

# 論文内容要旨

## 乳塩基性タンパク質による骨代謝調節機構の解明研究

大 町 愛 子

### 1. 本研究の背景および目的

超高齢社会を迎えた日本において、要介護（要支援）の主な背景因子である骨折につながる骨粗鬆症の対策は喫緊の課題である。また、骨粗鬆症の増加は高齢化だけではなく、続発性骨粗鬆症の1つである炎症性疾患の増加も背景にある。炎症は生体にとって必須の防御反応であるが、関節リウマチ、炎症性腸疾患、および食物アレルギー性腸疾患などの自己免疫疾患やアレルギーといった炎症では、免疫担当細胞である T 細胞の過剰な活性化によって骨粗鬆症が引き起こされると考えられている。

牛乳は、骨の成長に寄与する栄養成分を豊富に含むことに加え、免疫調節成分を含むことが見出されている。牛乳由来の塩基性タンパク質（Milk Basic Protein ; MBP）は、脱脂乳から陽イオン交換クロマトグラフィーによって分離された塩基性タンパク質の複合物である。これまでに、細胞培養試験、モデル動物実験さらにヒト試験において、MBP は骨代謝改善作用を有することを示してきた。MBP はラクトフェリン、ラクトペルオキシダーゼ、アンジオジェニンおよびシスタチン C などのホエイタンパク質を主成分とし、これらの成分が破骨細胞の機能を調節して骨吸収を抑制することを明らかにしている。また、MBP にわずかに含まれる High Mobility Group 様タンパク質やキニノーゲンフラグメント 1/2 には骨芽細胞増殖作用が認められている。さらに、骨芽細胞の増殖や分化作用を有するインスリン様成長因子（Insulin-like growth factor ; IGF）-1/2、線維芽細胞増殖因子、およびトランスフォーミング増殖因子（Transforming growth factor ; TGF）- $\beta$  などの成長因子は、塩基性を有するタンパク質であるため、MBP に含まれることが推測される。

成長期における骨量増加は、最大骨量を増加させ、将来的に骨粗鬆症の発症

リスクを低減するという観点から重要である。また、増加する炎症性疾患に起因する骨粗鬆症の対策も重要であり、この 2 つに対応できるような食品の重要性は高い。しかしながら、これまでの MBP 研究では、加齢による骨量低下に対して予防的作用があることを実証するにとどまっている。すなわち、MBP には骨芽細胞の増殖や分化に作用する成分も含まれることから、成長期における MBP 摂取は骨量を増加させることが期待されるものの、今までに検証されていない。また、これまでの研究結果によれば、MBP の骨量増加作用は、骨芽細胞のコラーゲン産生の促進を介することが推測されるが、MBP 中の有効成分とその含有量は明確にされていない。さらに、MBP 摂取は炎症に起因する骨量減少に対して予防的作用を発揮するかを検討したことはない。そこで、本研究では、経口摂取することで骨代謝を改善し、骨密度減少の抑制作用を示すことが報告されている MBP について、その骨代謝制御メカニズムの解明につなげることを目的として、MBP の骨代謝調節作用に影響を及ぼす因子を検討した。

## 2. 本研究の構成と各章の要約

第 1 章では、骨形成が優位な成長期マウスに対する MBP 摂取実験を実施し、骨形成優位状態において MBP の骨形成促進作用が発揮されるかを検討した。成長期のマウスに対して、MBP 不含脱イオン水（コントロール）、または MBP を含有する脱イオン水を 10 週間摂取させ、MBP 摂取による骨量の変化を評価した。その結果、MBP 摂取により脛骨皮質骨の骨密度および大腿骨海綿骨の骨体積/組織体積がコントロール群と比べ増加した。培養細胞を用いて MBP の骨リモデリング（骨形成と骨吸収）に対する作用を調べた結果、MBP は骨芽細胞の増殖を促進する一方、破骨細胞の分化を抑制した。また、MBP 摂取により、IGF-1 および胃から分泌される内因性成長ホルモン分泌促進因子であるグレリンの血中濃度がコントロール群と比べ増加した。以上より、MBP の摂取は、骨リモデリングに対する直接的な作用に加え、グレリン/GH/IGF-1 を介した間接的な骨形成作用により、成長期における骨量増加促進効果をもたらすと考えられた。

