

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	徳永 忠浩
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 TGFβ1 Regulates Human RANKL-Induced Osteoclastogenesis via Suppression of NFATc1 Expression (TGFβ1 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	安達 伸生	印
審査委員	教授	横田 和典	
審査委員	准教授	金子 雅幸	
<p>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 (TGFβ1) 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 TGFβ1 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 TGFβ1 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)-κB ligand (RANKL) による破骨細胞分化に対する TGFβ1 の効果について検討した。</p> <p>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、TGFβ1 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。</p> <p>TGFβ1 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、TGFβII 型受容体 (TGFβRII) 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 TGFβ1 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 TGFβ1 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、TGFβ1 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。</p> <p>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、TGFβ1 による抑制効果は弱かった。また、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 TGFβ1 の効果を RT-qPCR、western blotting にて検討すると、いずれも TGFβ1 により発現が抑制された。</p> <p>次に、TGFβ1 による破骨細胞分化抑制作用の機序を明らかにするために、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 TGFβ1 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-κB 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-κB (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 TGFβ1 を添加すると、NF-κB (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-κB (p65) の細胞質内から核内への移行は TGFβ1 により抑制された。これらの結果から、TGFβ1 の抑制効果の一因として、NF-κB (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。</p> <p>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</p>			

る結果が報告され、その詳細は不明である。申請者は、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、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。

申請者は 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した。本研究の成果は、今後の新規 RA 治療薬の開発につながることから、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。