

学位論文題名

Platinum nanoparticles suppress osteoclastogenesis through scavenging of ROS productions in RAW264.7 cells

(白金ナノコロイドはRAW細胞において細胞内ROS除去を介して破骨細胞分化を抑制する)

学位論文内容の要旨

【諸言】

近年注目されている白金ナノコロイドは、持続的かつ触媒的に作用し活性酸素(ROS)を除去すると報告されている。RANKL 刺激により破骨細胞前駆細胞内 ROS 濃度は上昇し、ROS は破骨細胞分化を制御すると報告されているが、白金ナノコロイドを破骨細胞分化誘導系に直接作用させた報告はない。そこで、破骨細胞分化誘導系において白金ナノコロイドを添加した場合の影響について検討した。白金ナノコロイドはナノレベルの白金微粒子によって形成されたコロイドであり、すべての種類の ROS を除去する強力な抗酸化物質である。さらに、触媒として働くためその効果が失われることなく、持続的に ROS を除去すると報告されている。

【材料と方法】

本実験では平均粒径 2 nm、周囲を還元剤であるクエン酸で保護されている nano-Pt を使用した。nano-Pt の ROS 除去効果を確認するために、HRP 存在下で H_2O_2 から ROS を産生させ、蛍光試薬である APF と ROS との反応による蛍光強度を測定した。さらに、破骨細胞分化誘導系に及ぼす nano-Pt の影響を調べた。破骨細胞前駆細胞である RAW264.7(RAW)細胞を 10%FBS 含有 α MEM で培養し、50 ng/ml の RANKL を投与して破骨細胞に分化させた。さらに実験群には 1 μ M、10 μ M の nano-Pt を添加した。一定期間培養後、TRAP 染色し TRAP 陽性破骨細胞数(2 核以上)、巨大破骨細胞数(8 核以上)をカウントした。さらに cell counting kit-8 を用いた細胞毒性試験、そしてリアルタイム PCR にて遺伝子の発現を検索した。

【結果】

H_2O_2 の濃度依存的に蛍光強度は増加し、ROS の産生を認めた。しかし、nano-Pt を添加すると蛍光強度は減少し、100 μ M nano-Pt 添加では、産生した ROS が完全に除去されていることが確認された。

6 日間培養後、2 核以上の TRAP 陽性破骨細胞数をカウントした。nano-Pt に多量に含まれるクエン酸自体は破骨細胞分化に影響を及ぼさず、コントロールと比較して破骨細胞数に違いは認めなかった。しかし、nano-Pt を添加すると、その濃度依存的に破骨細胞数は減少し、10 μ M 添加ではコントロールの半数にまで抑制された。なお、ATP 量の測定からクエン酸および nano-Pt は RAW 細胞の増殖には影響を及ぼさない事を確認している。参考として、4 週齢のマウス大腿骨髄由来の bone marrow macrophage(BMMs)でも同様の実験を行なったが、RAW 細胞と同様に nano-Pt の濃度依存的に破骨細胞分化抑制効果を認めた。RAW 細胞に RANKL 刺激を与えると、4 日目から破骨細胞が認められ、6 日目をピークとして減少しはじめ、9 日目まで観察された。この傾向は nano-Pt を添加しても変わらず、破骨細胞分化の遅延は認めなかった。また、nano-Pt は破骨細胞の形態にも影響を及ぼさなかった。しかし、すべての培養日数において nano-Pt は濃度依存的に破骨細胞数、巨大破骨細胞数を減少させた。さらに、抗酸化物質である NAC および GSH でもその濃度依存的に破骨細胞数が

減少した。

細胞毒性試験において、塩化白金はその強い毒性により細胞死を引き起こしたのに対し、nano-Pt はコントロールと比較して生細胞数に影響を及ぼさず、細胞毒性は認めなかった。

