



## Nagoya City University Academic Repository

|         |  |
|---------|--|
| 学位の種類   | 博士 (医学)  |
| 報告番号    | 甲第1617号  |
| 学位記番号   | 第1152号   |
| 氏名      | 川端 哲   |
| 授与年月日   | 平成30年3月26日   |
| 学位論文の題名 | Resveratrol inhibits the epidermal growth factor-induced migration of osteoblasts : the suppression of SAPK/JNK and Akt<br>(Resveratrol は SAPK/JNK と Akt を介して epidermal growth factor による骨芽細胞の遊走を抑制する)<br><br>Cellular Physiology and Biochemistry Vol. 43: P.1025-1036, 2017. |
| 論文審査担当者 | 主査： 和田 郁雄<br>副査： 岡本 尚, 大塚 隆信   |

# 論文内容の要旨

## 【目的】

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、骨量は適切に維持されている。骨吸収とそれに引き続く骨形成によって骨リモデリングは絶えず活発に行われている。骨リモデリングにおいて、骨吸収部位への骨芽細胞の遊走は必須であり、加えて骨折時の骨修復のプロセスにおいてもその遊走は重要であると考えられている。epidermal growth factor (EGF)を含む多くの骨代謝調節因子が骨芽細胞の遊走を促進することが報告されているが、その機序の詳細は未だ明らかとされていない。

Resveratrol は、赤ブドウやワインに豊富に含まれるポリフェノールであり、抗酸化作用等ヒトに有益な作用を有することが知られている。ワインの消費が高い女性は、股関節骨折のリスクが低いことが報告されている。Resveratrol の作用の一部は、長寿遺伝子である SIRT1 の活性化を介して発現することが報告されているが、resveratrol の骨芽細胞に対する作用の詳細は未だ明らかとされていない。本研究では、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞における EGF による細胞遊走の分子機序及び resveratrol の影響を検討した。

## 【方法】

新生仔マウス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 resveratrol、SIRT1 活性化因子である SRT1720、MEK1/2 阻害剤である PD98059、p38 MAP kinase 阻害剤である SB203580、SAPK/JNK 阻害剤である SP600125、Akt 阻害剤である deguelin、mTOR 阻害剤である rapamycin 及び Rho-kinase 阻害剤である fasudil で前処置した後 EGF で刺激し、p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase、SAPK/JNK、Akt、p70 S6 kinase、MYPT1 のリン酸化を Western blot 法にて解析した。

細胞遊走は、Boyden chamber 法を用いて解析した。細胞を 10%牛胎仔血清を含む  $\alpha$ -MEM 培地で 3 日間培養後、牛胎仔血清を 0.3%とし、resveratrol、SRT1720 及び各種阻害薬で前処置後、EGF で刺激し、16 時間後にメンブレンを通過した細胞を解析した。

## 【結果】

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、EGF は細胞遊走を用量依存的に促進した。EGF は p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase、SAPK/JNK、Akt、p70 S6 kinase、MYPT1 のリン酸化を促進した。PD98059、SB203580、SP600125 及び deguelin によって、EGF による細胞遊走が抑制された。一方、rapamycin 及び fasudil は、EGF による細胞遊走に何ら影響を与えなかった。Resveratrol は用量依存的に EGF による細胞遊走を抑制した。加えて SRT1720 も同様に EGF による細胞遊走を抑制した。Resveratrol は EGF による p44/p42 MAP kinase 及び p38 MAP kinase のリン酸化に何ら影響を与えなかったが、SAPK/JNK 及び Akt のリン酸化を抑制した。また、SRT1720 も同様に EGF による SAPK/JNK 及び Akt のリン酸化を抑制した。

## 【考察】

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、resveratrol 及び SRT1720 が、EGF による細胞遊走を有意に抑制することを示した。EGF による骨芽細胞遊走における細胞内シグナル伝達に関して、副甲状腺ホルモンは骨芽細胞から EGF 受容体リガンドである amphiregulin の放出を増加させ、

