

氏 名	本行 令奈		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	歯 学		
学位授与番号	博甲第7007号		
学位授与の日付	令和6年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	ADAM-Notch シグナル伝達経路を介した破骨細胞分化のメカニズムの解明		
論文審査委員	久保田 聡 教授	寺町 順平 准教授	井澤 俊 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周病は、口腔細菌叢の dysbiosis によって発症・進行する炎症性疾患であり、歯槽骨の吸収が特徴である。その際に出現する破骨細胞の分化には骨芽細胞等が発現する receptor activator NF- κ -B ligand (RANKL) シグナル経路が重要であるが、近年では細胞間の情報伝達を担う Notch シグナル経路の関与が示唆されている。

Notch シグナルは、細胞膜表面に存在する 5 種のリガンド (JAGGED1, 2, Delta-like1, 3, 4) と 4 種の受容体 (NOTCH1, 2, 3, 4) が結合した後に a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10, ADAM17 や γ -secretase といった酵素によって切断された受容体の細胞内ドメインが核内へ移行することで、標的遺伝子の転写へと繋がっている。近年では、ADAM10 を介した Notch シグナル伝達経路 (ADAM-Notch シグナル伝達経路) と破骨細胞形成との関連が報告されているが、ADAM-Notch シグナルの破骨細胞分化への関与は不明な点が多い。

本研究では、ADAM-Notch シグナルに関連する分子から RANKL 誘導性の破骨細胞分化に影響する分子を *in vitro* で探索した。さらに、絹糸結紮歯周炎による歯槽骨吸収誘導モデルマウスを用いて、歯周炎組織下での ADAM17 が破骨細胞形成に及ぼす影響を *in vivo* で検討した。

【材料と方法】

In vitro : 野生型マウス (C57BL/6J, 12 週齢, 雄) から得た骨髓由来単球細胞を、骨髓由来マクロファージ様細胞へ分化誘導した。ADAM17 阻害剤 (KP-457, 1–1,000 μ M), ADAM10 阻害剤 (GI254023X, 1–1,000 μ M), JAGGED1 中和抗体 (1–320 mg/mL) を添加し、24 時間後に細胞毒性試験を行った。また、分化誘導した骨髓由来マクロファージ様細胞に M-CSF と RANKL を 50 ng/mL ずつ添加した。その後に RANKL 添加から全 RNA (2, 4, 8, 12, そして 24 時間後) と全タンパク質 (4, 8, 12, 24, そして 48 時間後) を回収し、Notch シグナル関連遺伝子 (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Notch4*, *Jagged1*, *Jagged2*, *Dll1*, *Dll3*, *Dll4*), 切断酵素遺伝子 (*ADAM10* と *ADAM17*), 破骨細胞分化関連遺伝子 (*nuclear factor of activated T cells 1 : Nfatc1*, *dendrocyte expressed seven transmembrane protein : Dc-stamp*) の発現は real time-PCR 法で、NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, JAGGED1 のタンパク質産生は Western blot 法で解析した。

さらに、JAGGED1 中和抗体 (145 mg/mL), GI254023X (194 μ M) もしくは KP-457 (350 μ M) を破骨細胞様細胞への分化誘導開始と同時に添加し、添加から 5 日後に酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を用いて破骨細胞様細胞数を計測した。統計解析は、Student's *t*-test と One-way ANOVA Tukey-Kramer 法を用いた。(承認番号: OKU-2020331)

In vivo : 野生型マウス (C57BL/6J, 12 週齢, 雄) の上顎左側第二大臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、歯周炎モデルを作製した。結紮時に口蓋歯肉に KP-457 (354 μ M) を 6 μ L 投与した。その 4 日後に歯肉組織と顎骨を採取し、軟組織中の *Nfatc1* と *Trap* の発現を real time-PCR 法で、口蓋根周囲の歯槽骨吸収窩に存在する破骨細胞様細胞を TRAP 染色で調べた。統計解析は、One-way ANOVA Tukey-Kramer 法を用いた。(承認番号: OKU-2021866)

【結果】

In vitro : RANKL 添加群では RANKL 未添加群と比較して、RANKL 添加の 2-4 時間後には *Notch2* と *Jagged1* の発現量が増加し、24 時間後には *Nfatc1* と *Dc-stamp* の発現量が増加した。両群で、*Adam10* と *Adam17* の両方は発現していた。RANKL 添加 4-24 時間後の NOTCH2 の、そして 4-12 時間後の JAGGED1 の産生は、有意に増加した。90 % の細胞生存能を示す濃度が、JAGGED1 中和抗体では 145 mg/mL, GI254023X では 194 μ M, そして KP-457 では 354 μ M であった。JAGGED1 中和抗体では破骨細胞様細胞が有意に減少した。KP457 では破骨細胞様細胞数が有意に減少したが、GI254023X では変化しなかった。

In vivo : KP-457 投与群では、非投与群と比較して、*Nfatc1* の発現は有意に減少し、破骨細胞様細胞数は有意に減少した。

【考察】

In vitro で、RANKL 誘導性の破骨細胞分化と Notch シグナル伝達経路が関与するか検討したところ、RANKL 添加群で *Jagged1* と *Notch2* は *Nfatc1* と *Dc-stamp* の発現よりも早期に発現することが明らかになった。同様に NOTCH2 と JAGGED1 のタンパク質産生量も早期に増加した。さらに、JAGGED1 中和抗体と ADAM 阻害剤の破骨細胞様細胞形成に及ぼす影響を検討したところ、JAGGED1 中和抗体は RANKL 誘導性の破骨細胞分化を有意に抑制し、ADAM17 阻害剤の KP-457 も破骨細胞分化を有意に抑制したが、ADAM10 阻害剤の GI254023X では変化しなかった。従って、RANKL 作用後に NOTCH リガンドである JAGGED1 と受容体である NOTCH2 が極早期に産生され、ADAM17 を介した NOTCH2 受容体の切断が生じ、NOTCH2 の細胞内ドメインが核内に移行することで破骨細胞分化が生じる可能性がある。

