

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 755 号	論文提出者名	浜島 康祐
論文審査 委員氏名	主査 後藤 滋巳 副査 戸蒔 彰史 三谷 章雄 宮澤 健		
論文題名	α2アドレナリン受容体を介した破骨細胞分化抑制		

インターネットの利用による公表用

骨リモデリングにおいて、中枢および末梢交感神経系が重要な役割を果たすことが多数報告されてきた。骨芽細胞や破骨細胞では、 α および β アドレナリン受容体（以下、 α -および β -ARs）が発現していることが知られているが、破骨細胞分化における α -ARsの役割はほとんど解明されていない。特に、 $\alpha 2$ -ARsは、破骨細胞形成に対する直接的な役割についてはほとんど知られていない。

本研究では、RAW264.7細胞およびマウス骨髄細胞由来マクロファージを破骨細胞分化培地で培養し、 $\alpha 2$ -AR作動薬（guanabenz、clonidine、xylazine）および $\alpha 2$ -AR拮抗薬（yohimbine、idazoxan）の存在下または非存在下にて、破骨細胞形成における $\alpha 2$ -ARsの役割を検討している。

35匹の雌性C57BL/6Jマウス（8-10週齢）から単離した骨髄細胞由来マクロファージとRAW264.7細胞を用いた。マウス骨髄細胞およびRAW264.7細胞を10%ウシ胎仔血清と抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）を含む α -Minimum Essential mediumで培養し、RANKL存在下にて $\alpha 2$ -AR作動薬/拮抗薬の添加の有無で2-4日間培養後、NFATc1、TRAP、cathepsin Kおよび $\alpha 2A$ -、 $\alpha 2B$ -、 $\alpha 2C$ -ARのmRNAの発現レベルを評価している。

また、RANKL処理60時間後、TRAP染色を行い、3つ以上の核を持つTRAP陽性細胞の数を測定している。

さらに、ウェスタンブロットにより、eukaryotic translation initiation

factor 2 α (eIF2 α)、リン酸化された(p)-eIF2 α 、 β -アクチンのタンパク質の発現レベルを測定している。

結果を以下に示す。

1. 破骨細胞 (破骨細胞前駆細胞) において α 2-ARs の発現が mRNA レベルで認められた。
2. RANKL と同時に α 2-ARs 作動薬を添加すると破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現レベルが有意に低下した。しかし、clonidine の添加を RANKL 添加 1 日後にした場合、破骨細胞関連遺伝子の発現抑制作用は示されなかった。
3. α 2-ARs 拮抗薬を添加すると、 α 2-ARs 作動薬による破骨細胞関連遺伝子抑制作用が有意に減弱した。
4. α 2-ARs 作動薬添加により、TRAP 陽性多核細胞数は濃度依存的に減少した。
5. α 2-ARs 作動薬の中で guanabenz 添加により eIF2 α の脱リン酸化が抑制されたが、clonidine、xylazine 添加では p-eIF2 α のレベルに影響を及ぼさなかった。

考察を以下に示す。

本研究では、 α 2-ARs 作動薬が、RAW264.7 およびマウス骨髄由来マクロファージにおいて、破骨細胞関連遺伝子の発現レベルを抑制し、TRAP 陽性多核細胞数を減少させることが示された。また、 α 2-ARs 拮抗薬は、

$\alpha 2$ -ARs 作動薬による破骨細胞関連遺伝子の抑制効果を減弱した。
guanabenz による破骨細胞関連遺伝子の抑制作用が強く認められた理由としては、guanabenz は eIF2 α の脱リン酸化阻害作用をもつため、その作用による破骨細胞分化抑制の増強が考えられる。

破骨細胞前駆細胞では、RANKL が c-AMP を上昇させることが報告されており、 $\alpha 2$ -ARs を介した破骨細胞分化抑制機構に、c-AMP が関与している可能性がある。c-AMP の上昇は exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) の活性を増加させ、NF- κ B の核内移行によって破骨細胞の分化を促進させることが知られている。さらに、アデニル酸シクラーゼの活性化により上昇する cAMP が、破骨細胞分化促進に関与する c-Fos の発現を増加させることが見出されている。 $\alpha 2$ -ARs が、アデニル酸シクラーゼを抑制し、c-AMP を減少させること、clonidine、guanabenz が c-Fos の発現を低下させることより、 $\alpha 2$ -ARs 作動薬は、RANKL で誘導される c-AMP の上昇を減弱させ、破骨細胞分化を抑制すると考えられる。

本研究では、RAW264.7 およびマウス骨髄細胞由来マクロファージを用い、 $\alpha 2$ ARs 作動薬の添加によって破骨細胞前駆細胞の破骨細胞分化を抑制することを示し、歯科矯正学、歯科薬理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)の学位授与に値するものと判定した。