第 2 章では、繊維芽細胞や骨芽細胞といった間葉系細胞を用いた培養細胞実験を実施し、コラーゲン産生を促進する MBP 中の関与成分を探索した。これまでに、MBP は、ヒト骨芽細胞 MG-63 の I 型プロコラーゲン mRNA 発現量を増

加させることが示されており、加えて第 1 章で示された MBP の骨形成促進作用は、骨芽細胞のコラーゲン産生を促進することで発揮された可能性も考えられた。そこで、陽イオン交換クロマトグラフィーによりさらに分画した MBP 分画物を間葉系細胞の培養系に添加し、コラーゲン産生マーカーである I 型プロコラーゲン C 末端ペプチド (Procollagen type I C-terminal peptides ; PICP) の培養上清中濃度を測定することで、コラーゲン産生促進活性を評価した。これまでに、TGF- $\beta$ 1 には間葉系細胞のコラーゲン産生を促進することが知られているため、MBP 分画物中の TGF- $\beta$ 1 及び  $\beta$ 2 濃度を ELISA にて測定した。また、細胞培養系に TGF- $\beta$  受容体阻害剤を添加して、MBP 分画物によるコラーゲン産生促進作用が TGF- $\beta$  シグナル伝達経路を介するか検証した。その結果、PICP 濃度は特定の MBP 分画物を添加した細胞培養上清中で増加し、このコラーゲン産生促進活性と MBP 分画物中の TGF- $\beta$ 1 及び  $\beta$ 2 の濃度に相関が認められた。また、MBP 分画物添加による PICP 濃度の増加作用は、TGF- $\beta$  受容体阻害剤によって阻害されたことから、MBP 中の TGF- $\beta$  がその受容体を介してコラーゲン産生促進に関与することが示された。以上により、MBP 中の TGF- $\beta$ 1 および  $\beta$ 2 が、線維芽細胞および骨芽細胞といった間葉系細胞におけるコラーゲン産生に対して促進作用を有することが示された。

第 3 章では、食物アレルギー性腸炎モデルマウスに対する MBP 摂取実験を実施し、炎症に起因する骨量減少に対して MBP の骨代謝調節作用が発揮されるか検討した。第 2 章で MBP 中の有効成分として同定した TGF- $\beta$ 1 および TGF- $\beta$ 2 には、T 細胞の活性化を抑制することが報告されていることから、MBP 摂取は抗炎症作用を発揮する可能性が考えられた。そこで、卵白アルブミン (Ovalbumin; OVA) 特異的 T 細胞受容体遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (OVA23-3 マウス) に OVA を給餌して作出する食物アレルギー性腸炎モデルを用いて、OVA 特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞応答に対する MBP の影響を評価した。すなわち、腸間膜リンパ節 (Mesenteric Lymph nodes; MLNs) 由来 OVA 特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞を CD11c<sup>+</sup>樹状細胞共存下において OVA で刺激したとき、T 細胞活性化マーカーである CD69 の発現率とサイトカイン産生に対する MBP の影響を評価した。ついで、OVA23-3 マウスに対して OVA と MBP を含む飼料を 28 日間給餌し、腸炎の形成、CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化、サイトカイン (IL-4 および IFN- $\gamma$ ) 産生およ

び骨密度の変化を評価した。その結果、MBP は、OVA 刺激により誘導される CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化およびサイトカイン産生を抑制した。OVA を摂取した OVA23-3 マウスは、MLNs における CD4<sup>+</sup>T 細胞の過剰な活性化に伴い、骨髄 CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化も誘導され、同時に骨量減少を呈することを発見した。このとき、MBP の同時摂取は MLNs と骨髄双方の CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化を抑制するとともに、破骨細胞分化誘導因子のデコイ受容体であるオステオプロテゲリンの血中濃度を増加させ、骨量減少を抑制することが示された。以上より、MBP の摂取は、全身的な T 細胞活性化抑制作用により、炎症に起因する骨量減少に対して骨吸収抑制効果をもたらすと考えられた。

