

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	大井 勝博
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目			
<p>Tumour necrosis factor α augments the inhibitory effects of CTLA-4-Ig on osteoclast generation from human monocytes via induction of CD80 expression</p> <p>(Tumour necrosis factor α は CD80 発現誘導を介して、CTLA4-Ig の破骨細胞分化抑制効果を増強する)</p>			
論文審査担当者			
主 査	教授	安達 伸生	印
審査委員	教授	池上 浩司	
審査委員	准教授	亀井 直輔	
<p>[論文審査の結果の要旨]</p> <p>研究の背景:関節リウマチ(RA)は関節滑膜を主座とする慢性炎症性疾患であるが、進行性の関節破壊を引き起こし、日常生活動作や生活の質を著しく低下させる。この関節破壊には関節局所で増殖する破骨細胞が深く関与しており、破骨細胞の分化誘導作用を有する IL-6、TNF α を標的とした治療が広く行われている。アバタセプトは抗原提示細胞の CD80/CD86 分子と結合する cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) と IgG の Fc 部分を結合させた融合蛋白(CTLA-4-Ig)であるが、臨床研究において RA の関節破壊防止効果が広く報告されている。CTLA-4-Ig の作用機序は T 細胞の CD28 と抗原提示細胞の CD80/86 分子の結合を阻害することによる T 細胞の活性化抑制作用であるが、CTLA-4-Ig がどのような機序で関節破壊を抑制するのか、十分な説明はされていない。そこで今回、ヒト末梢血単球における破骨細胞分化誘導に対する CTLA-4-Ig の効果を検討した。</p> <p>方法と結果:健康者末梢血単核細胞を比重遠心法により分離後、MACS beads (pan monocyte isolation kit)により単球に分離して実験に用いた。まず、CTLA-4-Ig の末梢血単球に対する細胞毒性について検討した。末梢血単球の培養系に CTLA-4-Ig(0-500 μg/ml)を加えて 2 時間培養し、LDH-release 法で細胞障害の検討を行ったが、単球に対する CTLA4-Ig の細胞障害性は認めなかった。</p> <p>次に末梢血単球の破骨細胞分化誘導に対する CTLA-4-Ig の効果を検討するために、末梢血単球を細胞調整後、破骨細胞分化因子である RANKL と M-CSF、各種濃度の CTLA-4-Ig 存在下で 5-10 日間培養した。誘導された破骨細胞の同定は TRAP 染色と Osteo plate を用いた骨吸収活性により行った。CTLA-4-Ig は RANKL による破骨細胞の分化・誘導を濃度依存性に抑制した。この抑制効果は RA 患者から得られた関節液単球においても同様に認められた。また、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 と破骨細胞特異酵素である Cathepsin K の発現に対する CTLA-4-Ig の効果を遺伝子 (qPCR)、蛋白レベル(western blot 法)にて検討したところ、CTLA-4-Ig は両蛋白の発現を遺伝子レベルで抑制した。次に BrdU 細胞増殖キットを用いて破骨細胞分化過程における CTLA-4-Ig の細胞増殖に対する効果を検討すると、CTLA-4-Ig の濃度依存性に抑制効果が認められた。以上より、CTLA-4-Ig の破骨細胞分化抑制効果の一機序として細胞増殖抑制作用が明らかとなった。過去の研究で、CTLA-4-Ig がトリプトファン代謝酵素で、トリプトファンの枯渇化を介して、アポトーシスを誘導する indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO-1)を誘導することがマウスの検討で報告されている。そこで、CTLA-4-Ig による IDO-1 の発現誘導に関して検討したところ、軽度の遺伝子の発現が見られたものの、蛋白レベルでは明らかな差を認めなかった。</p> <p>RA 滑膜では破骨前駆細胞は多量の炎症性サイトカインに暴露されている。そこで、CTLA-4-Ig の破骨細胞分化抑制における TNF α の関与について検討した。まず、CTLA-4-Ig の結合分子である CD80/86 の発現に対する TNF α の効果を検討した。末梢血単球における CD80/CD86 の発現細胞をフローサイトメトリーで解析すると、CD86 は 90 %以上陽性であったが、CD80 は 10 %前後であった。一方、TNF α で 24 時間刺激すると CD80 陽性細胞は有意</p>			

に増加し、CD80 遺伝子発現も誘導された。また、RA 滑膜の単球を分離して検討すると、TNF α 刺激単球と同程度に CD80 陽性細胞の増加が認められた。

CD80 分子は CD86 分子と比較して、CTLA-4-Ig に対する binding affinity が 10 倍以上高いことが知られている。従って、TNF α 刺激により CTLA-4-Ig の破骨細胞抑制効果が増強される可能性がある。そこで、末梢血単球を 48 時間 TNF α で刺激した後、RANKL を加えて破骨細胞の分化を誘導したところ、より低濃度の CTLA-4-Ig で強い破骨細胞分化抑制効果が認められた。

考察:RA の関節破壊には、関節局所における破骨細胞が深く関与しており、破骨細胞の分化誘導を抑制する薬剤が日常診療で広く使用されている。一方、CTLA4-Ig の T 細胞活性化抑制作用はよく知られているが、ヒト由来の破骨細胞分化に対する作用はほとんど知られていない。本研究では 1) CTLA-4-Ig はヒト単球に作用して破骨細胞分化を抑制すること、そしてその機序として細胞増殖抑制作用が重要であること、2) ヒト単球において TNF α 刺激により CTLA-4-Ig の結合分子である CD80 が強く誘導され、CTLA-4-Ig の破骨細胞抑制効果が増強されることを明らかにした。TNF α は関節局所で強く発現していることが知られており、関節局所で CTLA-4-Ig はより効率的に抑制作用を発揮している可能性がある。CTLA-4-Ig の増殖抑制作用の機序は不明であるが、マウスの実験系では CTLA-4-Ig の破骨細胞分化抑制作用の機序として IDO-1 の関与が報告されている。本研究でも IDO-1 の遺伝子発現が CTLA4-Ig により増強したが、蛋白レベルでは明確な差を認めることができず、更なる検討が必要と考えられた。

本研究は、CTLA-4-Ig がヒト単球、関節リウマチ関節液単球に直接作用して、破骨細胞分化を抑制することを明らかにした。その機序に関しては不明な点が多いが、その解明により新たな RA 治療薬の開発の展開が期待されることから、本研究は臨床的に高く評価される。よって審査委員会委員全員は本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。