

論文内容の要旨

論文題目 破骨細胞分化におけるTGF- β の作用機構に関する研究

指導教員 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成18年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 安井 哲郎

骨の発生や恒常性維持は骨組織の形成と吸収のバランスを精緻に調節することで行われている。そして骨形成は骨芽細胞による膜性骨化や軟骨細胞による軟骨内骨化によって行われる一方、骨吸収を担う細胞は破骨細胞のみであることが知られている。破骨細胞は造血幹細胞に由来し、マクロファージや樹状細胞と同一の起源を有する多核巨細胞である。1998年に破骨細胞分化因子として receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)が同定され、骨芽細胞や滑膜細胞などが発現する RANKL によって破骨細胞の分化が制御されていることが明らかになった。そして RANKL/RANK シグナルを主軸とする破骨細胞分化の分子メカニズムが解明されるのに伴い、RANKL 以外のサイトカインによる分化促進や分化抑制についても徐々に知られるようになっていく。例えば、RANKL によって誘導される破骨細胞分化は interleukin-1 や transforming growth factor- β (TGF- β)

により促進され、Interferon- β や Interferon- γ により抑制される。その作用機構は未解明の部分が多いが Interferon については RANK 下流シグナル分子への修飾機構が一部報告されている。筆者は本研究において、強い破骨細胞分化促進作用を持つ TGF- β に着目しその作用メカニズムについて検討を行い、新たな知見を得たので報告する。

手法としては TGF- β I 型受容体のキナーゼ活性を阻害する薬剤 SB431542 を投与すること、あるいはドミナントネガティブ型 TGF- β II 型受容体(dn-T β RII)を強制発現することで TGF- β シグナル伝達を遮断し、これによってマウス破骨細胞前駆細胞内の RANKL 下流シグナル伝達あるいはそれにより誘導される破骨細胞分化にどのような変化が起こるか、あるいは起こらないかを評価することを中心に行った。破骨細胞前駆細胞としてはマウス骨髄細胞由来マクロファージを用いた。

まず、RANKL による破骨細胞分化は SB431542 投与によっても dn-T β RII 強制発現によっても強力に抑制された。また、in vivo においても、RANKL 頭部皮下注射によって誘導される破骨細胞形成は SB431542 の混注投与により強力に抑制された。これらの結果から、TGF- β シグナル活性は破骨細胞分化に必須であると考えられた。

TGF- β は細胞増殖を制御する作用がよく知られている。TGF- β の作用機構を

調べるにあたり、TGF- β がマウス骨髄由来マクロファージの細胞数の制御を通じて破骨細胞分化に影響を及ぼしている可能性をまず検討した。マウス骨髄細胞をM-CSF (10 ng/ml)存在下で培養し、生細胞数を評価した結果、TGF- β (2 ng/ml)の添加あるいはSB431542 (5 μ M)の添加による有意な影響は認められなかった。TGF- β の破骨細胞分化に対する作用は細胞の増殖の制御によるものではなく、分化に対する直接の作用と考えられた。そこで破骨細胞分化シグナルであるRANKL/RANKシグナルに対するTGF- β シグナルの関与という分子生物学的観点からの検討を以下の如く行った。

TGF- β 下流のシグナル伝達経路としてはSmad経路とnon-Smad経路が知られている。RANKLにより誘導される破骨細胞分化がSmad経路を抑制するSmad7やc-Skiの強制発現によって抑制されたこと、SB431542の破骨細胞分化抑制作用が活性型Smad2や活性型Smad3の強制発現により中和されたことから、TGF- β の破骨細胞分化に対する作用はnon-Smad経路ではなくSmad経路を介して伝えられると考えられた。

一方、RANKLの下流で機能しているシグナル伝達経路としては、ERK経路、p38MAPK経路、JNK経路、Akt経路、ITAM経路などが知られている。骨髄細胞由来マクロファージをRANKL (100 ng/ml)で刺激した後経時的にタンパクを回収しウェスタンブロット法による評価を行うことでRANKL刺激による各種

下流分子の活性化を確認したところ、p38MAPK、JNK、I κ B の活性化が TGF- β 受容体阻害下では抑制されることが判明した。続いて RANKL 刺激によるこれらの分子の活性化を媒介していると考えられる TRAF6-TAB-TAK 複合体の形成を評価した。免疫沈降実験を行った結果、RANKL 刺激を行うと TRAF6~TAB1 複合体が形成され、またその複合体形成は TGF- β 阻害下では抑制されることが判明した。すなわち、RANKL シグナルを伝達する TRAF6 複合体形成が起こるためには Smad シグナルの活性が重要な役割を果たしていると考えられた。

各種 Smad 分子のいずれかと TRAF6 複合体の構成分子のいずれかが結合して相互に作用している可能性を考え、遺伝子導入の行いやすい HEK293 細胞を用いてその検討を行った。各種 Smad 分子(Smad2, Smad3, Smad4, Smad6, Smad7)のいずれかと既知の TRAF6 複合体構成要素(RANK, TRAF6, TAB2, TAK1, TAB1)のいずれかを強制発現させ、免疫沈降およびウェスタンブロットで分子間の結合を評価した結果、TRAF6 と Smad2, TRAF6 と Smad3 の結合能が示唆された。さらに、欠損変異体を用いた実験の結果、この結合には Smad2, Smad3 の MH2 ドメインが関与していると考えられた。

不死化細胞 HEK293 で得たこの実験結果をもとに骨髓細胞由来マクロファージで検証を行ったところ、RANKL 刺激により Smad3 と TRAF6 の結合が誘導されることが観察された。MH2 ドメイン欠損型 Smad3 を強制発現させた骨髓

マクロファージを RANKL で刺激した場合には Smad3 変位体と TRAF6 の結合は観察されず、培養継続による破骨細胞形成も抑制された。

以上の実験結果および過去の知見を併せると次のような結論が考えられる。すなわち、RANKL 刺激により TRAF6-TAB2-TAK1-TAB1 複合体形成が誘導されるが、この複合体には Smad3 も構成要素として含まれる。TGF- β シグナル遮断下では Smad3 はここに結合できず、RANKL 刺激により誘導される TRAF6-TAB2-TAK1-TAB1 複合体の形成が抑制される。その結果下流シグナル経路である MAPK 経路, NF- κ B 経路の活性化や NFATc1 の発現誘導も抑制され、破骨細胞形成が抑制される。つまり、RANKL により誘導される破骨細胞分化においては、TGF- β の作用で活性化した Smad3 が TRAF6 に結合することが重要である。