

研究者：古賀 絢雅（所属：九州歯科大学大学院 歯学研究科 口腔健康学分野）

研究題目： β -glucan による NFATc1 の発現調節を介した破骨細胞分化抑制の分子メカニズムの解明

目的：

国民病とも言える歯周病の研究において歯の喪失に繋がる歯槽骨吸収を起こす破骨細胞の制御が注目されている。破骨細胞は血液幹細胞に由来するため、いくつかの免疫受容体を細胞表面に発現している。これらの免疫受容体は破骨細胞の分化制御に関与することが分かっている。

これまでに破骨細胞前駆細胞に発現する認識受容体である dectin-1 は糖鎖 β -glucan と結合し、破骨細胞の分化のマスター因子である NFATc1 の発現を抑制し、破骨細胞の分化を負に調節することが報告されている。そこで、本研究では NFATc1 の抑制に関わる詳細な分子機構の解明を行う。

対象および方法：

破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞及び dectin-1 過剰発現株 d-RAW 細胞、コントロール株の c-RAW 細胞を用いる。破骨細胞分化誘導系に対する β -glucan の1つである curdlan による NFATc1 発現抑制の分子機構について① NFATc1 のネガティブレギュレーターの発現修飾および② NF- κ B 経路の活性化修飾の2点を検討する。①では、破骨細胞分化誘導時の NFATc1 のネガティブレギュレーター遺伝子発現を real-time RT-qPCR 法により分析する。一方②では NFATc1 の発現誘導に関わる NF- κ B 経路の活性化レベルへの curdlan の影響について Western blotting を主軸としたタンパクレベルでの解析を行う。

結果および考察：

NFATc1 は破骨細胞前駆細胞膜上の RANK に対する RANKL の結合刺激により誘導され、その後自己増幅を介してその発現が亢進する。この一連の機構は NFATc1 の負の調節因子である、IRF8、MafB、Bcl6、Blimp-1 によって調節される。そこで、d-RAW 細胞を用いて各関連分子の遺伝子発現量を RT-qPCR 法を用いた遺伝子発現解析で調べたところ、RANKL による NFATc1 の発現誘導は curdlan 添加群では抑制される一方、Blimp-1 や IRF8、MafB、Bcl6 の発現に対する影響は観察されなかった。このことから、curdlan による NFATc1 の発現抑制に Blimp-1 および Blimp-1 により調節される NFATc1 の転写抑制因子は関与しないことが示唆された。

次に、NF- κ B 経路の活性化に関する curdlan の影響について調べた。NF- κ B は種々の刺激によって活性化され、免疫応答、炎症などの生理作用を発揮する。NF- κ B には5つの分子が存在し、その中で NFATc1 の初期誘導に関わる転写因子の p65 は、定常状態では抑制因子である I κ Ba と結合し細胞質に局在している。破骨細胞分化誘導時、RANKL 刺激による活性化に伴い I κ Ba がユビキチン化し、プロテアソームにより分解されると p65 は核内へ移行し、NFATc1 の

転写を促進する。Western blotting 分析の結果から、d-RAW 細胞において、RANKL によって誘導される NF- κ B p65 の核内移行が curdlan 添加群では抑制されていた。この抑制作用について dectin-1 の関与を決定するために、d-RAW 細胞と c-RAW 細胞を比較したところ、c-RAW 細胞においても curdlan は p65 の核内移行を抑制した。

加えて、RAW 細胞においても d-RAW 細胞と同様に curdlan 添加により RANKL 誘導下の NF- κ B p65 の核内移行が抑制された。RAW 細胞は、d-RAW 細胞と比較して dectin-1 発現量が極めて少ないことから、curdlan による抑制作用は dectin-1 受容体を介さない可能性が示唆された。また I κ B α の分解についても確認したところ、curdlan によって I κ B α の分解が抑制された。以上の結果から、curdlan による NF- κ B 活性化経路の抑制は、dectin-1 以外の受容体との結合を介して生じる可能性が推測された。

最後に curdlan による RANKL 誘導下の I κ B α の分解抑制に関わる dectin-1 以外の β -glucan の受容体同定を試みた。これまでに補体受容体 CR3 などが β -glucan の受容体として報告されている。CR3 は CD11b/CD18 からなるインテグリン二量体で、単球、マクロファージ、樹状細胞、好中球、NK 細胞などの造血幹細胞に広く発現している。CR3 の CD11b は β -glucan 結合活性を有することが報告されている。そこで、CR3 の構成分子である CD11b を中和抗体でブロッキングしたところ、curdlan による I κ B α タンパクの分解抑制効果が解除された。この結果から、curdlan による NF- κ B 経路の活性化阻害は CR3 との結合を介して誘導されることが示唆された。

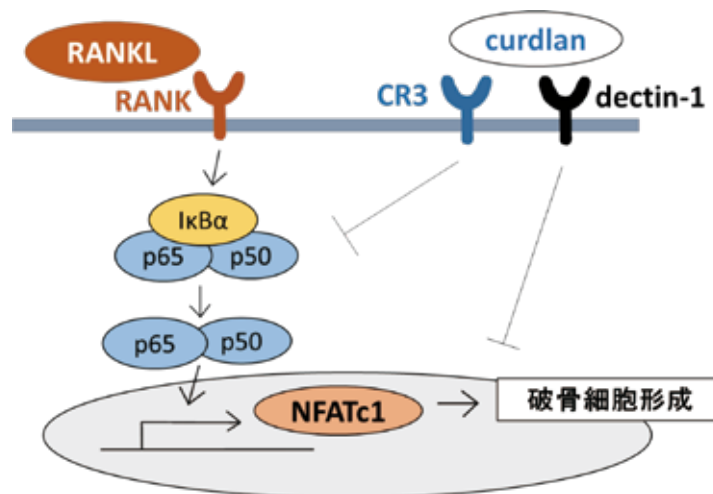


図1 研究の概要

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・第 65 回 歯科基礎医学会にてポスター発表を行った。
- ・また、研究成果をとりまとめ学術雑誌へ投稿する予定である。