

| | | |
|--------|---|----------|
| 氏名（本籍） | 日置智之 | （岐阜県） |
| 学位の種類 | 博士（医学） | |
| 学位授与番号 | 甲第1226号 | |
| 学位授与日付 | 令和5年3月25日 | |
| 学位授与要件 | 学位規則第4条第1項該当 | |
| 学位論文題目 | Selective estrogen receptor modulators, acting as agonists of estrogen receptor α in osteoblasts, reduce the TGF- β -induced synthesis of macrophage colony-stimulating factor via inhibition of JNK signaling pathway | |
| 審査委員 | （主査）教授 | 紙谷 義孝 |
| | （副査）教授 | 大西 秀典 |
| | | 教授 前川 洋一 |

論文内容の要旨

エストロゲンはエストロゲン受容体（ER）の作用薬として乳房，子宮，骨といった様々な臓器に作用するが，選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）はERに結合し，組織特異的にERの作用薬もしくは拮抗薬として作用する。ERにはER α とER β のアイソフォームが存在している。閉経後骨粗鬆症はエストロゲン欠乏による骨代謝の障害によって引き起こされ，骨強度の低下および骨折リスクの上昇をもたらす。Raloxifene および bazedoxifene は骨に対してはERの作用薬として，一方，乳腺および子宮内膜に対してはERの拮抗薬として機能するSERMであり，閉経後女性の骨粗鬆症の発症を抑制することが示され，骨粗鬆症治療薬として広く使用されている。

骨代謝は骨形成を行う骨芽細胞と骨吸収を行う破骨細胞によって協調的に制御され，骨リモデリングによって骨組織は絶えず再生されている。骨芽細胞は骨形成のみならず，破骨細胞の分化・形成をも制御している。骨芽細胞から分泌されるマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）は，破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への分化を誘導すると考えられている。

Transforming growth factor- β （TGF- β ）は，骨形成促進因子として知られている。TGF- β は骨基質中に貯蔵されており，破骨細胞による骨吸収により放出され，活性化する。TGF- β の細胞内情報伝達機構として，SMAD依存性経路とmitogen-activated kinase（MAPK）等のSMAD非依存性経路がよく知られている。我々の研究室ではこれまでに骨芽細胞においてTGF- β 刺激は，SMAD2/3，p44/p42 MAPK，p38 MAPK および c-*Jun* terminal kinase（JNK）の活性化を介しM-CSFの産生を促進していることを報告している。しかし，TGF- β によるM-CSF産生に対するSERMの影響については，未だ明らかにされていない。本研究では，骨芽細胞様MC3T3-E1細胞においてTGF- β 刺激によるM-CSF産生に対するraloxifene および bazedoxifene の影響およびその作用機序について検討した。

【対象と方法】

新生仔マウスの頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様MC3T3-E1細胞を，10%牛胎仔血清を含む α -MEM培地で5日間培養後，牛胎仔血清を0.3%とし48時間後に実験に供した。細胞をraloxifene，bazedoxifene，ER α の作用薬であるpropylpyrazole triol（PPT），ER β の作用薬であるERB041およびER α の拮抗薬であるmethylpiperidino pyrazole（MPP）で60分間前処置した後にTGF- β で刺激した。上清中のM-CSFをELISA法で，M-CSF mRNAの発現をreal time RT-PCR法にて解析した。SMAD3，p42 MAP kinase，p38 MAPK および JNK のリン酸化をWestern blot法で解析した。

【結果】

Raloxifene および bazedoxifene は単独では M-CSF の遊離に何ら影響を及ぼさなかったが、TGF- β による M-CSF の遊離を有意に抑制した。Raloxifene は TGF- β による M-CSF mRNA の発現を有意に抑制した。PPT は TGF- β による M-CSF の遊離を有意に抑制したが、ERB041 は TGF- β による M-CSF 遊離に何ら影響を及ぼさなかった。また、MPP は raloxifene による M-CSF の遊離の抑制を有意に回復させた。Raloxifene は TGF- β による SMAD3, p42 MAPK および p38 MAPK のリン酸化に影響を及ぼさなかったが、JNK のリン酸化を有意に抑制した。Bazedoxifene および PPT は、raloxifene と同様に TGF- β による JNK のリン酸化を有意に抑制した。MPP は、raloxifene および bazedoxifene の TGF- β による JNK のリン酸化の抑制を有意に回復させた。

【考察】

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、SERM である raloxifene および bazedoxifene が TGF- β による M-CSF の遊離を抑制すること、raloxifene が TGF- β による M-CSF mRNA 発現を抑制することが示された。ER α の作動薬である PPT は raloxifene および bazedoxifene と同様の作用を示したが、ER β の作動薬である ERB041 は何ら影響を及ぼさなかった。さらに、ER α の拮抗薬である MPP が、TGF- β による M-CSF 遊離に対する raloxifene の抑制作用を回復させた。以上の結果より、TGF- β において raloxifene および bazedoxifene の作用は、ER β ではなく ER α の活性化を介していると考えられた。Raloxifene が TGF- β による SMAD3, p42 MAPK, p38 MAPK のリン酸化には何ら影響を及ぼさなかったが、JNK のリン酸化を抑制することが示された。また、bazedoxifene および PPT が raloxifene と同様に JNK のリン酸化を抑制した。さらに、MPP が raloxifene および bazedoxifene の TGF- β による JNK のリン酸化の抑制を回復させた。以上の結果より、骨芽細胞において raloxifene および bazedoxifene は、ER α を介して M-CSF の産生を阻害し破骨細胞形成を抑制する可能性が示唆された。Raloxifene および bazedoxifene の作用点は JNK の上流であると考えられた。

【結論】

骨芽細胞において SERM である raloxifene および bazedoxifene は、ER α の作用薬として作用し、TGF- β による JNK の活性化を阻害し M-CSF の産生を抑制することが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 日置 智之 は、マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、SERM である raloxifene および bazedoxifene が ER α の作用薬として作用し、TGF- β による JNK の活性化を阻害し M-CSF の産生を抑制することを明らかにした。本研究の成果は、骨粗鬆症治療薬の骨代謝に関連する新たな知見をもたらし、薬理病態学の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Tomoyuki Hioki, Rie Matsushima-Nishiwaki, Haruhiko Tokuda, Osamu Kozawa: Selective estrogen receptor modulators, acting as agonists of estrogen receptor α in osteoblasts, reduce the TGF- β -induced synthesis of macrophage colony-stimulating factor via inhibition of JNK signaling pathway
Biomedical Research 43, 211-221 (2022). doi : 10.2220/biomedres.43.211.