

氏名	内田 瑤子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5949号
学位授与の日付	平成31年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Commensal Microbiota Enhance Both Osteoclast and Osteoblast Activities (常在菌が破骨細胞と骨芽細胞の活性化を促進する)
論文審査委員	吉田 竜介 教授      小橋 基 准教授      西田 崇 准教授

## 学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

### 【緒言】

人体には多数の常在菌が生息している。人工的に常在菌を欠いた germ free (GF) マウスと比較した研究から、常在菌は免疫応答の発達や維持に加えて様々な器官の代謝機能にも重要な役割を果たしていることが次々と明らかになってきた。さらに、常在菌の骨代謝への影響も示唆されており、特に常在菌を有する specific-pathogen-free (SPF) マウスでは破骨細胞が活性化されていること、SPFマウスの大腿骨がGFマウスと比較して大きいことなどが報告されている。しかしながら、骨芽細胞の活性化に対する常在菌の影響については全く調べられていない。本研究では、GFマウスと SPFマウスを用いて、破骨細胞と骨芽細胞の活性化における常在菌の影響について検討した。

### 【方法】

8週齢の GF および SPF マウスを用いた。血清中の骨形成マーカーとして osteocalcin を、骨吸収マーカーとして tartrate-resistant acid phosphatase form 5b (TRAP-5b) を ELISA 法で定量した。下顎骨は組織切片を作製し、下顎骨骨髄内部の破骨細胞分布を調べるため TRAP 染色を行った。さらにマイクロ CT 解析を行い、内部骨密度・骨量を計測した。頭蓋冠より通法に従い骨芽細胞を単離した。分化誘導培地中で 5 週間培養後、アリザリンレッド染色で石灰化度を比較した。また骨芽細胞から RNA を抽出し、骨形成・骨吸収に関与する遺伝子の発現を調べた。さらに骨芽細胞内における転写因子発現を PCR アレイを用いて網羅的に解析した。また下顎骨からも直接 RNA を抽出し、骨形成に関わる遺伝子発現を PCR アレイを用いて解析した。なお、群間の比較には t 検定を用いた。

## 【結果】

SPF マウスの体重は GF マウスと比較して有意に重かった ( $P < 0.05$ ). 血清中 TRAP-5b 濃度は、SPF マウスで有意に高かった ( $P < 0.01$ ). 血清中の osteocalcin は両群で差を認めなかった。下顎骨の組織切片の TRAP 染色の結果、骨髄内部の破骨細胞数は SPF マウスで有意に多かった ( $P < 0.05$ ). マイクロ CT 解析では、歯槽骨骨髄骨密度・骨量ともに SPF マウスの方が有意に低かった ( $P < 0.05$ ). 頭蓋骨の石灰化度は GF マウスと比べ SPF マウスで抑制されていた ( $P < 0.01$ ).

初代骨芽細胞の遺伝子発現を調べたところ、insulin-like growth factor-1 (IGF-1)や osteocalcin mRNA の発現は SPF マウスのほうが GF マウスよりも有意に高かった ( $P < 0.05$ ). 転写因子の PCR アレイによる網羅的解析から、SPF マウスで Forkhead box protein G1 (Foxg1)および androgen receptor (Ar) mRNA の発現が GF マウスと比較して高く、一方で GATA binding protein 3 (Gata3) mRNA の発現が抑制されていた。下顎骨由来 RNA の PCR アレイ解析では、SPF マウスにおける osteocalcin や cathepsin K mRNA といった骨のリモデリングに関与する遺伝子の発現が GF マウスと比べて有意に増加していた ( $P < 0.05$ ).

