



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | NF $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotides ameliorates osteoporosis through inhibition of activation and differentiation of osteoclasts                                                                                                                               |
| Author(s)    | 志水, 秀郎                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 2006, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/46153">https://hdl.handle.net/11094/46153</a>                                                                                                                                                                                  |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 志 水 秀 郎

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19915 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 2 月 20 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学 位 論 文 名 NF $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotides ameliorates osteoporosis through inhibition of activation and differentiation of osteoclasts  
(NF $\kappa$ B デコイは、破骨細胞の活性と分化を抑制して、骨粗鬆症を改善する)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 荻原 俊男

(副査)

教 授 吉川 秀樹 教 授 大藁 恵一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

転写因子 Nuclear Factor kappa B (NF $\kappa$ B) は、炎症性サイトカインや接着分子の転写活性において中心的な役割を演じているが、近年、破骨細胞の誘導活性においても深く関わっていることが示唆されてきている。本研究では、NF $\kappa$ B のデコイオリゴヌクレオチド (decoy ODN) に注目し、破骨細胞の誘導形成および活性化における decoy ODN の阻害効果を培養細胞を用いて調べると共に、骨粗鬆症実験動物モデルにおいてその作用効果を解析して、新たな治療薬としての有効性について検証した。

### 〔 方法ならびに成績 〕

【培養実験】破骨細胞の培養実験系として、家兔骨髓およびラット前破骨細胞を用いた。生後 3 日齢の家兔骨髓細胞に活性型ビタミン D3 (VitD3) 刺激を加えると約 7 日で酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 陽性の多核細胞 (破骨細胞) が形成され、歯牙切片上で培養するとさらに約 3 日で吸収か (Pit) を形成する。実験系における NF $\kappa$ B 活性を Luciferase を用いて測定した結果、VitD3 刺激後 48 時間で NF $\kappa$ B 活性の上昇を認め、NF $\kappa$ B decoy ODN は濃度依存性に活性を抑制した。また形成される破骨細胞数および Pit 数を濃度依存性に抑制した。これらの細胞は、Annexin V および Caspase3 に陽性を示し、アポトーシスを誘発している事が示唆された。一方、ラット前破骨細胞を用いる HOKUDO 社製培養 KIT においても、NF $\kappa$ B decoy ODN は同様に破骨細胞の形成および活性化に対し抑制効果を示した。これらの抑制効果は、Scrambled decoy (Scb) では認められなかった。

【動物実験】骨粗鬆症の実験モデルとして、卵巣摘出ラット (OVX) およびビタミン C (VitC) 欠乏ラット (ODS) を用いた。NF $\kappa$ B decoy ODN を注入した Osmotic Pump をラット皮下に埋め込み、持続投与 (30  $\mu$ /Kg/hr) とし、OVX 実験系は 14 日後、ODS 実験系は 28 日後に試料を作成した。FITC ラベルした NF $\kappa$ B decoy ODN の投与後、大腿骨、頸骨骨梁の細胞において蛍光を認め、薬剤の取り込みを確認した。OVX 実験系では、卵巣摘出によりエストラジオールは有意に低下したが体重に変化は認めなかった。膝関節部 (大腿骨遠位部: DF、頸骨近位部: PT) の組織標本において OVX で認めた破骨細胞は、NF $\kappa$ B decoy ODN 投与により減少したが、Scb では変化を見なかった。

骨組織をホモジナイズして組織 TRAP 活性と Ca 量を比較した結果、DF、PT ともに卵巣摘出により TRAP 活性の上昇と Ca 量の減少を認めたが、NF $\kappa$ B decoy ODN は、TRAP 活性の上昇を抑制し、Ca 量の減少を予防した。さらにコラーゲンの代謝産物である尿中デオキシピリジノリンの排泄量を抑制した。ODS 実験系では、VitC 欠乏食に切り替えることによりコラーゲン合成障害を引き起こし、血管壁と骨梁の脆弱性から出血と骨折を併発して約 5-6 週で死に至る。NF $\kappa$ B decoy ODN は Scb に比して有意に体重減少を抑制した。また、誘発される大腿骨頸部骨折を予防した。DEXA を用いた骨量測定においても、NF $\kappa$ B decoy ODN は、Scb において減少する骨密度を有意に温存した。

#### 〔 総 括 〕

転写因子 NF $\kappa$ B は、破骨細胞の誘導形成系において活性化され、骨吸収に重要な役割を担っていると考えられる。本研究では、NF $\kappa$ B decoy ODN に着目して骨代謝疾患に対する治療薬としての適応性について、*in vitro* および *in vivo* においてその作用効果を検証した。NF $\kappa$ B decoy ODN は、破骨細胞形成系の NF $\kappa$ B 活性を濃度依存性に抑制して、形成される破骨細胞数およびその吸収活性を阻害した。その効果は、一部には破骨細胞のアポトーシス誘発によるものと考えられた。また動物実験において、NF $\kappa$ B decoy ODN は卵巣摘出により誘発される TRAP 活性の上昇、尿中コラーゲン代謝産物の上昇、組織 Ca 量の減少を有意に阻害した。またビタミン C 欠乏より誘発される体重減少、骨折を予防し、減少する組織骨密度を温存した。これらの結果より、NF $\kappa$ B decoy ODN は骨吸収を併発する骨代謝疾患に対して有効であり、将来、治療薬として広く適応できる可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

転写因子 Nuclear Factor kappa B (NF $\kappa$ B) は、破骨細胞の形成に関与すると考えられている。本研究では、NF $\kappa$ B のデコイオリゴヌクレオチド (decoy ODN) に注目し、骨粗鬆症の新たな治療薬としての有効性について解析を行った。

培養実験では、家兔骨髄を活性型ビタミン D3 刺激で形成される酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色陽性の多核細胞 (破骨細胞) が、NF $\kappa$ B decoy ODN の添加により濃度依存性に阻害され、また M-CSF、RANKL 刺激による破骨細胞誘導系においても同様の効果が認められた。また、歯牙切片吸収能を用いた吸収活性も同様に阻害した。

動物実験では、雌ラットに卵巣摘出術を施し、NF $\kappa$ B decoy ODN を Osmotic Pump で持続投与した結果、組織 TRAP 活性増加の抑制と組織 Ca 濃度が上昇し、コラーゲン代謝産物である尿中デオキシピリジノリン濃度が減少した。同様にビタミン C 欠乏ラットでは、大腿骨頸部骨折を予防するとともに、骨長、骨重量減少を抑制し、DEXA による骨密度測定においても改善が認められた。

これらの実験結果より、NF $\kappa$ B を標的としたデコイ療法は、骨粗鬆症をはじめとする骨代謝疾患に幅広く適応することが出来ると考えられた。

上記に要約される研究により、骨代謝疾患へ核酸医薬を用いる新たな治療法への基盤をなした業績により、申請者志水秀郎は博士 (医学) の学位授与に値すると考えられる。