

ふりがな氏名	いわき ふとし 岩城 太
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	乙 第 1606 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項に該当
学位論文題目	Nicorandil inhibits osteoclast differentiation in vitro （破骨細胞分化過程におけるニコランジルの抑制効果）
学位論文掲載誌	European Journal of Pharmacology 第 793 巻 平成 28 年 12 月
論文調査委員	主査 大浦 清 教授 副査 西川 泰央 教授 副査 今井 弘一 教授

#### 論文内容要旨

ニコランジルは、nitric oxide (NO)作用と ATP 感受性 K チャネル(K<sub>ATP</sub> チャネル)の開口作用を有するハイブリッド型の狭心症治療薬である。破骨細胞の分化や活性化には、NO や細胞内カルシウムの一過性上昇が深く関わっていることが明らかにされている。本研究は、ニコランジルの薬理作用が、*in vitro*において破骨細胞分化過程における抑制効果を得られるか否かを検証する目的で行った。

Emori らの方法に従い、造血幹細胞は 5-8 週齢の ddY マウスから採取した。10% fetal bovine serum(FBS)、1% GultaMAX、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution を含む pH7.0 の  $\alpha$ -minimal essential medium( $\alpha$ -MEM)培地に懸濁し、 $5 \times 10^4$ 個ずつ 96 穴プラスチック培養プレートに播種した。すべての培地中に human macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 25ng/mL、soluble receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (sRANKL) 100ng/mL になるように添加した後、実験群にはニコランジルを濃度別に 1~100 $\mu$ M を添加し、非添加の対照群とに分け 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub>, 95% air 気相下にて 6 日間培養した。培地は 3 日間に一度交換した。ニコランジルの作用点の確認のため、25 $\mu$ M ニコランジルを前期(0~3 日)に加えた群、後期(4~6 日)に加えた群で破骨細胞数を比較した。培地中の NO 濃度は Griess 法にて計測した。培養終了後、ローダミンファロイジン染色および TRAP 染色にて破骨細胞数を計測した。骨吸収窩アッセイでは、von Kossa 染色にて骨吸収面積を比較した。ニコランジルによる破骨細胞抑制の薬理作用を検証するために、破骨細胞形成過程において可溶性グアニリルシクラーゼ阻害剤 (ODQ) と K<sub>ATP</sub>チャネル開口作用阻害剤(グリベンクラミド) 添加による阻害回復実験を行った。

Griess 法においてニコランジル添加により培養液中の NO 濃度は時間依存的に増加していた。その作用は破骨細胞が、単核から多核の成熟総破骨細胞になる分化後期で顕著であった。形成数の指標となる TRAP 陽性多核細胞数と活性型破骨細胞の指標となる F アクチンリングを有する細胞数は、とも

ニコランジル濃度に依存して減少した。骨吸収窩アッセイでは骨吸収面積がニコランジルの濃度依存的に減少することを観察した。阻害回復実験では、ODQ 添加群、グリベンクラミド添加群ともに破骨細胞数は増加し、さらに両剤の添加によりニコランジルによる破骨細胞形成抑制作用が消失することを確認した。

本実験結果から、NO 作用および  $K_{ATP}$  チャンネル開口作用は、ともに破骨細胞分化を抑制することがわかり、ニコランジルが骨粗鬆症治療薬につながる可能性が示唆された。

### 論文審査結果要旨

ニコランジルは、nitric oxide (NO)作用と ATP 感受性 K チャンネル( $K_{ATP}$  チャンネル)の開口作用を有するハイブリッド型の狭心症治療薬である。ニコランジルの薬理作用が、*in vitro* において破骨細胞分化過程における抑制効果を得られるか否かを検証する目的で行った。

実験には、マウスから採取した造血幹細胞を用いて、破骨細胞数、NO 濃度、骨吸収面積を比較検討した。また、ニコランジルによる破骨細胞抑制の薬理作用を検証するために、可溶性グアニリルシクラーゼ阻害剤 (ODQ) と  $K_{ATP}$  チャンネル開口作用阻害剤 (グリベンクラミド) 添加による阻害回復実験を行った。

その結果、ニコランジル添加により培養液中の NO 濃度は時間依存的に増加していた。その作用は破骨細胞が、単核から多核の成熟総破骨細胞になる分化後期で顕著であった。また、F アクチンリングを有する細胞数は、ともにニコランジル濃度に依存して減少した。骨吸収窩アッセイでは骨吸収面積がニコランジルの濃度依存的に減少することを観察した。阻害回復実験では、ODQ 添加群、グリベンクラミド添加群ともに破骨細胞数は増加し、さらに両剤の添加によりニコランジルによる破骨細胞形成抑制作用が消失することを確認した。

以上、NO 作用および  $K_{ATP}$  チャンネル開口作用は、ともに破骨細胞分化を抑制することが判明し、ニコランジルが骨粗鬆症治療薬につながる可能性を示した点において、本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。

なお、外国語 1 か国語 (英語) について試問を行った結果、合格と認定した。