リアルタイム PCR にて破骨細胞分化関連遺伝子の発現を解析したところ、10 μ M nano-Pt の添加により、破骨細胞のマスター転写因子である NFATc1 およびその補助をする NFATc2 の発現は減弱した。さらに、破骨細胞の融合を司る DC-STAMP、M-CSF のレセプターである c-fms の発現も抑制された。また、nano-Pt は、破骨細胞のマーカー遺伝子とされる MMP-9、Cath-K、CLC7、ATP6i、CTR、TRAP の発現を有意に減弱させた。細胞内で主に ROS を産生すると報告されている NADPH oxidase (NOX) およびそれらの働きを補助するパートナータンパク質の発現を解析した。NOX ファミリーは 1~5 まで同定されているが、破骨細胞においては NOX3、NOX5、NOXA1 の発現は認めなかった。Nano-Pt の添加により NOX1、NOX4、NOXO1 の発現が有意に抑制され、10 μ M nano-Pt 添加により NOX1 および NOX4 の発現は半減した。一方、NOX2 の発現は 10 μ M nano-Pt の添加により顕著に増強した。他の NOX 関連遺伝子に有意な差は認めなかった。

【考察】

本研究では、抗酸化能を有する白金ナノコロイドを直接作用させた場合の破骨細胞分化誘導系に与える影響について検討した。RAW 細胞に nano-Pt を添加するとその濃度依存的に破骨細胞数、巨大破骨細胞数は減少した。しかし、nano-Pt を作用させても破骨細胞の形態や分化の傾向は変化せず、分化の遅延は認めなかった。この結果から、nano-Pt は RAW 細胞において破骨細胞の分化および融合を抑制することが示唆された。他の抗酸化物質でも誘導された破骨細胞数が減少したことから、ROS 除去による破骨細胞分化抑制効果が認められた。よって、nano-Pt は RAW 細胞において ROS を除去することにより、破骨細胞分化を抑制することが示唆された。

また、破骨細胞関連遺伝子の発現を検索すると、nano-Pt の添加により、マスター転写因子である NFATc1 や破骨細胞の融合を司る DC-STAMP、マーカー遺伝子の発現は減弱した。しかし、破骨細胞数の顕著な減少に対して、破骨細胞関連遺伝子の発現抑制はわずかであり、他の因子が破骨細胞分化抑制効果に関与している可能性が生じた。そこで、NOX 遺伝子の発現を解析したところ、nano-Pt の添加による NOX1、NOX4 の発現抑制、NOX2 の発現増強を認めた。破骨細胞前駆細胞に RANKL 刺激を与えると、細胞内 ROS 濃度の上昇により、前駆細胞内で強く発現している NOX2 が減弱し、NOX1、NOX4 の発現が増強される。RANKL 刺激による、この NOX 発現のスイッチが破骨細胞分化に関与すると報告されている。本実験では、nano-Pt の ROS 除去効果により、NOX2 の発現が減少せずに NOX1、NOX4 の発現が抑制されたため、破骨細胞分化が抑制されたと考えられる。

【結語】

RAW 細胞による破骨細胞分化誘導系に nano-Pt を作用させると、nano-Pt の ROS 除去効果により破骨細胞の分化、融合が抑制されることが示唆された。この機序として、nano-Pt の添加により破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 を介した経路が抑制され、さらに NOX1、NOX4 の発現抑制と NOX2 の発現増強が破骨細胞分化抑制に関与している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 特任教授 井 上 農夫男
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Platinum nanoparticles suppress osteoclastogenesis through scavenging of ROS productions in RAW264.7 cells

(白金ナノコロイドはRAW細胞において細胞内ROS除去を介して破骨細胞分化を抑制する)

審査は審査担当者が一同に会し約 1 時間半かけて行った。申請者に本論文の概要の説明を求め、口頭試問形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。

