

氏名	吉川 友理
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6709号
学位授与の日付	令和4年9月22日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Roles for B[a]P and FICZ in subchondral bone metabolism and experimental temporomandibular joint osteoarthritis via the AhR/Cyp1a1 signaling axis. (AhR/Cyp1a1 シグナル伝達経路を介した関節下骨部の骨代謝や実験的変形性顎関節症における B[a]P および FICZ の役割.)
論文審査委員	久保田 聡 教授 池亀 美華 准教授 寺町 順平 准教授

学位論文内容の要旨

ダイオキシン受容体として知られる転写因子 AhR (aryl hydrocarbon receptor) は、様々な組織に発現を認め、最近では一部の免疫細胞にも高発現していることがわかっている。当教室においても、これまで AhR が RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) シグナルを介した破骨細胞形成において重要であり、骨の恒常性と骨折の治癒にも関与していることを報告してきたものの、各種 AhR リガンドを介した破骨細胞分化や顎関節を含む骨代謝への詳細な影響については未だ不明な点が多いのが現状である。また、近年の疫学的研究では、たばこ煙中に AhR を活性化する有害物質 B[a]P (benzo[a]pyrene) が極めて高レベル含まれており、喫煙によって生体内の AhR は活性化され、炎症関連病態である骨粗鬆症や関節リウマチ、変形性顎関節症 (TMJ-OA) との関連が示唆されている。さらに必須アミノ酸のトリプトファン代謝物である FICZ (6-formylindolo[3,2-b]carbazole) は高親和性の内因性 AhR リガンドとして知られており、FICZ による AhR の活性化が皮膚の炎症を減弱し皮膚のターンオーバーに関与することが報告されている。そこで、AhR の外因性リガンド B[a]P 及び内因性リガンド FICZ などの種々の AhR リガンドを使用して破骨細胞を含めた下顎頭骨吸収へのメカニズムについて解析することを本研究の目的とした。

喫煙が骨粗鬆症のリスクファクターであることは疫学的にはよく知られた事実であるが、とりわけ下顎頭におけるそのメカニズムは十分に明らかにされていない。タバコの煙には発がん性物質が 100 種類以上含まれていることが知られているが、その中で最も強力な化学物質の一つが B[a]P である。そこで、野生型 (WT) マウス及び AhR 遺伝子欠損 ($AhR^{-/-}$) マウスを用いて 120 mg/kg の B[a]P を 6 日間経口投与させ、下顎頭関節下骨部及び破骨細胞への影響を比較検討した。

その結果、WT マウス B[a]P 経口投与群ではマイクロ CT 解析によって著明な骨密度 (BV/TV) の低下、骨梁幅 (Tb.Th) の減少、骨梁間隔 (Tb.Sp) の増大を認めたが、 $AhR^{-/-}$ マウスにおいては B[a]P 経口投与による影響がみられなかった。

また、下顎頭部での TRAP 染色を行い、骨吸収についての組織学的評価を実施したところ、

WT マウス B[a]P 経口投与群では破骨細胞の著しい集積がみられたが、*AhR*^{-/-}マウスにおいては、下顎頭下骨部において B[a]P 経口投与による破骨細胞の活性の変動を認めなかった。さらに、AhR 標的遺伝子の一つである *Cyp1a1* (cytochrome P4501A1) の下顎頭部での発現解析を行ったところ、WT マウスにおいて著明な発現上昇を示した一方で、*AhR*^{-/-}マウスでは B[a]P 経口投与による *Cyp1a1* 発現の変化を認めなかった。

次に、内因性 AhR リガンド FICZ の下顎頭への影響を解明するために過開口による TMJ-OA モデルマウスを用いて 100 µg/kg (FICZ low 群) あるいは 100 mg/kg (FICZ high 群) の用量の FICZ を 1 週間に 2 回尾静脈注射を実施し、破骨細胞など骨吸収活性を指標として vehicle 投与群と比較検討した。TMJ-OA モデルマウスの下顎頭をマイクロ CT 解析によって形態学的に解析した結果、下顎頭表面のびらんや BV/TV、Tb.Th、Tb.Sp などの骨量の指標は FICZ high 群において無処置群と同程度にまで回復傾向を示した。組織学的解析においては TMJ-OA モデルマウス下顎頭の過剰な TRAP 陽性破骨細胞の集積、TUNEL 陽性アポトーシス細胞やアポトーシス実行因子である Caspase 3 分断化の割合は FICZ の投与用量依存的に減少傾向がみられた。また、FICZ high 群においてサフラニン O 染色により下顎頭軟骨プロテオグリカン層の回復を認めた。TMJ-OA モデルマウス下顎頭では AhR の標的遺伝子 *Cyp1a1* の発現上昇を認めたものの、FICZ 投与により有意に *Cyp1a1* の発現低下がみられた。さらに *in vitro* においても FICZ 添加により濃度依存的に TRAP 陽性破骨細胞形成能、および破骨細胞において *Cyp1a1* 発現の低下を認めた。

