

氏名(本籍地) 北條健太郎(東京都)
 学位記および番号 博士(歯学), 第378号
 学位授与の日付 令和2年3月10日
 学位論文題名 「Etidronate Down-Regulates
 Toll-Like Receptor (TLR) 2
 Ligand-Induced Proinflammatory
 Cytokine Production by Inhibiting
 NF- κ B Activation」
 論文審査委員 (主査) 伊東博司教授
 (副査) 廣瀬公治教授
 清浦有祐教授

論文の内容および審査の要旨

【研究目的】 窒素非含有ビスフォスフォネートは窒素含有ビスフォスフォネートと比べて骨吸収抑制作用は弱い、顎骨髄炎および顎骨壊死の報告はない。また、窒素非含有ビスフォスフォネートは、破骨細胞以外の細胞に傷害を与えない。その理由としては、炎症性サイトカイン産生が抑制されている可能性が考えられる。そのため、本研究は窒素非含有ビスフォスフォネートであるエチドロネートの炎症性サイトカイン産生に与える影響を明らかにすることを目的に行った。

【研究方法】

1. 窒素非含有ビスフォスフォネートは、エチドロネートを使用した。
2. TLR2リガンドはPam₃CSK₄, TLR4リガンドはリピドAの合成品を用いた。
3. 培養細胞株: J774.1細胞とTHP-1細胞を用いた。
4. 炎症性サイトカインの定量: エチドロネートを細胞株に加えてから5分後にPam₃CSK₄ またはリピドA含有もしくは不含有の培地で培養した。24時間後に上清を回収し、ELISAで定量した。
5. 細胞傷害: 4.と同様に回収した上清中の乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)を調べた。
6. 転写因子の活性化: 4.と同様に培養2時間後のJ774.1細胞から核タンパク質を回収し、核内に移行したNF- κ Bp65をELISAで定量した。
7. 核タンパク質中のNF- κ Bp65とp38MAPKは、ウエスタンブロッティング法で検討した。

【研究結果】

1. エチドロネート単独では、J774.1細胞のIL-6, MCP-1, MIP-1 α およびTNF- α 産生誘導は起こらなかった。
2. 100 μ Mエチドロネートで前培養後に1ng/mlまたは10 ng/mlPam₃CSK₄を加えた同細胞のIL-6, MCP-1, MIP-1 α およびTNF- α 産生は、エチドロネートで前培養しなかった場合と比べて有意に減少した。
3. THP-1細胞でも同様にPam₃CSK₄が誘導するMCP-1とTNF- α 産生は、100 μ Mエチドロネートの前培養によって有意に抑制された。
4. 炎症性サイトカイン産生の抑制がエチドロネートによる細胞傷害の可能性があるため、上清中のLDHを測定した。その結果、エチドロネートによる細胞傷害は認められなかった。
5. TLR4リガンドであるリピドAが誘導するJ774.1細胞

のIL-6, MCP-1, MIP-1 α およびTNF- α 産生におけるエチドロネートの抑制効果を調べたが、リピドAの場合はエチドロネートによるIL-6, MCP-1, MIP-1 α およびTNF- α のいずれの産生も抑制しなかった。

6. 一方、エチドロネートは100ng/mlリピドAによる細胞傷害を抑制した。
7. 100 μ Mエチドロネートは10ng/mlPam₃CSK₄によるJ774.1細胞のNF- κ B活性化を抑制したが、リピドAによる同活性化は抑制しなかった。また、p38MAPK活性化におけるエチドロネートの抑制効果はみられなかった。

【考察・結論】 TLRを介した微生物の認識に対する免疫応答によって、ケモカインを含む炎症性サイトカインの産生による白血球遊走や動脈硬化プラークの形成が起こる。本研究において、エチドロネートはTLR2リガンドによるJ774.1細胞のIL-6, MCP-1, MIP-1 α およびTNF- α 産生とNF- κ B活性化を抑制したが、TLR4リガンドによる炎症性サイトカイン産生とNF- κ B活性化は抑制しなかった。グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖(LPS)が引き起こす炎症性サイトカイン産生において、エチドロネートが抑制効果を示すことは以前から報告されていた。LPSは、TLR4リガンドとしてよく知られているが、市販のLPSはリポタンパク質などのTLR2アゴニストが混入している。今回は、菌体成分の合成品を使用したもので、上記の結果になったと考えられる。TLR2は細胞壁成分を認識するのみならず*Streptococcus mutans*や*Porphyromonas gingivalis*などの全菌体も認識する。TLR2シグナル伝達は、アダプター分子のMyD88依存であるが、TLR4を介したシグナル伝達にはMyD88依存の経路とMyD88非依存の経路もある。このようなシグナル伝達経路の違いが、本研究で得た結果の原因と考えられるので、この差の解明を今後行う予定である。

【審査の経過と結果】 本学位論文に関する一次審査は、3名の審査委員によって令和2年1月22日午後1時から開催された。論文記載の順に従って、各審査委員が本論文の学位論文としての学術的価値を審査するために質問を行った。主なものを次に示す。1) TLR4リガンドのリピドAの由来について。2) 細胞株としてJ774.1細胞以外にTHP-1細胞を用いた理由。3) 乳酸デヒドロゲナーゼ活性を用いた細胞毒性の測定について。4) エチドロネートがp38MAPKを抑制しない理由。5) 今回の研究成果がビスフォスフォネート関連顎骨壊死の予防にどのように役立つのか。6) エチドロネートによる炎症性サイトカイン産生抑制のメカニズムを明確にするための標的分子について。

以上の質問に対する申請者の回答は適切なものであり、申請者が学位論文の研究課題の意義とその内容を理解して研究を進めたことを認めた。

本研究は、骨粗鬆症患者で発症するビスフォスフォネート関連顎骨壊死を窒素非含有のビスフォスフォネートであるエチドロネートの使用で予防できる可能性を示唆するものである。特にエチドロネートが炎症性サイトカイン産生を抑制するメカニズムの一端を明確にしたことは極めて有用な知見を提供したものと評価できる。

以上のことから、一次審査委員は全員が一致して本学位論文を合格と判定した。

掲載雑誌

Pharmacological Reports 69巻4号: 773-778, 2017年