

論文題目

The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting
actin rings of osteoclasts.

ダイナミン阻害剤ダイナソアは破骨細胞のアクチンリングを速やかに破壊することで骨
吸収を抑制する

ぐななさが しるこんだ じゃーだはん

GNANASAGAR THIRUKONDA JANARDHANAN

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

(主指導教員:八上公利 准教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Title

The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting
actin rings of osteoclasts.

GNANASAGAR THIRUKONDA JANARDHANAN

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Associate Professor Kimitoshi Yagami)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

[背景]ダイナミンはエンドサイトーシスに重要な役割を持つ高分子量 GTPase である。ダイナミンは、アクチンが関与する細胞骨格系の制御に必要であると報告されている。破骨細胞は骨吸収を担う多核細胞で、アクチンリングとして観察される明帯を骨面に構築して骨吸収を行う。我々は、これまで破骨細胞の骨格調節に関わる様々な因子の役割を解析してきた。今回、マウス破骨細胞の細胞骨格制御にどのようにダイナミンが関わるかを、ダイナミンの GTPase に対する特異的阻害剤ダイナソアを用いて解析した。また、ダイナソアをマウスに投与して、骨吸収に対するダイナソアの *in vivo* 効果を解析した。

[方法と結果]マウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養により形成された破骨細胞を実験に用いた。①破骨細胞を象牙切片に播種し、ダイナソア存在下あるいは非存在下で培養した。48 時間後、F-アクチン染色によりアクチンリングを観察した。ダイナソアは、アクチンリング形成を濃度依存的に抑制した。ダイナソア 50 μM は破骨細胞の生存は抑制しなかったが、アクチンリングはほぼ完全に消滅した。破骨細胞を除去後、マイヤーのヘマトキシリン液で吸収窩を染色し、吸収窩形成に対するダイナソア的作用を解析した。ダイナソアは吸収窩形成も濃度依存的に抑制した。②Ds-Red を融合させた β -アクチンを発現した破骨細胞を用い、アクチンリングの破壊に対するダイナソアの効果をタイムラプスイメージングにより調べた。その結果、ダイナソアは 30 分以内にアクチンリングを破壊することが明らかになった。③抗ダイナミン抗体を用い、ダイナミンの局在に対するダイナソアの効果解析した。ダイナミンは破骨細胞のアクチンリング部位に局在した。ダイナソアを添加すると、アクチンリングの消滅に伴い、ダイナミンは細胞質に拡散した。④ダイナソアの骨吸収抑制作用を *in vivo* で評価するため、ダイナソア (50 mg/kg, 100 mg/kg) をマウスに腹腔投与した。60 分後に頭蓋骨を取り出し、頭蓋骨に存在する破骨細胞のアクチンリ

ングを観察した。破骨細胞の構築するアクチンリングは、ダイナソア投与により濃度依存的に破壊された。⑤RANKL 誘導性の骨吸収亢進モデルを用い、ダイナソアの投与効果を解析した。RANKL を 3 日間マウスの腹腔に投与し、大腿骨の骨量が有意に低下することをマイクロ CT により確認した。ダイナソアは RANKL 投与の 1 日前から 4 日間腹腔投与した。その結果、ダイナソア投与は、RANKL 投与により誘導される骨量減少を有意に回復させた。

[考察] ダイナミンの GTPase に対する特異的阻害剤ダイナソアを用いた実験より、ダイナミンの GTPase 活性は破骨細胞が担う骨吸収作用に必須であることが明らかになった。ダイナミンはアクチンリングに存在することより、ダイナミンの GTPase 活性は破骨細胞の細胞骨格系の構築と維持に必須であることが証明された。以上より、ダイナソアおよびその誘導体は、骨粗鬆症や歯周病において誘導される骨破壊の抑制薬の開発を目指した種子化合物となる可能性が示された。