以上の結果より、AhR リガンドである B[a]P 及び FICZ 投与により、下顎頭において各々異なる作用を示し、AhR リガンド刺激による *Cyp1a1* を介した AhR 活性化経路が破骨細胞分化において重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの所見は、TMJ-OA を含めた AhR 関連の炎症性骨代謝疾患に対する新しい治療方法の開発及び臨床応用に大きな意義を有することが期待される。

論文審査結果の要旨

ダイオキシン受容体として知られる転写因子 aryl hydrocarbon receptor (AhR) は、様々な組織に発現を認め、最近では一部の免疫細胞にも高発現していることがわかっている。しかしながら、各種 AhR リガンドを介した破骨細胞分化や顎関節の骨代謝への詳細な影響については未だ不明な点が多いのが現状である。また、近年の疫学的研究では、たばこ煙中に高レベルで含まれている有害物質 benzo[a]pyrene (B[a]P) による AhR の活性化と、炎症関連病態である骨粗鬆症や変形性顎関節症 (TMJ-OA) との関連が示唆されている。さらに、必須アミノ酸のトリプトファン代謝物である 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) は高親和性の内因性 AhR リガンドとして知られている。本研究の目的は、AhR の外因性リガンド B[a]P 及び内因性リガンド FICZ を使用して、AhR を介した下顎頭骨吸収促進メカニズムを解明することである。

野生型 (WT) マウス及び AhR 遺伝子欠損 ($AhR^{-/-}$) マウスに、120 mg/kg の B[a]P を 6 日間経口投与後、下顎関節下骨部及び破骨細胞への影響を比較検討した。また、内因性 AhR リガンド FICZ の下顎頭への影響を解明するために、過開口による TMJ-OA モデルマウスに、100 μ g/kg (FICZ low 群) あるいは 100 mg/kg (FICZ high 群) の用量の FICZ を 1 週間に 2 回尾静脈注射を実施し、破骨細胞数や骨密度、関連遺伝子発現などを指標として vehicle 投与群と比較検討した。

WT マウス B[a]P 経口投与群では μ CT 解析によって著明な骨密度の低下を認めたが、 $AhR^{-/-}$ マウスにおいては B[a]P 経口投与による影響がみられなかった。また、下顎頭骨吸収についての組織学的評価では、WT マウス B[a]P 経口投与群では下顎関節下骨部において破骨細胞の著しい集積がみられた。さらに、AhR 標的の一つである cytochrome P4501A1 遺伝子 (*Cyp1a1*) の下顎頭部での発現解析を行ったところ、WT マウスにおいて B[a]P 経口投与群では著明な発現上昇を示した一方で、 $AhR^{-/-}$ マウスでは B[a]P 経口投与による変化はみられなかった。また、TMJ-OA モデルマウスの下顎頭を μ CT によって解析した結果、vehicle 投与群では下顎頭表面は粗造になり、骨量は減少していたが、FICZ high 群では無処置群と同程度にまで回復した。また、vehicle 投与群の下顎頭における過剰な破骨細胞の集積やアポトーシス細胞の割合は、FICZ の投与用量依存的に減少する傾向がみられた。vehicle 投与群の下顎頭では AhR の標的遺伝子 *Cyp1a1* の発現が上昇したが、FICZ 投与により有意に低下した。さらに、*in vitro* においても FICZ 濃度依存的に破骨細胞形成能の低下を認めた。

以上のように本論文は、AhR リガンドである B[a]P 及び FICZ 投与が下顎頭において各々異なる作用を示し、AhR リガンド刺激による *Cyp1a1* を介した AhR 活性化経路が破骨細胞分化において重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

本論文はすでに Scientific Reports に掲載されており、国際的にも評価されている。

よって、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。