EGF 受容体に結合し、p38 MAP kinase 及び Akt を介して、細胞遊走を促進すると報告されている。また、Rho-kinase は、骨芽細胞の遊走を抑制的に制御すると報告されている。本細胞では、PD98059、SB203580、SP600125 及び deguelin は EGF による細胞遊走を有意に抑制した。一方、rapamycin 及び fasudil は EGF による細胞遊走に何ら影響を及ぼさなかったことから、p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase、SAPK/JNK 及び Akt は骨芽細胞遊走を促進的に制御することが示唆された。さらに、resveratrol 及び SRT1720 が EGF による SAPK/JNK 及び Akt のリン酸化を抑制した。以上のことから、resveratrol が、SAPK/JNK 及び Akt の抑制を介して EGF による骨芽細胞遊走を阻害すること及びこの resveratrol による抑制作用は SIRT1 の活性化を介して惹起されることが明らかになった。骨芽細胞の遊走は骨リモデリングに必須の過程であり、骨に及ぼす resveratrol の有用性を考慮すると、resveratrol は骨芽細胞遊走を抑制的に作用し、適正な骨代謝を制御している可能性が示唆された。

.....

**【結論】**

Resveratrol は SAPK/JNK 及び Akt の抑制を介して EGF による細胞の遊走を阻害すること及び resveratrol による抑制作用は SIRT1 の活性化を介して惹起されることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

【目的】骨芽細胞の遊走は骨リモデリングに重要な過程であることはよく知られている。多くの骨代謝調節因子により、骨芽細胞の遊走が促進されるが、epidermal growth factor (EGF)による骨芽細胞遊走の機序の詳細は不明である。Resveratrol は、ブドウや赤ワインに豊富に含まれるポリフェノールであり、抗酸化作用等ヒトに有益な作用を有するとされている。また、resveratrol は骨代謝に良いポリフェノールともされ、その作用の一部は、長寿遺伝子である SIRT1 の活性化を介して発現することが報告されている。しかしながら、resveratrol の骨芽細胞遊走に対する影響の報告はない。本研究は、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞における EGF による細胞遊走の分子機序及び resveratrol の影響を検討したものである。

【方法】骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を用い、細胞遊走を Boyden chamber 法にて解析した。Resveratrol、SIRT1 活性化因子である SRT1720、MEK1/2 阻害剤である PD98059、p38 MAP kinase 阻害剤である SB203580、SAPK/JNK 阻害剤である SP600125、Akt 阻害剤である deguelin、mTOR 阻害剤である rapamycin 及び Rho-kinase 阻害剤である fasudil で前処置した後 EGF で刺激し、16 時間後にメンブレンを通過した細胞を解析した。また、蛋白の発現およびリン酸化を Western blot 法にて測定および解析した。

【結果】骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、EGF は細胞遊走を用量依存的に促進した。EGF は p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase、SAPK/JNK、Akt、p70 S6 kinase、MYPT1 のリン酸化を促進した。PD98059、SB203580、SP600125 及び deguelin によって、EGF による細胞遊走が抑制された。一方、rapamycin 及び fasudil は、EGF による細胞遊走に何ら影響を与えなかった。Resveratrol は用量依存的に EGF による細胞遊走を抑制した。加えて SRT1720 も同様に EGF による細胞遊走を抑制した。Resveratrol は EGF による p44/p42 MAP kinase 及び p38 MAP kinase のリン酸化に何ら影響を与えなかったが、SAPK/JNK 及び Akt のリン酸化を抑制した。また、SRT1720 も同様に EGF による SAPK/JNK 及び Akt のリン酸化を抑制した。

【考察】以上の結果より、resveratrol が、SAPK/JNK 及び Akt の抑制を介して EGF による骨芽細胞遊走を阻害すること及びこの resveratrol による抑制作用は SIRT1 の活性化を介して惹起されることが明らかになった。骨芽細胞の遊走は骨リモデリングに必須の過程であり、骨に及ぼす resveratrol の有用性を考慮すると、resveratrol は骨芽細胞遊走を抑制的に作用し、骨代謝を適正に制御している可能性が示唆された。

【審査の内容】主査の和田教授より、細胞遊走実験の詳細について、骨代謝における resveratrol の役割について、resveratrol の骨粗鬆症への有用性について等 7 項目、第 1 副査の岡本教授より、それぞれの実験結果の解釈について、SIRT1 の作用機序の詳細について、骨折予防について等 10 項目、第 2 副査の大塚教授より、骨粗鬆症の診断について、転倒予防について等 5 項目の質問があった。これらの質問に対して、申請者から概ね適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に把握しており、また大学院修了者としての学力を備えていると判断した。本研究は resveratrol の骨代謝における役割の一端を明らかとする重要な研究であり高く評価される。よって、本論文著者は、博士（医学）の学位を授与するのに値するものと判定した。

論文審査担当者 主査 和田郁雄

副査 岡本尚 大塚隆信