## 【考察】

これまで SPF および GF マウスを用いて常在菌の骨代謝に及ぼす影響を調べたいくつかの報告では、常在菌による骨形成の促進を示唆する報告と抑制を示唆する報告の両者がみられ、一定の結論は得られていない。一方、今回の研究で観察された破骨細胞の活性化に関する指標は SPF マウスの方が高く、この点は先行研究と一致する。

下顎歯槽骨内部骨密度・骨量の結果と培養骨芽細胞におけるアリザリンレッド染色の結果、GF マウスと比べ SPF マウスで石灰化が抑制されていた。常在菌の存在は過度な石灰化を抑制していると考えられる。骨芽細胞および下顎骨内の骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現を調べると alkaline phosphatase (Alp) に加え osteocalcin mRNA の発現が、GF マウスよりも SPF マウスにおいて有意に亢進していた。このことは SPF 由来骨芽細胞が GF 由来と比較して活性化されていることを示している。osteocalcin mRNA は石灰化を促進するが、過度の石灰化を抑制するとされている。今回の結果から、常在菌存在下では破骨細胞のみでなく骨芽細胞も活性化されることにより石灰化が制御されていると考えられる。

IGF-1 は骨格成長に寄与する。今回、骨芽細胞内の IGF-1 mRNA の発現を比較した結果、SPF マウスの方が GF マウスと比較して有意に高かった。さらに体格も SPF マウスの方が大きかったことを確認している。先行研究においても大腿骨長は SPF マウスの方が長い、あるいは反対に短いとの報告があるものの、常在菌の存在が骨格成長に寄与する可能性があると考えられる。

骨芽細胞の転写因子の発現を比較した結果、Foxg1, Ar および Gata3 の 3 遺伝子で発現に違いを認めた。Foxg1 は Alp や osteocalcin mRNA の活性化に寄与することが近年報告されている。さらに Gata3 は免疫系細胞の分化の方向性を決定する遺伝子である。これらの結果は、常在菌が骨芽細胞の分化過程においてエピジェネティックな変化を与え、様々な遺伝子発現を制御している可能性を示唆している。

## 【結論】

常在菌は破骨細胞の活性化だけでなく、osteocalcin mRNAを含む遺伝子発現に影響を及ぼすことによって骨芽細胞を活性化させ、石灰化を制御している可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

人体には多数の常在菌が生息している。人工的に常在菌を欠いたgerm free (GF)マウスを用いた研究から、常在菌は免疫応答の発達や維持に加えて様々な器官の代謝機能にも重要な役割を果たしていることが次々と明らかになってきた。さらに、常在菌は骨代謝にも影響をおよぼすことが示唆されている。常在菌を有するspecific-pathogen-free (SPF) マウスでは破骨細胞が活性化されていること、SPFマウスの大腿骨がGFマウスと比較して大きいことなどが報告されている。しかしながら、骨芽細胞の活性に対する常在菌の影響については未だ不明な点が多い。本研究では、GFマウスとSPFマウスを用いて、破骨細胞と骨芽細胞の活性化における常在菌の影響について検討した。

8週齢のGFおよびSPFマウスを用いた。血清中の骨形成マーカーとしてosteocalcinを、骨吸収マーカーとしてtartrate-resistant acid phosphatase form 5b (TRAP-5b)をELISA法で定量した。下顎骨骨髓内部の破骨細胞分布を調べるため、下顎骨の組織切片を作製し、TRAP染色を行った。さらに下顎骨のマイクロCT解析を行い、下顎骨内部の骨密度・骨量を計測した。

GFおよびSPFマウス由来の頭蓋冠から、それぞれ骨芽細胞を単離し、分化誘導培地中で5週間培養後、アリザリンレッド染色で石灰化度を比較した。また、total RNAを抽出し、骨形成・骨吸収に関与する遺伝子の発現を定量RT-PCR法で調べた。骨芽細胞における転写因子の遺伝子発現をPCRアレイで網羅的に解析した。また、下顎骨からも直接RNAを抽出し、骨形成に関わる遺伝子発現をPCRアレイで網羅的に解析した。なお、群間の比較にはt検定を用いた。

