

(様式11)

論文審査の要旨 (課程博士)

生物システム応用科学府長 殿

審査委員 主査 宮浦 千里 (印)
副査 柴田 重信 (印)
副査 稲田 全規 (印)
副査 田中 剛 (印)
副査 田中 秀幸 (印)

学位申請者	平成 <u>23</u> 年度入学 学籍番号 <u>11702102</u> 氏名 <u>小田 俊男</u>
申請学位	博士 (生命科学)
論文題目	TLR2 ヘテロシグナルによる骨吸収の制御に関する研究
論文審査要旨 (2,000字程度) <p>多くの高齢者が罹患する歯周病などの骨疾患は、生活の質にかかわる重大な疾患の一つである。これらの疾患は炎症を伴う骨吸収疾患である。この炎症には、哺乳類が自然免疫機構として備えている侵入微生物をパターンで認識するパターン認識受容体群 (Pattern Recognition Receptors, PRRs) が関与することが近年明らかとなった。当研究室では、これまでグラム陰性細菌の細胞壁表層に存在する Toll like receptor 4 (TLR4) リガンドの LPS が骨吸収に関与することを報告している。しかし、骨代謝におけるその他の TLRs 群に関する報告は殆どなく、作用機序について未だ不明な点が多い。そこで本論文では、グラム陰性菌および陽性菌の細胞壁に存在するリポペプチドの Toll like receptor 1 と 2 および Toll like receptor 2 と 6 のヘテロ受容体 (TLR1/2 と TLR2/6) リガンドに着目し、TLR2 ヘテロ受容体シグナル経路の骨代謝に及ぼす作用機序の解明を目的とした。</p> <p>カテキンは緑茶に含まれるフラボノイドの一種であり、抗酸化作用を有し、日常的な緑茶の摂取により閉経後の女性の骨密度を上昇することが報告されている。また、当研究室では、フラボノイドの一つ、ノビレチンがマウス閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて大腿骨の骨量破壊を抑制することを報告してきた。しかし歯周病などの炎症性骨破壊におよぼすフラボノイドの作用は不明な点が多い。そこで、TLR リガンド誘導性骨吸収におよぼすカテキンの制御機構の解明を試みた。</p> <p>高齢者では、骨疾患に罹患する割合が高いことが知られているが、同時に真菌による感染リスクも高まることが知られている。真菌全般に存在する β-(1,3)-D-グルカン (β-グルカン) は、受容体である Dectin-1 との結合を介して、TLR2 による NF-κB 活性化を誘導することが報告されているが詳細は不明である。炎症性骨破壊における β-グルカンの役割を明らかにするため、Toll like receptor 1 と 2 および Toll like receptor 2 と 6 のヘテロ受容体 (TLR1/2 と TLR2/6) リガンドを用い、骨吸収と β-グルカンの関連性の解明を試みた。</p>	

第2章では、TLR2 ヘテロ二量体リガンドによる細胞レベルおよび器官レベルにおいて、骨吸収作用の発現およびその作用機序の解明を試みた。その結果、骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養において、TLR2 ヘテロ二量体リガンドは、濃度に応じて、破骨細胞形成を亢進した。また、培養液中の PGE₂ 濃度も増加することを明らかにした。さらに骨芽細胞に対する TLR2 ヘテロ二量体リガンドの作用を調べた結果、TLR2 ヘテロ二量体リガンドにより NF- κ B 活性が誘導され、PGE₂ 産生が亢進していることが示唆された。これらの結果より、TLR2 ヘテロ二量体リガンドによる骨吸収亢進作用は、TLR2 のシグナル伝達機構を介した NF- κ B 誘導により PGE₂ 産生量が増加し、その増加が RANKL の産生を亢進した結果、破骨細胞の形成が促され、骨吸収が亢進することが示唆された。

第3章では、カテキンの一種であるエピガロカテキンガレート (EGCG) による TLR2 ヘテロ二量体リガンド誘導性骨吸収に及ぼす作用を検討した。その結果、骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系での TLR2 ヘテロ二量体リガンド刺激による破骨細胞形成誘導を EGCG が抑制することを明らかにした。また、骨芽細胞での PGE₂ 合成に関与する COX-2、mPGES-1 の TLR2 ヘテロ二量体リガンド刺激による遺伝子の誘導が EGCG により抑制されることにより PGE₂ 発現が抑制することが示唆された。またマウス頭頂骨器官培養系において、TLR2 ヘテロ二量体リガンド刺激による骨吸収活性の亢進が EGCG により有意に抑制することを見出した。一方、破骨細胞前駆細胞に対する EGCG の影響を検討した結果、EGCG が破骨細胞前駆細胞を標的として破骨細胞の分化を抑制することを明らかにした。これらの結果より、EGCG による骨吸収抑制作用には、骨芽細胞由来の PGE₂ 産生を介した RANKL 発現の上昇、および破骨細胞前駆細胞への直接作用の双方の制御によるものと推測される。

第4章では、 β -グルカンによる骨吸収への影響を検討した。骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系での TLR2 ヘテロ二量体リガンド刺激による破骨細胞形成において、 β -グルカン添加により濃度依存的に抑制することが示唆された。一方、培養液中の PGE₂ 濃度は、 β -グルカンにより変化がなかったことから、 β -グルカンの破骨形成抑制作用は、 β -グルカンによる破骨細胞への直接抑制作用あるいは骨芽細胞での RANKL に対する抑制の可能性が考えられる。骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養の培養液中の PGE₂ 濃度の無変化は、骨芽細胞の PGE₂ 産生抑制と破骨細胞の PGE₂ 産生亢進の結果による可能性も示唆される。

今後、破骨細胞と骨芽細胞を用い、それぞれの細胞に対する β -グルカンの作用を解析するとともに、種々の異なる β -グルカンを使用した今後の研究の成果が待たれる。

本研究により、TLR2 ヘテロ二量体リガンドにより骨吸収を誘導し、骨量を減少させることを明らかにした。すなわち、TLR4 リガンドに加え、TLR2 ヘテロ二量体リガンドの歯周病惹起、進行への関与が示唆された。茶カテキンの一種である EGCG が TLR2 ヘテロ二量体リガンドによる骨吸収を抑制することを明らかにし、カテキンが炎症性骨吸収を呈する骨疾患、歯周病などの病態改善効果を有する可能性が示唆された。 β -グルカンは、TLR2 ヘテロ二量体リガンドによる骨吸収を抑制したことから、TLR2 シグナルへの関与が示唆されたが、その作用機序は明確であるとはいえず、今後詳細に検討する必要がある。