

研究者：原 詩歌（所属：九州歯科大学 健康増進学講座 口腔機能発達学分野）

研究題目：パン酵母β-グルカンは dectin-1 を介して破骨細胞分化を抑制する

目的：

これまでの研究でパターン認識受容体の1つの dectin-1 のアゴニストである curdlan が Syk キナーゼを介した NFATc1 発現の負の抑制により破骨細胞形成を抑制する、ということが報告されている。dectin-1 は破骨細胞前駆細胞をはじめとする骨髄系細胞に特異的に発現していることから、curdlan が選択性の高い骨吸収抑制薬として応用可能であることが示唆された。本研究ではその他のβ-グルカンとしてパン酵母β-グルカンに着目し、RANKL 誘導性の破骨細胞分化制御能の有無とその分子メカニズムに関して検討することを目的とした。

対象および方法：

ddy マウス由来の骨髄細胞を採取後、M-CSF 及び RANKL で刺激しパン酵母β-グルカンを添加した。さらに、dectin-1 を過剰発現させた破骨細胞前駆細胞株 RAW2647 細胞（d-RAW 細胞）についても RANKL 存在下にて破骨細胞分化誘導を行った。培養後の細胞に関して、破骨細胞分化能は TRAP 染色、破骨細胞分化関連遺伝子発現は real-time RT-PCR 法、破骨細胞分化関連タンパク発現は Western blotting 法にて評価した。

結果および考察：

1. RANKL 誘導性の破骨細胞分化抑制

パン酵母β-グルカンの破骨細胞の分化に影響を及ぼすかどうかを検討するために、TRAP 陽性多核細胞を計測した。マウス骨髄細胞に対して TRAP 染色を行なった結果、パン酵母β-グルカン添加群において RANKL 誘導性 TRAP 陽性多核破骨細胞形成が用量依存的に抑制された（図 1a,b）。この抑制効果が dectin-1 の発現に依存しているかどうかを評価するために、RANKL 存在下に培養した d-RAW 細胞と c-RAW 細胞に対して

TRAP 染色を行い破骨細胞形成数を比較した（図 1c,d）。パン酵母β-グルカンは、c-RAW 細胞よりも d-RAW 細胞に対してより著明に破骨細胞形成を阻害した（それぞれ抑制率 80.5%対 41.3%）。

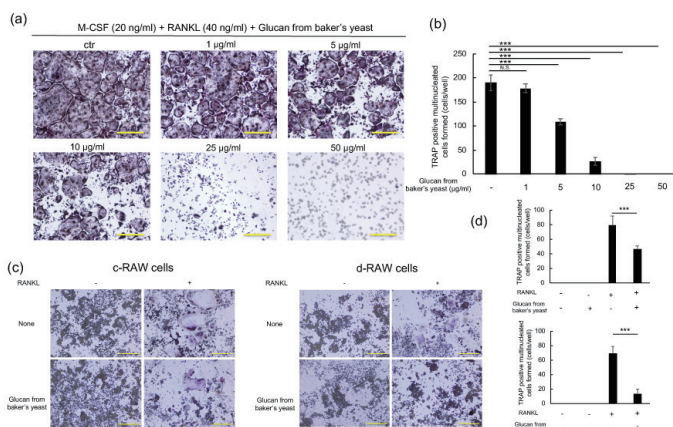


図1 BMM、c-RAW 細胞および d-RAW 細胞の破骨細胞形成に対するパン酵母β-グルカンの影響

2. c-fos と NFATc1 の発現抑制

破骨細胞分化に対するパン酵母β-グルカンの効果をさらに検討するために、RANKL 刺激下の c-RAW 細胞および d-RAW 細胞における TRAP、Oc-stamp、および NFATc1 といった破骨細胞関連遺伝子の mRNA の発現を Real-time RT-PCR 法にて調べた。これらの mRNA の RANKL 添加による増強は、パン酵母β-グルカンの添加群では、d-RAW 細胞 (図 2a) と c-RAW 細胞 (図 2b) 共に大幅に抑制された。さらにパン酵母β-グルカンによる NFATc1 発現に対する阻害効果はタンパク質レベルでも確認された (図 3a)。TRAP 染色結果と一致して、パン酵母β-グルカンによる破骨細胞関連遺伝子の発現の阻害効果は、c-RAW 細胞よりも d-RAW 細胞で顕著であった。さらに、NFATc1 に対するパン酵母β-グルカンの阻害効果における c-fos の関与を検討した。d-RAW 細胞において、RANKL 刺激による c-fos タンパク質発現の増強はパン酵母β-グルカンの添加により抑制された (図 3b)。

