による破骨細胞分化抑制能を比較した。96 well plate に RAW cell を plating (10^3 cells/well) し組換え RANKL (100 ng/ml) および各抗酸化剤 [Catechin (100 μ M), Epigallocatechin-Gallate (EGCG, 10 μ M), Sulforaphane (SFN, 10 μ M), Vitamin C (50 μ g/ml)] の存在下/非存在下で培養後、酸性ホスファターゼキットを用いて、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。暗赤色の多核細胞 (3核以上) を TRAP 陽性多核細胞、すなわち破骨細胞として計測した。また、RAW cell に各抗酸化剤を添加し、抗酸化酵素発現解析およびレポーターアッセイを行った。抗酸化酵素発現解析では、RAW cell に各抗酸化剤を添加培養後 RNA を抽出し real-time RT-PCR 法にて抗酸化酵素群 [Heme Oxygenase 1 (HO-1), γ -Glutamyl Cysteine Synthetase (GCS)] の発現解析を行った。レポーターアッセイは RAW cell に Nrf2 レポータープラスミドを遺伝子導入した後に各抗酸化剤を添加培養後、発光基質を含む細胞溶解液を調整し、Synergy HTX Multi-Mode plate reader で化学発光強度を計測した。次に、*in vivo* においてマウス頭蓋冠での Lipopolysaccharide (LPS) 誘発骨破壊実験 (動物実験承認番号: 28A087) を行った。7週齢 BALB/C 雄性マウス 25匹を5匹ずつ5群にランダムに振り分けた (コントロール群, LPS+PBS群, LPS+SFN群, LPS+Catechin群, LPS+EGCG群)。コントロール群には頭蓋冠の正中線部へ Phosphate-Buffered Saline (PBS) 注射を行い、その他4群には1, 3, 5, 7, 9日目に頭蓋冠の正中部へ LPS を繰り返し注射した。それぞれ抗酸化剤または PBS を1, 3, 5, 7, 9日目に腹腔内注射した。11日目に屠殺、4% パラホルムアルデヒド PBS 溶液で浸漬固定後、軟部組織を頭蓋骨から剥離し、MicroCT にて骨破壊の程度を比較した。

【結 果】

破骨細胞形成抑制試験において、SFN および EGCG は強力に破骨細胞形成を抑制したが、Catechin や Vitamin C では弱く破骨細胞形成を抑制した。抗酸化酵素発現解析では、SFN および EGCG は強力に HO-1 と GCS の発現量を増加させたが、Catechin や Vitamin C では抗酸化酵素発現誘導は弱かった。レポーターアッセイでは、SFN および EGCG によるレポーター遺伝子の強い発現誘導、すなわち Nrf2 転写活性の増加が見られたが、Catechin や Vitamin C ではレポーター遺伝子の発現誘導は弱かった。LPS 誘発骨破壊実験において、SFN および EGCG の腹腔内投与は LPS による骨破壊を強力に抑制したが、Catechin では骨破壊の抑制がほとんどみられなかった。

【考 察】

本研究では、各試薬の Nrf2 活性化能と破骨細胞分化阻止能との関係を調べた。培養系で見られた破骨細胞分化阻止能は Nrf2 活性化能と強い相関を示し、SFN、EGCG は破骨細胞分化を阻害したが、Nrf2 活性化能が見られない Vitamin C は破骨細胞分化を阻害しなかった。さらに、薬剤間で抗酸化酵素発現を比較したところ、SFN、EGCG は抗酸化酵素発現を顕著に増大させた。*in vitro* の結果と同様に、動物実験で Nrf2 活性化能を示す SFN、EGCG の腹腔内投与で骨破壊が阻止できた。この結果は、より強い Nrf2 活性化を誘導する SFN、EGCG が、破骨細胞分化および骨破壊に対してより強力な阻害効果を有することを示唆している。このことから、Nrf2 活性化剤は全身投与によっても骨破壊性疾患の新規治療法となる可能性が示唆された。骨破壊性疾患は、一般的に骨形成と骨吸収のバランスが破綻することによって引き起こされる。破骨細胞形成抑制試験では破骨細胞および破骨細胞前駆細胞に対する各抗酸化剤の直接的な影響を調べており、ROS スカベンジングによる破骨細胞形成の阻害と比較して、Nrf2 活性化を介した抗酸化酵素発現増強による ROS シグナル阻害のほうが破骨細胞形成をより強く阻害するということが明らかとなった。Vitamin C は破骨細胞分化を阻害しなかったことや、Vitamin E は結紮誘発性菌周炎のラットの骨量減少を抑制できないと報告されていることから、Nrf2 活性化能のない薬剤と比較し Nrf2 活性化能を有する薬剤は、骨破壊性疾患への新規治療薬としてより効果的である可能性が示唆された。

