

氏名	堀部 寛治
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第184号
学位授与の日付	2014年3月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	Roles of Cathelicidin-related Antimicrobial Peptide in Murine Osteoclastogenesis (マウス破骨細胞形成における抗微生物ペプチド Cathelicidin-related antimicrobial peptide (CRAMP) の役割)
指導教員	(主) 教授 宇田川 信之 (副) 教授 高橋 直之 (副) 准教授 小林 泰浩 (副) 准教授 中村 美どり
論文審査委員	主査 教授 川上 敏行 副査 教授 平岡 行博 副査 教授 藤井 健男

## 学位論文の内容の要旨

【目的】 Cathelicidin-related antimicrobial peptide (CRAMP)はマウスにおいて発現している抗微生物ペプチドである。CRAMPは、lipopolysaccharide (LPS)と結合することでLPSの活性を中和する。CRAMPは骨髄において高い発現レベルを示す。また、CRAMPは炎症性および感染性の刺激によって発現が亢進すると報告されている。そこで、マウスの破骨細胞形成におけるCRAMPの役割について検討を行った。

【結果と考察】 マウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系において、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ )などの破骨細胞形成促進因子および、LPSやFlagellinなどのToll like receptor (TLR)リガンドは、骨芽細胞における破骨細胞分化因子receptor activator of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  ligand (RANKL)の発現を誘導することによって破骨細胞分化を誘導する。骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系において、CRAMPはLPSとFlagellinが誘導する破骨細胞形成を抑制した。一方で、CRAMPは $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、 $\text{PGE}_2$ が誘導する破骨細胞形成を抑制しなかった。CRAMP単独では破骨細胞形成に効果を示さなかった。また、骨髄マクロファージ ( $\text{BMM}\phi$ )において、CRAMP受容体 folmyl peptide receptor 2 (FPR2)は高レベルで発現していた。しかし、 $\text{BMM}\phi$ 単独培養系におけるRANKL誘導性の破骨細胞分化に対して、CRAMPは抑制効果を示さなかった。CRAMPはLPSおよび、Flagellinが誘導する骨芽細胞におけるRANKL mRNA発現上昇および、単球・マクロファージ系細胞における炎症性サイトカインtumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 産生をそれぞれ抑制した。これらの結果から、CRAMPと、その受容体であるFPR2との結合は破骨細胞形成に関与しておらず、CRAMPは直接、LPSおよびFlagellinと反応し、その活性を阻害することが示唆された。LPSおよびFlagellinの刺激によって、骨芽細胞におけるCRAMP mRNAの発現レベルは著しく上昇した。細胞

外からのCRAMP添加は、LPSおよびFlagellinが誘導する骨芽細胞におけるCRAMP発現上昇を抑制した。これらの結果はLPS、FlagellinによるCRAMP産生は、CRAMPによるネガティブフィードバック機構により抑制されていることが示唆される。

【結論】細菌感染によって惹起される炎症性骨吸収疾患において、CRAMPは骨芽細胞から分泌される防御因子である可能性が示された。

なお、本論文はImmunology誌（140 巻11 月号 344-351 頁）にて印刷公表済みである。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究はマウスの細胞を用いて、破骨細胞形成に対するCRAMPの効果および、骨組織細胞におけるCRAMP mRNA発現について検討を行ったものである。その結果、CRAMPは生理的な骨吸収促進因子である  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  および  $\text{PGE}_2$  が誘導する破骨細胞形成に対して影響を示さなかったが、細菌の菌体成分であるLPSおよびFlagellinが誘導する破骨細胞形成や炎症性サイトカイン産生を有意に抑制した。また、LPS、Flagellinを含めた各種TLRリガンド刺激は骨芽細胞におけるCRAMP mRNA発現レベルを著しく上昇させることを報告している。これらの結果から、骨芽細胞は感染性刺激に応答してCRAMPを産生・分泌し、骨吸収をはじめとした炎症性反応を抑制している可能性があるという興味深い結論を導き出した。本研究における仮説と実験手法は妥当であり、得られた結果は結論を支持するものであった。また、この研究における、マウスを用いた実験系は松本歯科大学動物実験委員会が定める動物実験取扱規程を遵守し、ヒト由来細胞を用いた実験系は松本歯科大学倫理委員会の承認を得て行われている（承認番号：0089）。

本論文は本学大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学専攻の学位論文として、基礎歯科医学のみならず、将来的に臨床分野への応用につながる可能性を含んだ意義のある研究であると評価した。以上のことより、本論文に学位論文としての価値を認めた。

## 最終試験の結果の要旨

学位申請論文を中心に口頭による試験を行った。主要な質問事項（順不同）は次のとおりである。

1. 学位論文の Supplementary figures の位置付けは何か？
2. タンパク質を構成するアミノ酸配列の相同性と類似性の違いについて説明せよ。
3. 参考論文における実験結果の記述方法について。
4. 本実験結果からの将来的な臨床応用の展望について。
5. CRAMP は間葉系幹細胞の遊走を促進するか？
6. 歯周病などの炎症性骨吸収疾患において、CRAMP の単球・マクロファージ遊走促進作用が病巣部へ破骨細胞前駆細胞をリクルートし、歯周病等の病態を悪化させるのではないか？
7. CRAMP 受容体 FPRL-1 は、単球、破骨細胞前駆細胞、骨芽細胞で発現しているか？
8. FPRL-1 を受容体とする CRAMP はホルミル化しているのか？

9. CRAMP と Flagellin は結合するのか？また LPS の有効濃度を下げるのか？
11. CRAMP の作用機序はリガンドへの影響によるものなのか？
12. 骨芽細胞は LPS 刺激により CRAMP の mRNA 発現が上昇しているが、タンパク発現の変化は？
13. 「LL37 の骨欠損部位における修復促進作用について」を、どのように考えるか？
14. 本実験で CRAMP が骨芽細胞の増殖や分化に影響を与えていたか？
15. 結論において「歯周病などの細菌感染において、骨芽細胞は CRAMP の発現を誘導し、殺菌を行うとともに、炎症性骨吸収も抑制する可能性がある。」と述べているが、それを証明する実際的な実験結果は何か？
16. 感染時における急激な CRAMP 発現上昇のメカニズムは、どのようになっているのか？
17. 炎症・感染時において生体内の骨髄・骨芽細胞では CRAMP/LL-37 の発現レベルは上昇しているのか？
18. 細胞培養実験において、TLR リガンドの濃度に対して、CRAMP の濃度 (30 µg/ml) は高すぎるのではないか？生体内や細胞レベルで、実際にその濃度で作用できるのか？
19. CRAMP の抗微生物作用における標的は、細菌または動物において共通の細胞膜構成成分 (リン脂質) であるが、CRAMP は何故細菌の細胞膜に特異的に作用するのか？
20. CRAMP mRNA の発現レベルが、骨組織において高く認められるのはどのような理由が考えられるか？
21. 骨芽細胞と骨細胞とでは CRAMP の発現に差があるか？
22. 骨芽細胞において LPS 等により誘導される RANKL と CRAMP の発現のバランスについては？

以上の質問に対して、申請者は最新の文献的知見も踏まえて適切な回答した。また、申請者は、実験より得られた結果に対して適切な考察が行える専門的知識があり、博士課程修了者として十分な知識と学力を有しているものと判断された。本審査委員会は、申請者を博士（歯学）として十分な学識を有するものと認定、最終試験合格との結論に至った。