

ふりがな氏名	のさか こう 野阪 興
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	乙 第 1590 号
学位授与の日付	平成 26 年 12 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項に該当
学位論文題目	IL-17A inhibits osteoclast differentiation of RANKL-stimulated RAW 264.7 cells by suppressing JNK phosphorylation and c-Fos expression (IL-17A は JNK リン酸化と c-Fos 発現を抑えることにより RANKL 刺激された RAW264.7 細胞の破骨細胞分化を抑制する)
学位論文掲載誌	Journal of Osaka Dental University 第 48 巻 第 2 号 平成 26 年 10 月
論文調査委員	主査 西川 泰央 教授 副査 大浦 清 教授 副査 池尾 隆 教授

### 論文内容要旨

歯槽骨は他の骨と同様、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収により絶えずリモデリングされている。歯周病では、骨吸収が骨形成を上回るため歯槽骨量が減少する。しかし、歯槽骨の骨吸収メカニズムは部分的にしか解明されていない。IL-17A は骨芽細胞上の receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) 発現を誘導し、破骨細胞分化に対して間接的に作用することが知られている。しかし、破骨細胞前駆細胞に対する IL-17A の直接的な影響は不明である。そこで私たちは、破骨細胞前駆細胞 RAW264.7 細胞に対する IL-17A の直接的な影響について検討した。RAW264.7 細胞 ( $3.0 \times 10^3$  cells/well) を 96well plate に播種し、10 ng/mL RANKL と各種濃度の IL-17A (5, 10, 20 ng/mL) 刺激を加えて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 3 日間培養した。10% ホルマリンに続きアセトン:エタノール(1:1)にて固定後、5 mL の TRAP buffer に 24 mg の基質(p-ニトロフェニルリン酸 2 ナトリウム)を溶解した基質液を 50  $\mu$ L/well 加えて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 10 分間反応させた。50  $\mu$ L/well の停止液(0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液)を加え、呈色後 405 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。その結果、無刺激と比較して RANKL 刺激により破骨細胞への分化は著明に促進された。しかし、この促進は IL-17A の濃度依存性に抑制された。また、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤である SP600125 (1, 5, 10  $\mu$ M) で細胞を前処理した後、同様の破骨細胞分化実験を行ったところ、SP600125 の濃度依存性に破骨細胞分化が抑制された。RAW264.7 細胞 ( $2.0 \times 10^6$  /sample) に RANKL (10 ng/mL), IL-17A (10, 50, 100 ng/mL) を加え、それぞれの条件下にて刺激後、細胞を可溶化してウエスタンブロット法にてリン酸化 JNK の検出を行った。RANKL 刺激により JNK のリン酸化は活性化されたが、この RANKL 刺激による JNK のリン酸化は IL-17A 刺激により減弱した。RAW264.7 細胞 ( $2.0 \times 10^5$  cells/well) を 12well

plate に播種し 10 ng/mL RANKL と各種濃度の IL-17A 刺激(10, 50, 100 ng/mL)を加えて 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 6 時間培養した. 刺激後, 細胞を可溶化してウエスタンブロット法にて c-Fos の検出を行った. RANKL 刺激により c-Fos の発現が増強された. しかし, この RANKL 刺激による c-Fos の発現増強は IL-17A 刺激により減弱した. 以上の結果より, IL-17A は, 破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞の RANKL 刺激による破骨細胞への分化に対して, 直接的に影響を及ぼすことでその分化を抑制していることを確認した. また, この IL-17A による分化の抑制には, JNK と c-Fos が関与している可能性が示唆された.

## 論文審査結果要旨

歯槽骨は他の骨と同様, 骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収により絶えずリモデリングされている. 歯周病では, 骨吸収が骨形成を上回るため歯槽骨量が減少する. しかし, 歯槽骨の骨吸収メカニズムは部分的にしか解明されていない.

著者は, 破骨細胞分化に影響を与えるとされている Interleukin 17-A (IL-17A) を用い, 破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞に対する IL-17A の直接的な影響を調べている.

破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) 刺激により破骨細胞への分化は著明に促進されるが, この促進は IL-17A の濃度依存性に抑制されること, また c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤である SP600125 で細胞を前処理した後, 同様の破骨細胞分化実験を行い, SP600125 の濃度依存性に破骨細胞分化が抑制されることを明らかにした.

RAW264.7 細胞に RANKL, IL-17A を加え, それぞれの条件下にて刺激後, 細胞を可溶化してウエスタンブロット法にてリン酸化 JNK の検出を試み, RANKL 刺激により JNK のリン酸化は活性化されるが, この RANKL 刺激による JNK のリン酸化は IL-17A 刺激により減弱すること, さらに RAW264.7 細胞に RANKL と各種濃度の IL-17A 刺激を加えて細胞を可溶化し, ウエスタンブロット法にて c-Fos の検出を行ったところ, RANKL 刺激により c-Fos の発現が増強するが, この RANKL 刺激による c-Fos の発現増強は IL-17A 刺激により減弱することを明らかにしている.

以上のことから, IL-17A は, 破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞の RANKL 刺激による破骨細胞への分化に対して, 直接的に影響を及ぼすことでその分化を抑制していることを明示するとともに, この IL-17A による分化の抑制には, JNK と c-Fos が関与している可能性を見出した点で, 本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した.

なお, 外国語 1 か国 (英語) について試問を行った結果, 合格と認定した.