3. NF-κB p65 シグナル阻害

パン酵母β-グルカンが破骨細胞形成を阻害する分子メカニズムをさらに調査するために、NF-κB p65 および MAPK シグナル伝達の関与を検討した。RANKL 刺激後 15 分後に NF-κB p65 が d-RAW 細胞において核内に強く移行し (図 4a)、この核内移行はパン酵母β-グルカンによって抑制された (図 4b)。ERK、p38 MAPK、JNK などの MAPK ファミリータンパク質の RANKL によるリン酸化は、パン酵母β-グルカンの影響を受けなかった (図 4c)。

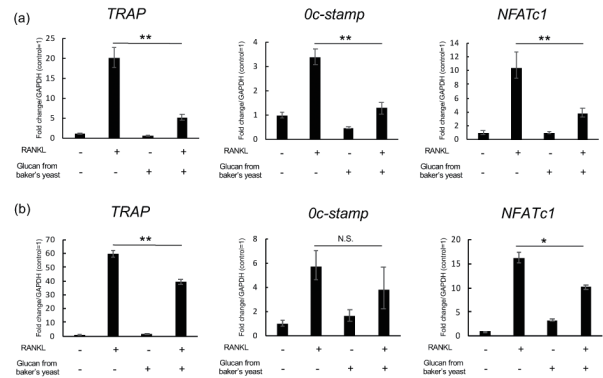


図 2 c-RAW 細胞および d-RAW 細胞における破骨細胞特異的遺伝子に対するパン酵母β-グルカンの影響

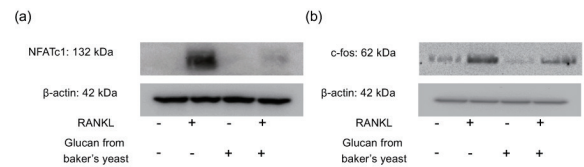


図 3 d-RAW 細胞における NFATc1 および c-fos 発現に対するパン酵母β-グルカンの影響

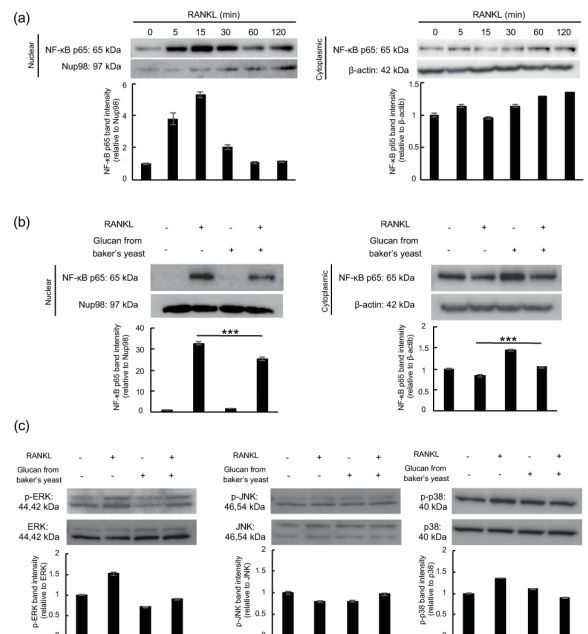


図 4 d-RAW 細胞における RANKL を介した NF-κBp65 および MAPK シグナル伝達経路に対するパン酵母β-グルカンの影響

4. 転写抑制因子 Blimp1 と Irf-8 の発現調整

RANKL 刺激は、Blimp1 発現を誘導し続いて MafB、Bcl6、Irf-8 などの破骨細胞分化抑制因子の発現が抑制される。そこで、これらの破骨細胞形成の負の調節因子に対するパン酵母β-グルカンの影響を調査した。パン酵母β-グルカンは Irf-8 遺伝子の発現をわずかに亢進した (図 5a)。RANKL による Blimp1 の発現増強もパン酵母β-グルカンの添加によって遺伝子 (図 5b)、タンパク (図 5c) レベルで有意に抑制された。