【緒言】

活性酸素種が引き起こす酸化ストレスは老化や病気の原因とされているが、少量のかつ毒性のないレベルの ROS はシグナル伝達系においてセカンドメッセンジャーとしての役割を果たすと言われている。破骨細胞においても、RANKL 刺激による破骨細胞前駆細胞内の ROS の上昇や、ROS が骨吸収能を増強させるなどの報告がされている。本研究では、持続的かつ触媒的に ROS を除去する白金ナノコロイド (nano-Pt) が破骨細胞分化誘導系に与える影響について検討した。

【材料と方法】

nano-Pt はナノレベルの白金微粒子によって形成されたコロイドで、平均粒径 2nm、周囲をクエン酸で保護されている。HRP 存在下で H_2O_2 から ROS を産生させ、nano-Pt の ROS 除去能を確認した。RANKL 含有培養液で RAW264.7(RAW)細胞を培養し、実験群にはそれぞれ 1 μM 、10 μM の nano-Pt を添加した。一定期間培養後、TRAP 陽性破骨細胞数 (2 核以上)、巨大破骨細胞数 (8 核以上) をカウントした。さらに細胞毒性試験、そしてリアルタイム PCR にて遺伝子の発現を検索した。

【結果と考察】

nano-Pt を添加すると蛍光強度は減少し、ROS が除去されていることが確認された。また、nano-Pt は細胞毒性を示さなかった。RAW 細胞に RANKL 刺激を与えると、4日目から破骨細胞が認められ、6日目をピークとし、9日目まで観察された。この傾向は nano-Pt を添加しても変わらず、破骨細胞分化の遅延は認めなかったが、nano-Pt の濃度依存的に破骨細胞数、巨大破骨細胞数は減少した。BMMs でも RAW 細胞と同様に破骨細胞分化抑制効果を認めた。抗酸化物質である NAC、GSH を添加してもその濃度依存的に破骨細胞数が減少したことから、ROS 除去による破骨細胞分化抑制効果が認められた。よって、nano-Pt は RAW 細胞において ROS 除去効果により、破骨細胞の分化、融合を抑制することが示唆された。

nano-Pt の添加により破骨細胞のマスター転写因子である NFATc1 や NFATc2、破骨細胞の融合を司る DC-STAMP の発現が抑制された。また、破骨細胞のマーカー遺伝子の発現も有意に減弱させた。ROS 産生に

関与する NOX の発現は nano-Pt の添加により NOX1、NOX4、NOXO1 が優位に抑制された。一方、NOX2 の発現は 10 μ M nano-Pt の添加により顕著に増強した。破骨細胞前駆細胞に RANKL 刺激を与えると、細胞内 ROS 濃度の上昇により、NOX2 が減弱し、NOX1、NOX4 の発現が増強され、この NOX 発現のスイッチが破骨細胞分化に関与すると報告されている。本実験では、nano-Pt の ROS 除去効果により、NOX2 の発現が減少せずに NOX1、NOX4 の発現が抑制されたため、破骨細胞分化が抑制されたと考えられた。

各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。主な質問内容は、以下の通りであった。

- 1) 細胞毒性に対する、nano-Pt と塩化白金酸の違いについて
- 2) nano-Pt 添加期間と分化抑制効果について
- 3) nano-Pt の破骨細胞抑制効果のメカニズムについて
- 4) NOX1 と NOX2 の相補作用について
- 5) nano-Pt の破骨細胞抑制効果と臨床応用について
- 6) 本研究の今後の方向性について

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答と説明が得られ、さらに今後の研究の発展性についても明確な計画を持っていると判定した。

試問の結果、本論文は、nano-Pt が ROS 除去効果により濃度依存的に破骨細胞分化抑制効果を示すことを明らかにし、さらに NOX1、NOX4 の発現抑制と NOX2 の発現増強が破骨細胞分化抑制に関与している可能性を示唆した。このことから本研究には新規性が認められ、今後の歯科医学の発展に大きく貢献するものと評価された。さらに、学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。よって、学位申請者は北海道大学博士(歯学)の学位を授与される資格あるものと認めた。