

吉田 一 論文内容の要旨

主 論 文

Pepstatin A, an aspartic proteinase inhibitor, suppresses
RANKL-induced osteoclast differentiation

ペプスタチン A (アスパラギン酸プロテアーゼインヒビター) は
RANKL により誘導される破骨細胞分化を抑制する

吉田 一 岡元 邦彰 岩本 勉 坂井 詠子 金岡 和博 胡 錦萍
柴田 光枝 佛坂 齊祉 西下 一久 水野 明夫 加藤 有三

Journal of Biochemistry 掲載時期未定
ページ数未定

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員: 水野 明夫 教授)

緒 言

破骨細胞は様々なプロテアーゼを産生し、これらは骨吸収において重要な役割を果たしている。メタロプロテアーゼである MMP-9 あるいはシステインプロテアーゼであるカテプシン K は骨吸収に関与していることが知られている。しかし細胞内アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D・E (CD・CE) は、その役割についてほとんど知られていない。そこで今回は CD・CE の阻害薬であるペプスタチン A を作用させることによる破骨細胞への影響を検討した。

対象と方法

実験動物として 5-6 週齢の雄の ddY マウスを用いた。細胞培養法としては、プロスタグランジン E₂ とビタミン D₃ の存在下で、マウス頭蓋骨より採取した骨芽細胞様細胞と骨髄細胞との共培養系、骨髄細胞に M-CSF と RANKL を加えた系、骨髄細胞を Sephadex G-10 カラムに通し、できるだけ骨芽細胞様細胞を取り除き M-CSF と RANKL を加えた系を行い、破骨細胞のマーカである tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) の染色をし、ペプスタチン A 添加群と非添加群の破骨細胞数を比較した。RT-PCR 法は 5 日間培養した骨芽細胞様細胞と、骨髄細胞を G-10 カラムに通して 3 日間培養した細胞、real-time RT-PCR 法は bone marrow macrophage (BMMs) を培養した細胞から total RNA を抽出し、逆転写を行った後、それぞれ標的遺伝子の特異的 primer を用いて PCR を行った。プロテア

ーゼ活性の測定は、酸変性させたヘモグロビンと細胞抽出液を pH3.8 にて 40°C で 40 分間反応させ、トリクロロ酢酸で停止させた後、遠心し、その上清を BCA kit にて測定した。またウエスタンブロット法により RANKL 刺激によるシグナル伝達の解析を行った。

結 果

全ての系においてペプスタチン A 添加群は濃度依存的に破骨細胞数の減少が観察されたが、骨芽細胞様細胞の mRNA レベルにおける M-CSF、RANKL、OPG の発現量に差はみられず、破骨細胞の膜受容体にも変化を認めなかった。ペプスタチン A は破骨細胞分化過程の 0-3 日に添加した群が 3-5 日に添加した群より強い抑制効果がみられた。また CD・CE のプロテアーゼ活性はペプスタチン A による破骨細胞数抑制効果がみられない低濃度で抑制されていた。さらに RANKL 下流シグナルにおける解析では ERK のリン酸化、NFATc1 発現量の抑制が観察された。

考 察

ペプスタチン A は濃度依存的に破骨細胞分化を抑制した。この抑制は骨芽細胞ではなく破骨細胞に直接作用しており、細胞内アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシン D に非依存的であった。またこの抑制作用は血液幹細胞から単核破骨細胞に分化する過程において強く作用していた。細胞内シグナル伝達分子の解析から、ペプスタチン A は ERK のリン酸化や NFATc1 発現量を抑制することにより破骨細胞分化を抑制していることが示唆された。