

論文内容要旨

TGF β 1 Regulates Human
RANKL-Induced Osteoclastogenesis
via Suppression of NFATc1 Expression
(TGF β 1 は NFATc1 発現の抑制を介して

RANKL によるヒト破骨細胞の
分化・誘導を制御する)

International Journal of Molecular Sciences,
21(3): 800, 2020.

主指導教員：杉山 英二教授
(医系科学研究科 リウマチ・膠原病学)

副指導教員：酒井 規雄教授
(医系科学研究科 神経薬理学)

副指導教員：木村 浩彰教授
(広島大学病院 リハビリテーション学)

徳永 忠浩

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

(研究の背景)

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は、関節滑膜を炎症の主座とする慢性炎症性疾患であり、関節局所において破骨細胞による骨吸収が亢進して、進行性の関節破壊を引き起こす。破骨細胞は骨吸収能を有する多核巨細胞であり、単球・マクロファージ系前駆細胞から誘導される。Transforming Growth Factor beta 1 (TGF β 1) は、細胞の分化・増殖・アポトーシスなどに関与する多機能サイトカインである。骨代謝において骨基質に貯蔵された TGF β 1 は、骨吸収に伴い大量に放出されて骨形成を促す“カップリング因子”として骨リモデリングへ関与する。しかし、ヒト破骨細胞の分化・誘導に対する TGF β 1 の直接的な作用について、詳細な解明はされていない。そこで、本研究では、ヒト末梢血単球における Receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) による破骨細胞分化に対する TGF β 1 の効果について検討した。

(方法と結果)

健常者末梢血単核細胞を分離後、MACS beads (pan monocyte isolation kit) により単球へ分離した。破骨細胞の分化に必須のサイトカインである Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) ・RANKL を添加し、TGF β 1 存在下で 5 - 12 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アッセイにより行った。

TGF β 1 は、RANKL による破骨細胞分化を、0.01 ng/ml という低濃度から濃度依存性に抑制した。この反応は、TGF β II 型受容体 (TGFBR2) に対する中和抗体を加えることで阻害された。培養系へ異なるタイミングで TGF β 1 を添加したところ、いずれのタイミングにおいても抑制効果は認められたが、より早期の段階で TGF β 1 を添加するほど、抑制効果は大きかった。また、Osteo plate を用いた骨吸収活性の検討では、TGF β 1 は、RANKL 誘導性の破骨細胞分化による骨吸収窩の形成を抑制した。

健常者の単球と同様に、RA 患者の末梢血単球を用いて検討すると、RA 患者の単球を用いても、抑制効果が認められた。健常者の単球と比較して、RA 患者の単球を用いた方が、多くの破骨細胞が誘導され、さらに、TGF β 1 による抑制効果は弱かった。

次に、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 及び破骨細胞特異酵素である Cathepsin K の発現に対する TGF β 1 の効果を RT-qPCR、western blotting にて検討した。いずれも、TGF β 1 により発現が抑制された。

次に、RANKL によるヒト破骨細胞分化における NFATc1 プロモーター活性へ及ぼす TGF β 1 の影響を検討した。JASPAR データベースを用いて、ヒト NFATc1 遺伝子の転写開始部位 (TSS) の-624/+105 領域に NF- κ B と NFATc1 の binding motif が存在することを確認し、この領域を含むレポータープラスミドを構築した。レポータープラスミド及び転写因子発現プラスミドを HEK293T 細胞へ導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。結果、NF- κ B (p65) の過剰発現により NFATc1 プロモーター活性は亢進した。そこに TGF β 1 を添加すると、NF- κ B (p65) 誘導性の NFATc1 プロモーター活性の亢進が抑制された。ヒト末梢血単球の免疫蛍光細胞染色を行うと、RANKL 刺激による NF- κ B (p65) の細胞質内から核内への移行は TGF β 1 により抑制された。これらの結果から、TGF β 1 の抑制効果の一因として、NF- κ B (p65) の核内移行を阻害

することで、NFATc1 の発現を抑制することが示唆された。

(考察)

破骨細胞の分化・誘導に対する TGFβ1 の直接的な作用については、既報において相反する結果が報告され、その詳細は不明である。本研究では、TGFβ1 はヒト単球へ直接的に作用して、RANKL によるヒト破骨細胞の分化・誘導、特に分化の早期段階を抑制することを明らかにした。そして、その機序として、TGFβ1 は RANKL-RANK シグナル伝達経路において、NF-κB (p65) の細胞質から核内への移行を阻害することで、破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 を抑制することを明らかにした。また、RA 患者由来の破骨細胞では TGFβ1 による分化抑制効果が (健常人と比較し) 得られにくいという結果から、RA の病態への TGFβ1 の関与が示唆された。TGFβ1 の破骨細胞分化抑制作用の詳細な分子メカニズムを明らかにすることにより、新たな RA 治療薬の開発が展開されることを期待する。