### 3. 総括

本研究によって、MBP の摂取は、骨形成優位な状態で骨量増加をさらに促進し、骨吸収促進因子である炎症状態で骨量減少を抑制した。MBP には TGF- $\beta$  が含まれることから、MBP の摂取は、TGF- $\beta$  を介してこれらの作用が発揮される可能性がある。骨粗鬆症の治療には、骨吸収抑制だけでなく骨形成促進という骨リモデリング双方に焦点を当てた医薬品として、ビタミン D や PTH とその誘導体があるが、経済性、安全性の面から長期的摂取には適さない。一方、比較的安価かつ長期間穏和な条件で摂取できる食品成分の MBP は、本研究により、これまで報告してきた老年期に加えて成長期、さらに炎症状態など、骨代謝が様々な要因により影響を受ける状態においても、その骨代謝改善作用の有効性を拡大し得る結果が得られた。したがって、MBP は現代社会が抱える課題に対応できる機能性食品になり得ることが期待できる。

今後は、MBP 中の TGF- $\beta$  の生体利用性の検証に加え、MBP に含まれるグレリン分泌促進作用を示す成分や、MLNs における T 細胞の活性化を抑制する成分、さらにはオステオプロテゲリン産生の促進作用を示す成分について、MBP 中の有効成分の探索・同定が必要である。このように、本研究をきっかけとして、胃や腸において誘導された因子が骨代謝に作用するという発症メカニズムの解明研究と、この作用メカニズムを利用した骨粗鬆症治療薬の探索研究が進むことが期待される。

論文提出者 : 大町 愛子

論文審査委員 (主査) : 平澤 典保

論文題目 : 乳塩基性タンパク質による骨代謝調節機構の解明研究

牛乳は、骨の成長に寄与する栄養成分を豊富に含むことに加え、免疫調節成分も含むことも見出されている。牛乳由来の塩基性タンパク質 (Milk Basic Protein ; MBP) は、脱脂乳から陽イオン交換クロマトグラフィーによって分離された塩基性タンパク質の複合物であり、これまでに、細胞培養試験、モデル動物実験さらにヒト試験において、MBP は骨代謝改善作用を有することを示されているが、これまでの MBP 研究では、加齢による骨量低下に対して予防的作用があることが示されているのみである。

本研究では、骨形成が優位な成長期マウスに対する MBP 摂取実験を実施し、骨形成優位状態においても MBP の骨形成促進作用が発揮されるかを検討している。その結果、MBP 摂取により脛骨皮質骨の骨密度および大腿骨海綿骨の骨体積/組織体積がコントロール群と比べ増加することを明らかにした。また、培養細胞を用いて MBP の骨リモデリング (骨形成と骨吸収) に対する作用を調べた結果、MBP は骨芽細胞の増殖を促進する一方、破骨細胞の分化を抑制することを示した。また、MBP 摂取により、IGF-1 および胃から分泌される内因性成長ホルモン分泌促進因子であるグレリンの血中濃度がコントロール群と比べ増加することも見出した。以上の結果から、MBP の摂取は、骨リモデリングに対する直接的な作用に加え、グレリン/GH/IGF-1 を介した間接的な骨形成作用により、成長期における骨量増加促進効果をもたらすことを示した。

第 2 章では、線維芽細胞や骨芽細胞などのコラーゲン産生を促進する MBP 中の関与成分を探索している。このコラーゲン産生促進活性と MBP 分画物中の TGF- $\beta$ 1 及び  $\beta$ 2 の濃度に相関性が認められたこと、また、MBP 分画物のコラーゲン産生促進作用は、TGF- $\beta$  受容体阻害剤によって阻害されたことから、MBP 中の TGF- $\beta$  がその受容体を介してコラーゲン産生促進に関与することを示した。

第 3 章では、食物アレルギー性腸炎モデルマウスに対する MBP の効果を検討し、炎症に起因する骨量減少に対して MBP の骨代謝調節作用が発揮されるか検討している。OVA による食物アレルギー性腸炎モデルを用いて、MBP は OVA 刺激により誘導される CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性化およびサイトカイン産生を抑制すること、同時に骨量減少を抑制することを明らかにした。以上より、MBP の摂取は、全身的な T 細胞活性化抑制作用により、炎症に起因する骨量減少に対して骨吸収抑制効果をもたらすことを示した。

以上の結果から、食品成分である MBP は、老年期に加えて成長期や炎症状態などにおいても、骨代謝改善作用を示すことを明らかにし、MBP は現代社会が抱える骨粗しょう症などの課題に対応できる機能性食品であることを明確にしている。よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。