

論文内容要旨

Inhibition of cell-cell fusion during osteoclastogenesis by NHE10-specific monoclonal antibody

(抗 NHE10 モノクローナル抗体は破骨細胞の形成過程における細胞融合を抑制する)

統合健康科学部門口腔生物工学

(主指導教員：二川 浩樹 教授)

統合健康科学部門生体構造・機能修復学

(副指導教員：里田 隆博 教授)

統合健康科学部門医療システム・生体材料工学

(副指導教員：村山 長 教授)

峯 裕一

論文内容要旨

論文題目 **Inhibition of cell-cell fusion during osteoclastogenesis by NHE10-specific monoclonal antibody** (抗 NHE10 モノクローナル抗体は破骨細胞の形成過程における細胞融合を抑制する)

学位申請者 峯 裕一

【目的】

顎堤および歯槽骨は、天然歯をはじめ義歯床やインプラントを支持するために重要な役割を果たしている。しかしながら、歯周病やインプラント周囲炎、義歯による不適切な荷重が原因となり高度な歯槽骨の吸収が引き起こされることがある。このような病態では、破骨細胞が異常に活性化され骨吸収が促進していると考えられている。成熟した破骨細胞は、Cathepsin K などの酵素に加え、イオンポンプやイオンチャネルにより H^+ や Cl^- を細胞外に放出することで細胞外環境を酸性化し骨を吸収する。

本研究の目的は、イオンポンプの一つである Na^+/H^+ exchanger (NHE) ファミリーの中でも、特に破骨細胞に高発現する NHE10 に着目し、抗 NHE10 モノクローナル抗体の *in vitro* および *in vivo* における破骨細胞の活性抑制効果を検討することである。

【方法】

本実験には RAW264.7 細胞および C57BL/6 系マウス由来骨髄単球(BMMs)を用いた。RAW264.7 細胞は、可溶性 RANKL 存在下で培養することで TRAP 陽性の多核巨細胞へと分化する破骨細胞のセルラインである。RAW264.7 細胞を可溶性 RANKL 存在下で培養し、NHE10 の発現変化および細胞局在を RT-PCR, real-time RT-PCR, western blotting, 免疫染色法および免疫電子顕微鏡法を用いて検討した。また、RAW264.7 細胞に対して NHE10-RNAi 処理を行った後、可溶性 RANKL 存在下または非存在下で培養した。同様に抗 NHE10 モノクローナル抗体を添加後、可溶性 RANKL 存在下または非存在下で培養した。各条件で培養した RAW264.7 細胞および BMMs に対して、TRAP 染色および Pit assay による骨吸収活性評価を行った。

次に、抗 NHE10 モノクローナル抗体が LPS 誘導性骨吸収に与える影響について 6-7 週齢雄性 C57BL/6 系マウスを用いて検討した (広島大学動物実験倫理委員会承認 No.A10-98)。マウスの体重 1g あたり 7.5 μ g 抗 NHE10 モノクローナル抗体またはコントロールラット IgG を 1 日毎に計 4 回マウスに投与した。また、初回の抗体投与から 1 日および 4 日後にマウスの体重 1g あたり 5 μ g の *E.coli* 由来の LPS をマウスに投与した。初回の抗体投与から 8 日後にマウスを屠殺後、 μ CT による解析を行った。

【結果】

可溶性 RANKL 刺激は, RAW264.7 細胞および BMMs における NHE10 の発現を RNA およびタンパク質レベルで促進した. また, 免疫染色および免疫電子顕微鏡法解析によって, NHE10 タンパクが可溶性 RANKL で誘導された RAW264.7 の細胞と細胞が融合している箇所によく発現していることが判明した.

NHE10-siRNA で処理した RAW264.7 細胞に可溶性 RANKL を添加した場合, negative-siRNA で処理した群と比較して TRAP 陽性多核巨細胞の出現数は有意に減少した.

抗 NHE10 モノクローナル抗体は, 可溶性 RANKL により誘導された RAW264.7 細胞の Cathepsin K および DC-STAMP mRNA の発現を有意に抑制した. RAW264.7 細胞を可溶性 RANKL 存在下で 5 日間培養し, ①0-3 日, ②3-5 日および③0-5 日の 3 群に分けて抗 NHE10 モノクローナル抗体の影響を検討した. その結果, コントロールラット IgG を添加した場合と比較して, ②および③では可溶性 RANKL 共存下における多核巨細胞の出現が有意に抑制され, 多核細胞の出現数がわずかに増加した. 一方, ①の 0~3 日では多核巨細胞および多核細胞の出現数に有意な差を認めなかった. また, RAW264.7 細胞および BMMs を Osteo Assay Surface 上で, 可溶性 RANKL 存在下で 6 日間培養し, ①0-3 日, ②3-6 日および③0-6 日の 3 群に分けて抗 NHE10 モノクローナル抗体の影響を検討した. その結果, 多核巨細胞の形成と同様にコントロールラット IgG を添加した場合と比較して, ②および③では可溶性 RANKL 共存下における Osteo Assay Surface の吸収窩の面積が有意に減少した. 一方, ①の 0~3 日では Osteo Assay Surface の吸収窩の面積に有意な差を認めなかった.

E.coli 由来の LPS 投与により骨吸収を誘導したマウスにおいて, コントロールラット IgG と *E.coli* 由来の LPS を投与した群と比較して, 抗 NHE10 モノクローナル抗体と *E.coli* 由来の LPS を投与した群では, 大腿骨における BV/TV の値が有意に高くなり, その値はコントロールラット IgG もしくは抗 NHE10 モノクローナル抗体のみを投与した群と同レベルであった.

【結論】

以上の結果より, NHE10 は破骨細胞の細胞融合および歯槽骨をはじめとした骨吸収に関与していることが示された. さらに抗 NHE10 モノクローナル抗体は歯槽骨の骨吸収抑制物質として応用できる可能性が示唆された.