

(様式5)

指導教員 承認印	主	副	副
	Ⓜ	Ⓜ	Ⓜ

2018年2月14日

Year Month Day

学 位 (博 士) 論 文 要 旨

論文提出者 Ph. D. Candidate	生物システム応用科学府 共同先進健康科学専攻 (博士課程) 平成 <u>25</u> 年度入学(Your Entrance Fiscal Year) 氏名 <u>相沢 真紀</u> Ⓜ (Your Name(Family, First) and Seal)				
主指導教員 氏 名 Chief Advisor's Name	宮浦 千里	副指導教員 氏 名 Vice Advisor's Name		副指導教員 氏 名 Vice Advisor's Name	
論文題目 Title	天然由来因子による TLR 誘導性の炎症性骨代謝の制御				
<p>骨組織は、破骨細胞による骨吸収（骨破壊）と骨芽細胞による骨形成のバランスにより骨量が維持されており、骨のリモデリングと呼ばれる。骨粗鬆症による骨折が寝たきりの原因となることから高齢者の健康維持と疾病予防は重要な課題であり、骨粗鬆症治療薬の開発が進められている。近年、食品機能の研究開発は世界的に広がっており、天然由来因子における機能性研究が注目されている。当研究室では、これまでに歯周病や閉経後骨粗鬆症など、骨代謝疾患における柑橘由来フラボノイドやカロテノイド類の機能性を報告してきた。歯周病などに伴う炎症性骨破壊には、グラム陰性細菌由来の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (Lipopolysaccharide: LPS) が、プロスタグランジン E2 など炎症性サイトカインを産生亢進することにより炎症性骨吸収を誘導する。しかし、フラボノイドなど天然由来物質の骨代謝調節作用や Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) の経路に及ぼす制御機構は明らかになっていない。</p> <p>本研究では、茶カテキンの主要成分であるエピガロカテキン-3-ガレート (Epigallocatechin-3-gallate: EGCG) およびキノコから真菌まで生物界に広く存在するβ-グルカンに焦点をあて、TLR 誘導性の炎症性骨代謝に及ぼす影響を検討した。EGCG およびβ-グルカンは異なる構造骨格を有するが、骨代謝調節における両因子の役割を明らかにできれば、構造活性相関などの視点から天然由来物質の作用機構の解明につながり、その研究意義は大きい。</p> <p>第2章では、ヘテロ二量体を形成する TLR2 誘導性の骨吸収に及ぼす EGCG の作用を検討した。マウス初代骨芽細胞および骨髄細胞の共存培養系において TLR1/2 および TLR2/6 リガンドを処理したところ、破骨細胞および PGE2 産生が顕著に増加した。一方、EGCG を併用したところ、TLR1/2 および TLR2/6 リガンド処理群共に破骨細胞数の有意な低下が認められ、EGCG が TLR2 誘導性の炎症性骨吸収を抑制することが示唆された。続いて、高齢者の健康維持に深く関わる閉経後骨粗鬆症における EGCG の役割を明らかにするため、閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出術 (OVX) マウスを用いて、カテキン類の経口投与による効能評価を検討した。OVX モデルマウスに EGCG 含有飲料水の経口投与を行ったところ、OVX により著しく低下した骨密度は EGCG により有意な回復効果を示さなかったことから、EGCG より腸管吸収効率が高いことが報告されているメチル化 EGCG に着目し、検討を行った。その結果、OVX マウスにおいて、メチル化 EGCG の経口投与により骨量の改善効果が認められた。しかし、メチル化 EGCG による体重および子宮重量への影響は認められなかったことから、生殖器への影響を示さない、骨組織特異的な骨量増加作用を示す可能性が示唆された。さらに、OVX を施していない偽手術マウスのメチル化 EGCG 投与群において、骨量増強作用が観察されたことから、EGCG が骨吸収抑制作用のみならず、骨形成作用を有する可能性が示唆された。本研究により、飲料水の</p>					

経口投与による骨量改善効果が認められたことから、*In vitro* のみならず *In vivo* 実験双方における茶カテキンの骨代謝調節制御が明らかとなり、ヒト試験への応用展開につながる基盤研究の一つになる可能性が示唆された。

第3章では、TLR2 リガンド誘導性骨吸収に及ぼす β -グルカンの作用を検討した。 β -グルカンは生物界に広く分布しており、その存在形態は多様でカビ、キノコ、酵母、菌類、海草、穀物、真菌の細胞壁の構成成分として存在する。 β -グルカンは高分子であるが、細胞内で低分子化され、様々な免疫応答を活性化させる。また、分子量、構造の違いにより免疫応答の活性化能が大きく異なることが知られている。本研究では、節足動物における β -グルカンの作用機序の先行研究から、低分子 β -グルカンに着目し、炎症性骨吸収に及ぼす影響を検討した。低分子 β -グルカンは、可溶性且つ低分子直鎖 β -グルカンを独自に作成し、実験に用いた。マウス初代骨芽細胞および骨髓細胞の共存培養系において TLR2/6 リガンドを処理したところ、破骨細胞数が上昇し、低分子 β -グルカンの併用添加により、濃度依存的に低下した。次に、頭頂骨器官培養において、低分子 β -グルカンの炎症性骨吸収に及ぼす作用を検討した。その結果、TLR2/6 リガンドにより亢進した骨吸収が低分子 β -グルカンの併用添加により有意に抑制されることが明らかとなった。本研究により、低分子 β -グルカンは、TLR2 リガンドとの競合結合による TLR2 シグナルの制御、または β -グルカンの受容体であるデクチン-1 に結合し、TLR2 シグナル経路の阻害作用を引き起こす可能性が示唆された。

本研究成果から、異なる構造骨格を有するカテキンおよび多糖類が、骨代謝において同様の炎症性骨吸収抑制作用を有すること、さらにグラム陽性細菌由来の TLR2 シグナル経路に対し制御作用を持つことが示唆された。今後、これら機能性成分の作用点を解明すると共に、構造活性相関や骨格構造の異なる機能性成分の組み合わせ摂取による治療・予防効果の評価が期待される。

(英訳) ※和文要旨の場合(300 words)

We examined the effects of Epigallocatechin Gallate (EGCG), the major component of green tea catechins, on inflammatory bone resorption.

In co-cultures of mouse bone marrow cell, PGE₂ production and TLR2 heterodimer induced bone resorption was clearly suppressed by EGCG

Since it is a negative regulator of osteoclast differentiation, EGCG has a beneficial effect on the maintenance of bone mass and may prevent bone loss due to inflammation.

Methylated catechin showed a restoration of bone density in mice. In addition, this study suggests the bone mass recovery effect on the density of abundant cancellous bone in the cortical bone constituting the bone stem and the distal part.

On the other hand, β -glucan under the coexistence of osteoblast and bone marrow cell suppressed osteoclast enhancement. TLR 2/6 clearly promoted osteoclast formation hyperplasia under the organ culture condition of the skull tube, whereas IL-1 had no suppressive effect. Aligned with the results of co-cultivation, β -glucan suppressed osteoclastogenesis proportionally to the dose. β -glucan at high concentrations completely inhibited osteoclast enhancement. Even under the culture conditions of primary mouse osteoblasts, both TLR 2/6 and LPS suppressed the expression of RANKL. The expression levels of OPG and M-CSF, which inhibit the binding of RANKL-RANK and suppress the differentiation of osteoclasts, were not suppressed.

In this study, the inhibitory effect of TLR-induced inflammatory bone resorption enhancement by two kinds of factors, EGCG and low molecular β -glucan derived from natural products useful for humans, was revealed and we want to contribute to the improvement of QOL