本研究では、破骨細胞および破骨細胞前駆細胞に対する直接的な影響に焦点を当てたが、破骨細胞分化支持細胞を介した破骨細胞に対する各薬剤の間接的な影響の可能性も考慮する必要がある。軟骨/骨の破壊部位を考慮すると、骨芽細胞、滑膜細胞、免疫系細胞などの破骨細胞分化支持細胞は、RANKL を含む破骨細胞分化サイトカインを産生すると報告されている。抗酸化剤によって RANKL 産生が減弱されるかどうかは確認していないが、EGCG は骨芽細胞における LPS 誘導性の RANKL の発現を抑制し、SFN は骨細胞の RANKL 産生も抑制することで、間接的に破骨細胞分化を阻害することが報告されている。

以上のことから、抗酸化剤は Nrf2 活性化能に応じて破骨細胞分化を抑制し、遠隔部位での骨破壊を全身投与により抑制できたことから、Nrf2 活性化剤は骨破壊性疾患の新規治療薬として利用できる可能性が示唆された。

【結 論】

Nrf2 活性化能を有する SFN および EGCG の全身投与は、マウス頭蓋冠における骨破壊を抑制した。

審査の結果の要旨

歯周病などの骨破壊性疾患は、破骨細胞による過剰な骨吸収が特徴である。破骨細胞の分化・活性化は主に Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand (RANKL) によって制御されており、その細胞内シグナル伝達に活性酸素種が利用されている。我々は以前に、抗酸化酵素発現制御因子である Nuclear-factor E2-related Factor 2 (Nrf2) の局所活性化により破骨細胞分化を抑制し骨破壊を阻止できることを報告した。本研究では、Nrf2 活性化剤を全身投与した際、破骨細胞の分化を抑制し、骨破壊を阻止できると仮説を立て、その検証を細胞培養実験と動物実験を用いて行った。

In vitro において、まずマウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 cell (RAW cell) 培養実験系を用いて各抗酸化剤の Nrf2 活性化能有無による破骨細胞分化抑制能を比較した。各抗酸化剤 [Catechin, Epigallocatechin-Gallate (EGCG), Sulforaphane (SFN), Vitamin C] の存在下 / 非存在下で培養後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。また、RAW cell に各抗酸化剤を添加し、抗酸化酵素発現解析およびレポーターアッセイを行った。次に、*in vivo* においてマウス頭蓋冠での Lipopolysaccharide (LPS) 誘発骨破壊実験を行った。7 週齢 BALB/C 雄性マウス 25 匹を 5 匹ずつ 5 群にランダムに振り分けた (コントロール群, LPS+PBS 群, LPS+SFN 群, LPS+Catechin 群, LPS+EGCG 群)。コントロール群には頭蓋冠の正中線部へ Phosphate-Buffered Saline (PBS) 注射を行い、その他 4 群には 1, 3, 5, 7, 9 日目に頭蓋冠の正中部へ LPS を繰り返し注射した。それぞれ抗酸化剤または PBS を 1, 3, 5, 7, 9 日目に腹腔内注射した。11 日目に安楽死、

4%パラホルムアルデヒドPBS溶液で浸漬固定後、軟部組織を頭蓋骨から剥離し、MicroCTにて骨破壊の程度を比較した。

その結果、破骨細胞形成試験において、SFNおよびEGCGは強力的に破骨細胞形成を抑制した。抗酸化酵素発現解析では、SFNおよびEGCGは強力的に抗酸化酵素の発現量を増加させた。レポーターアッセイでは、SFNおよびEGCGによるレポーター遺伝子の強い発現誘導、すなわちNrf2転写活性の増加が見られた。LPS誘発骨破壊実験において、SFNおよびEGCGの腹腔内投与はLPSによる骨破壊を強力的に抑制した。

以上のことから、抗酸化剤はNrf2活性化能に応じて破骨細胞分化を抑制し、遠隔部位での骨破壊を全身投与により抑制できたことから、Nrf2活性化剤は骨破壊性疾患の新規治療薬として利用できる可能性が示唆された。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値を有するものと判定した。