

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	藤原 祐子
論文審査 委員氏名	主査 副査	野口 俊英 戸苅 彰史 服部 正巳	
論文題名	糖質コルチコイドは破骨細胞の概日リズムを 形成する		

インターネットの利用による公表用

概日リズムは生物に備わっている約 24 時間周期で変動する生理現象で、1 日の明暗サイクルと密接に関係している。骨代謝にも概日リズムが存在することが示されているが、骨代謝における概日リズムの分子機構は未だ十分に解明されていない。概日リズムは circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK)、brain and muscle Arnt-like protein 1 (BMAL1)、period (PER) などの時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群によって形成された分子機構によって制御されると考えられている。BMAL1 タンパクは CLOCK タンパクと複合体を形成し、その他の時計遺伝子 (PER1、PER2) のプロモーター上にそれぞれ存在する E-box 配列と結合し、概日リズムを調節することが知られている。

生体における概日リズムは中枢の視交叉上核 (SCN) に存在し、主に眼球から入ってくる光刺激によって制御されると考えられている。SCN での中枢の時間情報は交感神経活動やホルモン分泌を介して末梢組織に伝達され、末梢組織の時計遺伝子に概日リズムが形成されると報告されている。しかし、SCN から末梢組織である破骨細胞への具体的な伝達機構については未だ解明されていない。

今回の研究では、副腎皮質ホルモンである糖質コルチコイドが末梢破骨細胞へ概日リズムを伝達することで、末梢破骨細胞の概日リズムが調節されるのか、さらには破骨細胞の時計遺伝子 BMAL1 が E-box に結合することで、破骨細胞活動マーカーであるカテプシン K (CTSK) と分化マーカーであ

る活性化 T 細胞核内因子 (NFATc1) 遺伝子の概日リズムが発現しそれを介して、破骨細胞概日リズムが調節される可能性があるか否かについて報告する。

時計遺伝子及び破骨細胞関連遺伝子に概日リズムが存在するか否か検討するため、経時的にマウス大腿骨から RNA を採取した。時計遺伝子 PER1、PER2、BMA11、そして破骨細胞関連遺伝子である CTSK、NFATc1 は最小値と最大値の間に有意差があり概日リズムが存在した。

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を 50 ng/ml NF κ B 活性化受容体リガンド (RANKL) で破骨細胞に分化させ実験に使用した。こうして得られた破骨細胞は、合成糖質コルチコイドとしての 10^{-7} M デキサメタゾン (DEX)、交感神経 β 作動薬としての 10^{-6} M イソプレナリン (ISO) にて 2 時間処理したところ、DEX 処理により時計遺伝子 PER1 に概日リズムが発現した。しかし ISO 処理では PER1 発現に影響は認められなかった。次に、破骨細胞関連遺伝子の発現について検討した。CTSK、NFATc1 において DEX 処理により概日リズム様のパターンが認められた。さらに骨髄由来の破骨細胞を用いて同様の実験を行ったところ、DEX 処理により PER2、BMA11、CTSK そして NFATc1 の同期化が確認された。

E-box 配列は PER のプロモーター上に存在し概日リズム形成に必要な配列であり、CTSK と NFATc1 に E-box 配列が存在するのではないかと仮説を立てた。そこで、*in silico* コンピューター解析で CTSK と NFATc1 それぞれ

のプロモーター上に E-box が存在することを確認し、さらにクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析でその E-box は BMAL1 タンパク質と結合することが示された。

生体内において、破骨細胞関連遺伝子の概日リズム発現が内因性糖質コルチコイドの影響か否か検討するために、マウスに副腎除去 (ADX) を行った。ADX により CTSK、NFATc1 といった破骨細胞関連遺伝子の概日リズムが消失した。副腎は糖質コルチコイド以外にも複数のホルモンを産生し分泌している。そこで我々は ADX の効果が糖質コルチコイド消失による反応か否か検討を行うため、ADX マウスに DEX (3mg/kg) を午後 7 時に腹腔内投与した。CTSK、NFATc1 といった破骨細胞関連遺伝子の概日リズムが DEX 投与により再度形成された。

以上の結果から、生体骨組織において時計遺伝子、骨代謝関連遺伝子に概日リズムが存在することが明らかとなった。また、破骨細胞自身の時計遺伝子発現に概日リズムが存在しており、中枢からの時間情報の伝達に糖質コルチコイドが関与する可能性が示された。さらに、破骨細胞の時計遺伝子 BMAL1 が E-box に結合することで、破骨細胞関連遺伝子である CTSK と NFATc1 の概日リズムを制御する可能性が示された。

また、本研究のさらなる進展により骨粗鬆症治療薬などの投与に概日リズムを応用する可能性も示唆され、歯科保存学、歯科薬理学、歯科補綴学および関連諸学科に寄与するところが大きい。よって本論文は博士 (歯学)

(論文審査の要旨)

No.4.....

(2000字以内のこと)

愛知学院大学

の学位授与に値するものと判定した。

平成26年1月15日