SPFマウスの体重はGFマウスと比較して有意に重かった ( $P < 0.05$ )。血清中のTRAP-5b濃度は、SPFマウスで有意に高かった ( $P < 0.01$ )。血清中のosteocalcinは両群で差を認めなかった。下顎骨組織切片のTRAP染色の結果、海綿骨の破骨細胞数はSPFマウスで有意に多かった ( $P < 0.05$ )。マイクロCT解析では、歯槽骨内部の海綿骨の骨密度・骨量ともにSPFマウスの方が有意に低かった ( $P < 0.05$ )。頭蓋骨の石灰化度はGFマウスと比べSPFマウスで抑制されていた ( $P < 0.01$ )。初代骨芽細胞の遺伝子発現レベルを調べたところ、*Insulin-like growth factor-1 (Igf-1)*および*Osteocalcin*の発現はSPFマウスのほうがGFマウスよりも有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。PCRアレイを用いて転写因子を網羅的に解析した結果、SPFマウスで*Forkhead box protein G1 (Foxg1)*および*Androgen receptor (Ar)*の発現がGFマウスと比較して高く、一方、*GATA binding protein 3 (Gata3)*の発現が抑制されていた。下顎骨から直接単離したRNAによるPCRアレイ解析では、SPFマウスにおける*Osteocalcin*や*Cathepsin K*といった骨のリモデリングに関与する遺伝子の発現がGFマウスと比べて有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。

これまでSPFおよびGFマウスを用いて常在菌の骨形成や骨吸収に及ぼす影響を調べたいくつかの報告では、常在菌による破骨細胞の活性化の促進では一致しているものの、骨芽細胞による骨形成の促進を示唆する報告と逆に骨形成の抑制を示唆する報告の両者がみられ、一定の結論は得られていない。今回の研究では、破骨細胞の活性化に関する指標はSPFマウスの方が高く、この点は先行研究と一致したが、下顎歯槽骨内部の海綿骨の骨密度・骨量の測定結果と培養骨芽細胞におけるアリザリンレッド染色の結果は、GFマウスに比べてSPFマウスの骨芽細胞で石灰化が抑制され

たことを示しており、本研究において、常在菌の存在は骨芽細胞の分化を促進するものの、過度な石灰化は抑制すると考えられた。実際、骨芽細胞および下顎骨内の骨芽細胞の分化マーカー遺伝子発現の解析から、*Alkaline phosphatase (Alp)*および*Osteocalcin*の発現がGFマウスよりもSPFマウスにおいて有意に亢進していた。このことはSPF由来の骨芽細胞がGFマウス由来の骨芽細胞と比較して分化が亢進していることを示している。*osteocalcin*は石灰化を促進するが、過度の石灰化は抑制すると考えられており、今回の結果から、常在菌存在下では破骨細胞のみでなく骨芽細胞も活性化されることにより石灰化が制御されていると考えられる。

IGF-1は骨格成長に寄与する。今回、骨芽細胞内の*Igf-1*の発現を比較した結果、SPFマウスの方がGFマウスと比較して有意に高かった。さらに体格もSPFマウスの方が大きかったことを確認している。先行研究においても大腿骨長がSPFマウスの方が長いとの報告もあり、常在菌の存在が骨格成長に寄与する可能性があると考えられる。

骨芽細胞の転写因子の発現を比較した結果、*Foxg1*、*Ar*および*Gata3*の3遺伝子で発現に違いを認めた。*Foxg1*は*Alp*や*Osteocalcin*の発現を誘導することが近年報告されている。さらに*Gata3*は免疫系細胞の分化の方向性を決定する遺伝子である。これらの結果は、常在菌が骨芽細胞の分化過程において、これら転写因子の発現を制御することで、骨形成や骨吸収に関わる様々な遺伝子の発現を制御している可能性を示唆している。

結論として、常在菌は破骨細胞の活性化だけでなく、*Osteocalcin*を含む骨芽細胞分化に関連する遺伝子発現に影響を及ぼすことによって骨芽細胞を活性化させ、石灰化を制御している可能性が示唆された。

本論文は、常在菌の有無による骨芽細胞の分化および石灰化制御を検証したものであり、査読付きの欧文雑誌にすでに掲載済みである。さらに、先行研究とのマウスのstrainによる菌の違いや骨格への影響の差、また石灰化制御の解釈等、多岐にわたって審査員から質問され、申請者は的確に回答した。

本論文は、常在菌の有無が骨格成長や骨の石灰化制御に関与するという新たな知見を示したものである。よって、本審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。