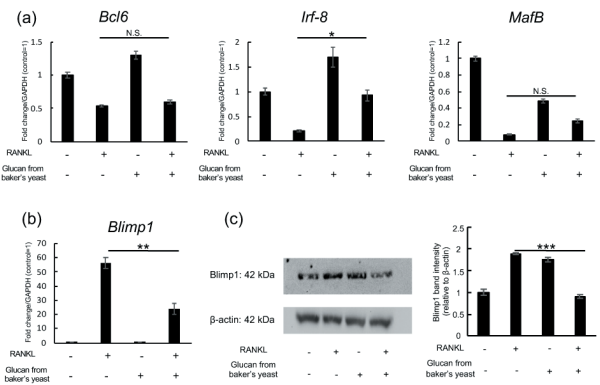


図 5 d-RAW 細胞における Blimp1 を介した破骨細胞形成の負の調節因子に対するパン酵母β-グルカンの影響

5. Syk タンパクの分解

破骨細胞形成における Syk の役割を解明するために、Western blotting 法にてパン酵母β-グルカンで刺激した d-RAW 細胞における Syk 発現を調べた。Syk のタンパク質レベルは、パン酵母β-グルカン刺激 15 分後から徐々に低下することがわかった (図 6a)。細胞内タンパク質分解は主に、オートファジーシステムとユビキチン-プロテアソームシステムの両者を介して制御される。これらのシステムが Syk タンパク質の分解に関与している可能性を想定し、オートファジーシステム阻害剤の BafilomycinA1 (図 6b) 及びユビキチン-プロテアソームシステム阻害剤の MG132 (図 6c) で d-RAW 細胞をそれぞれ前処理し、パン酵母β-グルカン添加後の Syk タンパクの発現を調べた。その結果、いずれの阻害剤処理群においてもパン酵母β-グルカンによる Syk の分解が回復した。

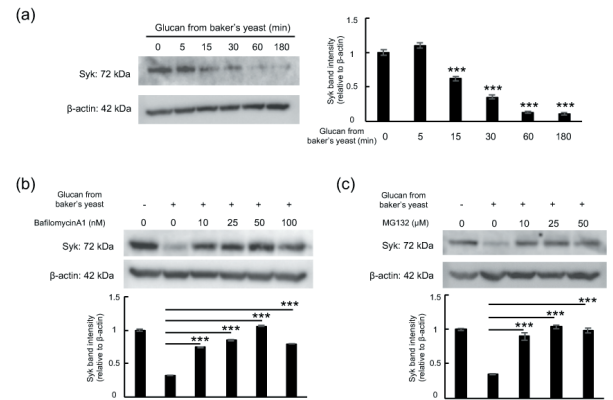


図 6 d-RAW 細胞における RANKL 誘導破骨細胞形成に対する Syk の効果

最後に、図 7 に示すように、我々の研究結果からパン酵母β-グルカンが破骨細胞前駆細胞に発現している dectin-1 に結合し、NFATc1 の発現を阻害することにより RANKL に誘導される破骨細胞分化を抑制することが示唆された。さらに、パン酵母β-グルカンによる NFATc1 発現の阻害は、1) NF-κB p65 と c-fos の抑制、2) 転写因子 Blimp 1 を介した破骨細胞形成の負の調節因子である Irf-8 の発現回復、3) オートファジーリソソームシステムおよびユビキチン-プロテアソームシステムを介した Syk タンパク質の

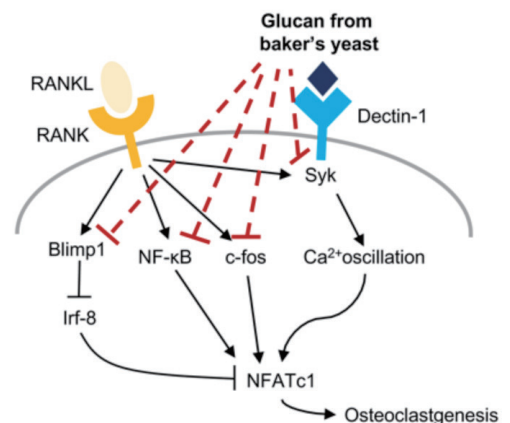


図 7 RANKL 誘導破骨細胞形成におけるパン酵母β-グルカンの役割の概略モデル

分解による Syk を介したシグナル伝達の抑制の 3 つの機構に依存することを見出した。これらの研究結果から、パン酵母 β -グルカンに関するさらなる研究が骨粗鬆症などの破骨細胞関連骨疾患の治療の一助となる可能性が示唆された。

成果発表： (予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

学会発表

1. 第 58 回日本小児歯科学会、2020 年 5 月

パン酵母 β -グルカンによる RANKL 誘導破骨細胞形成の抑制メカニズム

2. 第 62 回歯科基礎医学会学術大会、2020 年 9 月

Dectin-1 を介したパン酵母 β -グルカンによる破骨細胞分化の抑制メカニズム

学術論文

Dectin-1-mediated suppression of RANKL-induced osteoclastogenesis by glucan from baker's yeast (2020). Shiika Hara, Yoshie Nagai-Yoshioka, Ryota Yamasaki, Yoshiyuki Adachi, Yuko Fujita, Kouji Watanabe, Kenshi Maki, Tatsuji Nishihara, Wataru Ariyoshi. *Journal of Cellular Physiology*.