

Title	小分子化合物ライブラリーLOPAC1280を用いた破骨細胞分化関連物質の探索
Author(s)	水田, 亜希子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/55536">https://hdl.handle.net/11094/55536</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	水田 垂希子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 25793 号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	小分子化合物ライブラリー LOPAC <sup>1280</sup> を用いた破骨細胞分化関連物質の探索
論文審査委員	(主査) 教授 上崎 善規 (副査) 教授 川端 重忠 講師 佐藤 淳 講師 上松 節子

## 論文内容の要旨

【これまでの現状と目的】骨組織は形成と吸収を繰り返し、骨・カルシウムの代謝を調節しながらダイナミックにリモデリングを行っている。骨リモデリングは、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスの上に成り立ち、骨組織の機能と形態を維持するために重要である。この相反する性質をもつ二つの細胞の存在が、骨組織の機能と形態を厳密に調節している。しかし、炎症、加齢、閉経、ストレスなど様々な要因により破骨細胞による骨吸収が亢進すると、このバランスが崩れ、骨密度が低下して歯周病や骨粗鬆症などの代謝性骨疾患が発症する。高齢化に伴って増加しているこれらの骨吸収が亢進する疾患に対応するためには、破骨細胞分化の分子メカニズムを明らかにし、破骨細胞形成を選択的に阻害する有効な手段を確立することが望まれる。

RANKL は RANK と結合することにより、細胞内へそのシグナルを伝達し、最終的にその経路を統合するマスター転写因子 Nuclear Factor of Activated T cells c1 (NFATc1) を誘導、活性化して破骨細胞を分化誘導する。破骨細胞分化のために、NFATc1 の活性化までに至るシグナル分子の働きは徐々に解明されつつあるが、未だ不明な点が残っている。また、NFATc1 活性化以降の分子メカニズムも完全に解明されていない。本研究は破骨細胞の分化に影響を及ぼす小分子化合物を探索し、そのターゲット分子を明らかにすることで破骨細胞の分化・誘導メカニズムを明らかにすることを目的として行った。

今回、破骨細胞の分化を誘導する小分子化合物の中から、新たにフェンセリンが破骨細胞分化を著明に亢進することを見出した。

【方法】マウス単球系細胞株 RAW264.7 細胞に NFATc1 と結合する領域をもつルシフェラーゼベクター-pGL4.30 を導入し、さらに Hygromycin B を添加した 10 %FBS 含有  $\alpha$ -MEM 培地にて培養した。そして作成した細胞に対して RANKL を投与して 24 時間後に、その活性上昇が確認できたものだけを使用した。レポーターベクター導入 RAW264.7 細胞の NFAT 活性化測定はプロトコルに従い、発光基質を加えた後、ルミノメーターを用いて検出した。

作成したルシフェラーゼアッセイ用細胞株を用いて、小分子化合物 (LOPAC<sup>1280</sup>) のスクリーニングを行い、RANKL 存在下に誘導性の NFATc1 活性を増強させる小分子化合物を探索した。LOPAC<sup>1280</sup> は 1280 種の小分子化合物から構成されており、核酸や、G タンパク、イオンチャネル、細胞シグナル伝達に関与する物質などが含まれている。

マウス骨髄細胞由来マクロファージ系細胞および RAW264.7 細胞に RANKL を投与し、酒石酸耐性フォスファターゼ (TRAP) 法により染色を行い、破骨細胞への分化を検討した。

【結果および考察】レポーターベクター導入 RAW264.7 細胞を用いて、小分子化合物 (LOPAC<sup>1280</sup>、Sigma) のスクリーニングを行ったところ、RANKL 存在下に NFAT 活性を増強させる小分子化合物が多数見つかった。候補化合物の中から、TRAP 染色で破骨細胞分化を亢進するものを選択し、破骨細胞分化を亢進するものを TRAP 染色によりスクリーニングしたところ、アルツハイマー病の治療薬として米国で臨床試験(Phase III)が行われているフェンセリンを見出した。フェンセリンと同様にコリンエステラーゼ阻害薬であるドネペジルも破骨細胞分化を亢進した。RAW264.7 細胞に対してアセチルコリンエステラーゼおよび偽アセチルコリンエステラーゼを投与し、それぞれ破骨細胞の分化誘導を行ったところ、どちらも破骨細胞分化を抑制するという結果が得られた。またマウス骨髄細胞由来マクロファージ系細胞についても同様の結果が得られた。以上より、アセチルコリンエステラーゼの阻害が破骨細胞分化に関与しており、アセチルコリンが破骨細胞分化を促進している可能性が示唆された。

さらに、神経型ニコチン性アセチルコリン受容体阻害薬、特に、 $\alpha 7$  ホモ五量体特異的阻害薬である MLA によって破骨細胞分化が強力に抑制されたことより、ニコチン性アセチルコリン受容体  $\alpha 7$  ホモ五量体を介したシグナルが破骨細胞分化の情報伝達経路を調節している可能性が示唆された。

以上より、破骨細胞の分化誘導にはアセチルコリンが関与し、前駆破骨細胞に存在するニコチン性アセチルコリン受容体  $\alpha 7$  ホモ五量体を介した情報伝達により制御されていると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、破骨細胞の分化・誘導メカニズムを明らかにすることを目的とし、小分子化合物ライブラ

リーを探索した中からフェンセリンを見出した。また、そのアセチルコリンエステラーゼの阻害作用が破骨細胞分化を促進すること、つまり、アセチルコリンが破骨細胞分化を促進している可能性を示唆する結果が得られた。さらに、ニコチン性アセチルコリン受容体  $\alpha 7$  ホモ五量体を介したシグナルが破骨細胞分化の情報伝達経路を調節している可能性が示唆された。

以上の研究結果は、破骨細胞の分化・誘導メカニズムを解明する上で重要な情報を与えるものである。よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。