

分担研究報告書 芳香族炭化水素受容体を介した骨代謝制御機構に関する研究

研究分担者 藤原 稔史 九州大学整形外科 助教

研究要旨 AhR は骨代謝を制御する破骨細胞と骨芽細胞の分化に従い発現が増加し、ベンゾピレンはこれらの分化を阻害する。

A. 研究目的

油症被害者の高齢化に伴い、骨粗鬆症との関連が注目されている。骨は骨形成を行う骨芽細胞と骨吸収を行う破骨細胞のバランスによって骨代謝を制御しており、正常な骨代謝制御が骨量と骨質の維持に重要である。エストロゲンやステロイドなどのホルモンや環境因子など、様々な因子が影響している。

ダイオキシンが結合する芳香族炭化水素受容体 (AhR) は骨芽細胞と破骨細胞の両者に発現しており、細胞の増殖や分化に関与していることが報告されている。In vitro では骨芽細胞と破骨細胞は AhR 刺激で分化が抑制もしくは促進する報告があり、統一見解は得られていない^{1,2)}。AhR のアゴニストのタビナロフが皮膚の炎症に対して抗炎症効果を示し、臨床応用されており³⁾、AhR を介した骨代謝制御機構は新たな骨粗鬆症治療にも繋がる。そこで、本研究では破骨細胞と骨芽細胞における AhR の役割と AhR に作用する薬剤を調べることで新たな治療戦略とする。

B. 研究方法

8~12 週齢の C57BL/6J マウスの長管骨を採取し、骨髓細胞を回収する。

①破骨細胞培養

骨髓細胞を M-CSF100ng/mL と 3 日間共培養し、単球系細胞 (BMM) へ誘導し、M-CSF100ng/mL と RANKL100ng/mL を共培養し、破骨細胞分化を誘導し、前破骨細胞 (pOC) から通常 4~5 日で成熟破骨細胞 (mOC) に分化する。

②骨芽細胞培養

骨髓細胞をアスコルビン酸と共に培養し、2~3 週ほどかけて骨芽細胞へ培養する。

③破骨細胞と骨芽細胞に対する AhR アゴニスト刺激における影響

破骨細胞分化は TRAP 染色で評価、mRNA 発現をリアルタイム PCR で確認し、蛋白をウェスタンプロットで確認した。AhR アゴニストの影響を評価した。

C. 研究結果

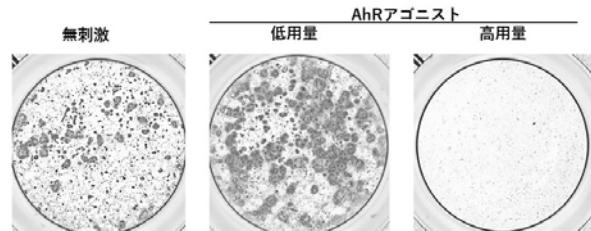


図1：TRAP染色による破骨細胞分化評価

破骨細胞分化において AhR アゴニストを低用量加えると破骨細胞分化は増加傾向を示し、高用量を加えると抑制された（図 1）。破骨細胞分化に関わる遺伝子 (NFATc1 と カテプシン K) を評価すると、破骨細胞分化に従い、これらの遺伝子発現は上昇するが、AhR アゴニストを加えると発現は低下しており、分化が抑制されていることを示された（図 2）。図 3 に示すように、蛋白の評価をウェスタンプロットで行ったが、AhR 発現はアゴニストを加えてても変化はないものの、その下流の CYP1A1 発現は低下していた。NFATc1 と カテプシン K の発現もアゴニスト刺激で低下しており、AhR への反応後に CYP1A1 発現が低下し、破骨細胞分化を抑制していることが考えられた。

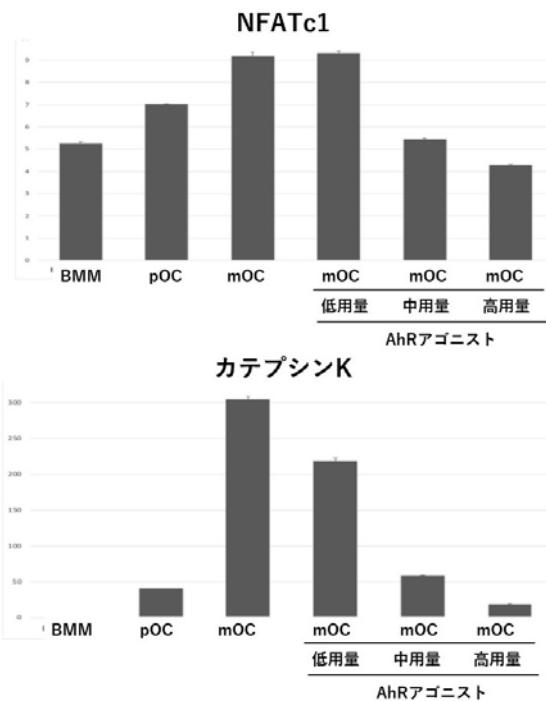


図2：リアルタイムPCRによる破骨細胞の遺伝子変化、単球（BMM）、前破骨細胞（pOC）、成熟破骨細胞（mOC）、AhRアゴニスト刺激

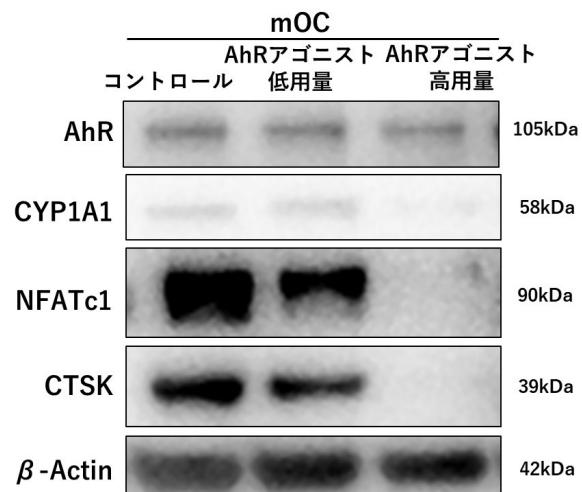


図3：ウェスタンブロット

AhR アゴニストによる破骨細胞分化抑制効果を示したが、続いて骨芽細胞への効果を調べた（図4）。AhR アゴニストを同様



図4：TRAP染色による破骨細胞分化評価

に加えたが、骨芽細胞では抑制されなかつた。

D. 考察

AhR の破骨細胞への制御機構はまだ不明な点が多い。今回使用した AhR アゴニストは高用量で破骨細胞分化を抑制し、その濃度では骨芽細胞分化を抑制しなかった。つまり破骨細胞のみを抑制し、骨芽細胞に影響を及ぼさない薬剤であり、今後更に *in vivo* を含めた詳細なメカニズムを調べる必要がある。新たな治療戦略の確立を目指す。

E. 結論

AhR アゴニストは破骨細胞分化を制御しており、今後解析を続け、骨粗鬆症治療への応用につながる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 引用文献

- 1) 福士純一、岩本幸英：福岡医誌 2011, ダイオキシン類と骨代謝
- 2) Park R, et. al: Cells 2020, The Role of Aryl-Hydrocarbon Receptor (AhR) in Osteoclast Differentiation and Function
- 3) Smith SH, et. al: J invest Dermatol 2017, Tapinarof is a natural AhR agonist that resolves skin inflammation in mice and humans.