その結果から、*in vivo* で、歯周炎組織下での ADAM17 が破骨細胞形成に及ぼす影響を検討したところ、KP-457 投与群は KP-457 非投与群と比較して *Nfatc1* の発現量は有意に減少し、破骨細胞数は有意に減少した。従って、ADAM17 を介した Jagged1-Notch2 シグナル伝達経路が破骨細胞形成に関与していると考えられる。

本研究の限界として、Notch シグナル活性化後から細胞融合までの破骨細胞形成における制御機構については不明である。また、ADAM17 が作用するシグナル分子によって破骨細胞の形成に及ぼす影響が異なることが知られているが、本研究では Notch シグナル伝

達経路以外のADAM17が関与する可能性のある経路は考慮されておらず、ADAM17がNotchシグナル伝達経路以外の経路に作用し、破骨細胞の形成に影響を及ぼした可能性は否定できない。今後の課題として、DNAマイクロアレイを用いて破骨細胞形成時におけるADAM17やJAGGED1と関与する遺伝子を検討し、制御機構を解明することやADAM17が他の経路に関与しているかさらなる検討が必要である。

【結論】

ADAM-Notchシグナル伝達経路がRANKL誘導性の破骨細胞分化を促進する際には、分化過程の極早期にNotchシグナル受容体NOTCH2とリガンドJAGGED1が発現して、その後にADAM17が作用すると破骨細胞分化が促進されるという新たな一経路を解明できた。

論文審査結果の要旨

【緒言】歯周病は、歯槽骨吸収を特徴とした炎症性疾患である。その際に出現する破骨細胞の分化には receptor activator of NF- κ -B ligand (RANKL) シグナル経路が重要であるが、近年では Notch シグナル経路の関与が示唆されている。Notch シグナルの活性化は、5 種のリガンド (JAGGED1, 2, Delta-like1, 3, 4) と 4 種の受容体 (NOTCH1, 2, 3, 4) の結合後に a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 10, ADAM17 や γ -secretase といった酵素によって切断された受容体の細胞内ドメインが核内へ移行することで生じる。しかし、ADAM-Notch シグナルの破骨細胞分化への関与は不明な点が多い。本研究では、ADAM-Notch シグナルに関連する分子から破骨細胞分化に影響する分子を探索した。さらに、絹糸結紮歯周炎モデルマウスを用いて、歯周炎組織下での ADAM17 が破骨細胞形成に及ぼす影響を検討した。

【方法】*In vitro* では、雄性マウスの骨髄由来マクロファージ様細胞を用いて ADAM17 阻害剤 (KP-457), ADAM10 阻害剤 (GI254023X), JAGGED1 中和抗体の細胞生存能への影響を調べた。また、骨髄由来マクロファージ様細胞に RANKL を添加後の Notch シグナル関連遺伝子, 切断酵素遺伝子, 破骨細胞分化関連遺伝子の発現と対応するタンパク質産生を解析した。さらに、JAGGED1 中和抗体, GI254023X もしくは KP-457 を破骨細胞様細胞への分化誘導と同時に添加した後、TRAP 染色を用いて破骨細胞様細胞数を計測した。*In vivo* では、絹糸結紮歯周炎モデルマウスに KP-457 を投与後、*Nfatc1*, *Trap* の発現量と破骨細胞様細胞数を調べた。

【結果】*In vitro* では RANKL 未添加群と比較し添加群では、添加 2-4 時間後には *Notch2* と *Jagged1* の発現量が増加し、24 時間後には *Nfatc1* と *Dc-stamp* の発現量が増加した。両群で、*Adam10* と *Adam17* の両方は発現していた。RANKL 未添加群と比較し、添加 4-24 時間後の NOTCH2 の、そして 4-12 時間後の JAGGED1 の産生は有意に増加した。90%の細胞生存能が、JAGGED1 中和抗体では 145 mg/mL, GI254023X では 194 μ M, そして KP-457 では 354 μ M であった。以上の濃度で JAGGED1 中和抗体と KP457 では破骨細胞様細胞が有意に減少したが、GI254023X では変化しなかった。*In vivo* で KP-457 投与群では、*Nfatc1* の発現量と破骨細胞様細胞数は有意に減少した。

【考察】RANKL 作用後に Notch リガンドである JAGGED1 と受容体である NOTCH2 が極早期に産生され、ADAM17 を介した NOTCH2 受容体の切断が生じ、NOTCH2 の細胞内ドメインが核内に移行することで破骨細胞分化が促進されると考えられる。

本研究では、破骨細胞の分化過程の極早期に ADAM17 を介した Jagged1-Notch2 シグナルが関与する可能性を *in vitro* で示し、*in vivo* では生体内でも ADAM17 が破骨細胞形成の関与を示唆する初見を得た。得られた結果は新規性に富んでおり、破骨細胞分化における Notch シグナルの役割を解明する上で重要な知見である。

よって本審査委員会は、本申請論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。