

氏名 (本籍)	館 順 子 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 1201 号
学位授与日付	令和 4 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	The effects of duloxetine on osteoblast-like MC3T3-E1 cells 1) Duloxetine strengthens osteoblast activation by prostaglandin E <sub>1</sub> : Upregulation of p38 MAP kinase 2) Duloxetine suppresses BMP-4-induced release of osteoprotegerin via inhibition of the SMAD signaling pathway in osteoblasts
審査委員	(主査) 教授 中川 敏幸 (副査) 教授 山田 陽一 教授 中島 茂

### 論文内容の要旨

骨代謝は、骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞により巧緻に制御されている。骨形成と骨吸収は絶えず行われ、骨はリモデリングされている。Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK)/RANK ligand 経路の活性化は骨吸収を促進する。Osteoprotegerin(OPG)は骨芽細胞で合成され、RANK ligand に結合することで RANK と RANK ligand の結合を阻害し、骨吸収を抑制する。一方、interleukin-6(IL-6) は骨代謝において骨代謝調節因子として重要な役割を果たしている。先行研究では、骨芽細胞において prostaglandin E<sub>1</sub>(PGE<sub>1</sub>)が、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介して OPG と IL-6 の産生を促進すること、また、bone morphogenetic protein(BMP)-4 が OPG 産生を促進し、p70 S6 kinase が促進的に制御していることが明らかになっている。セロトニン/ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) である duloxetine は、慢性腰痛症、変形性股関節症などの運動器疼痛疾患に対して長期に渡り使用されている。高齢者において骨粗鬆症に伴う骨折リスクの増加が懸念されているが、疼痛治療薬が骨代謝に及ぼす影響は明らかにされていない。本研究では、duloxetine が PGE<sub>1</sub> 刺激による IL-6 と OPG の産生に及ぼす影響、BMP-4 刺激による OPG 遊離に及ぼす影響およびその作用機序を検討した。

#### 【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  $\alpha$ -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 duloxetine, sertraline, fluvoxamine および reboxetine で 60 分間前処置した後に PGE<sub>1</sub> または BMP-4 で刺激した。上清中の OPG と IL-6 は ELISA 法で測定した。OPG と IL-6 の mRNA の発現を real time RT-PCR 法にて解析した。細胞内タンパク質のリン酸化は Western blot 法で解析した。

#### 【結果】

① duloxetine 単独では OPG と IL-6 の遊離にほとんど影響しなかったが、PGE<sub>1</sub> 刺激による OPG と IL-6 の遊離および OPG と IL-6 の mRNA の発現を有意に増強した。② 選択的セロトニン再取り込み阻害薬である fluvoxamine および sertraline は PGE<sub>1</sub> 刺激による OPG と IL-6 の遊離を増強したが、一方、選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害薬である reboxetine は PGE<sub>1</sub> 刺激による OPG と IL-6 の遊離に何ら影響を及ぼさなかった。③ duloxetine, sertraline および fluvoxamine は PGE<sub>1</sub> 刺激による p38 MAPK のリン酸化を増強した。④ p38 MAPK の阻害剤である SB203580 は、duloxetine,

sertraline および fluvoxamine による OPG と IL-6 の遊離増強を有意に抑制した。⑤ duloxetine, fluvoxamine および sertraline は, BMP-4 による OPG の遊離を有意に抑制したが, reboxetine は何ら影響しなかった。⑥ SMAD1 ノックダウン細胞では, BMP-4 刺激による OPG 遊離は抑制された。⑦ duloxetine は BMP-4 による p70 S6 kinase のリン酸化に影響を及ぼさなかったが, SMAD1/5/8 のリン酸化を有意に抑制した。⑧ BMP-4 による SMAD1/5/8 のリン酸化は fluvoxamine および sertraline により抑制された。

#### 【考察】

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において, セロトニン/ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) である duloxetine は PGE<sub>1</sub> 刺激による OPG および IL-6 の産生を p38 MAPK の活性化を介して増強することが示された。一方, duloxetine は BMP-4 刺激による OPG 遊離を SMAD1/5/8 経路を介して抑制することが示された。選択的セロトニン再取り込み阻害薬である fluvoxamine ないし sertraline は duloxetine と同様の作用を示した。しかし, 選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害薬である reboxetine は何ら影響を及ぼさなかった。以上の結果より, PGE<sub>1</sub> ないし BMP-4, いずれの刺激においても, duloxetine の作用はノルアドレナリンではなくセロトニンの再取り込み阻害を介していると考えられた。

OPG は RANK ligand のデコイ受容体として RANK/RANK ligand 経路を阻害し, 破骨細胞の機能を抑制すると考えられている。骨代謝において, PGE<sub>1</sub> は骨吸収因子として, 一方, BMP-4 は骨形成因子として作用すると考えられている。今回, duloxetine は PGE<sub>1</sub> 刺激では OPG 遊離を増強すること, 一方, BMP-4 刺激では OPG 遊離を抑制することが明らかになった。以上より, 骨芽細胞において, duloxetine は骨吸収因子刺激の場合では, OPG 遊離増強を介し骨吸収に対し負の抑制作用を示し, 一方, 骨形成因子刺激の場合は OPG 遊離抑制を介し骨形成に対し負の抑制作用を示し, 骨代謝を適切に調整し得る薬物である可能性が示唆された。

#### 【結論】

骨芽細胞において, duloxetine は PGE<sub>1</sub> による p38 MAPK の活性増強を介して OPG と IL-6 の産生を増幅すること, 一方, BMP-4 刺激による SMAD1/5/8 伝達経路を阻害し, OPG 遊離を抑制することが示唆された。Duloxetine は骨芽細胞の機能を調節し, 骨代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 館 順子は, セロトニン/ノルアドレナリン再取り込み阻害薬である duloxetine が p38 MAPK 経路と SMAD1/5/8 経路を介して破骨細胞抑制因子である osteoprotegerin の発現を制御していることを明らかにした。本研究の成果は, 疼痛治療薬の骨代謝に関連する新たな知見をもたらし, 疼痛制御学ならびに麻酔科学の進歩に少なからず貢献するものと認める。

#### [主論文公表誌]

- 1) Junko Tachi, Haruhiko Tokuda, Takashi Onuma, Shinobu Yamaguchi, Kim Woo, Tomoyuki Hioki, Rie Matsushima-Nishiwaki, Kumiko Tanabe, Osamu Kozawa, and Hiroki Iida : Duloxetine strengthens osteoblast activation by prostaglandin E<sub>1</sub> : Upregulation of p38 MAP kinase. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 2020;151:106481.
- 2) Junko Tachi, Takashi Onuma, Shinobu Yamaguchi, Kim Woo, Tomoyuki Hioki, Rie Matsushima- Nishiwaki, Kumiko Tanabe, Haruhiko Tokuda, Osamu Kozawa, and Hiroki Iida : Duloxetine suppresses BMP-4-induced release of osteoprotegerin via inhibition of the SMAD signaling pathway in osteoblasts. *Biochemistry and Cell Biology* 2021;99:578-586.