



Title	炎症性サイトカインTNF α の骨芽細胞の分化、機能およびアポトーシスにおける役割とその分子作用メカニズムに関する研究
Author(s)	山下, 健二
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43985
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	山 下 健 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 7 4 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学 位 論 文 名	炎症性サイトカイン TNF α の骨芽細胞の分化、機能およびアポトーシスにおける役割とその分子作用メカニズムに関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 米 田 俊 之 (副査) 教 授 伊 集 院 直 邦 講 師 中 澤 光 博 講 師 中 村 隆 志

論 文 内 容 の 要 旨

<目的>

歯周疾患あるいはリウマチ性関節炎などの骨疾患においては、炎症性骨破壊の制御が臨床上の大きな課題である。炎症性骨破壊にはさまざまなサイトカインが関与しているが、中でも細胞の分化や機能、アポトーシスの制御に深く関与している炎症性サイトカイン TNF α は、強力に破骨細胞を活性化し、骨吸収を促進する作用を有していることが明らかにされている。しかしながら、骨のリモデリングにおいて破骨細胞と連動して重要な役割を演じる骨芽細胞に対する TNF α の作用に関しては未だ不明な点が多く残されている。本研究においては、TNF α の骨芽細胞の分化、機能、アポトーシスに対する作用を検討し、さらにそれらの作用発現に関与する細胞内シグナル経路を同定することにより、TNF α の作用分子メカニズムの解明を試みた。

<実験方法>

1. 骨芽細胞の分化および石灰化能の検討

実験には骨芽細胞への分化能を有する未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞ならびに 3 日齢マウス頭蓋骨より採取した初代培養成熟骨芽細胞 (1°OB) を用いた。骨芽細胞への分化はアルカリフォスターゼ (ALP) 活性、骨芽細胞の石灰化能はアリザリンレッド染色により評価した。

2. 転写因子 Cbfa1 の転写活性の検討

Cbfa1 発現遺伝子と、Cbfa1 の標的遺伝子オステオカルシンのプロモーター領域を融合させたルシフェラーゼレポーターコンストラクトを C3H10T1/2 細胞に共発現させ、トランスフェクション 2 日後に、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性を測定することにより Cbfa1 の転写活性を評価した。

3. アデノウイルス発現系による Cbfa1、NF- κ B、MEKK1、JNK1 の過剰発現

アデノウイルスベクターに Cbfa1、NF- κ B、MEKK1、JNK1 の cDNA を組み込んだ後、アデノウイルスパッケージング細胞 293 に感染させ、293 細胞内で相同組み換えにより得られたアデノウイルスを回収した。アデノウイルス陽性クローンは、それぞれ抗 Cbfa1 抗体、抗 NF- κ B 抗体、抗 MEKK1 抗体、抗 JNK1 抗体を用いたウェスタンブロット法により選別した。アデノウイルスの C3H10T1/2 細胞、1°OB への感染は、300 M.O.I. にて行った。

4. 骨芽細胞のアポトーシスの検討

アポトーシスは、DAPI 染色による核の断片化、免疫染色による活性型カスパーゼ 3 の発現を指標に評価した。

<結果>

1. 骨芽細胞分化および石灰化能に対する TNF α の作用

1) 骨芽細胞分化および石灰化能に対する TNF α の効果

C3H10T1/2 細胞に、骨形成促進タンパク (Bone Morphogenetic Protein-2, BMP2) を添加するとアルカリフォスターゼ (ALP) 活性が誘導された。また、成熟骨芽細胞である 1°OB に、BMP2 を添加した場合には石灰化が誘導された。TNF α は BMP2 による C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞への分化ならびに 1°OB の石灰化誘導を抑制した。

2) TNF α の骨芽細胞分化抑制における NF- κ B シグナルの関与

アデノウイルスを用いて、C3H10T1/2 細胞に NF- κ B を過剰発現させると、Cbfa1 により誘導される ALP 活性ならびに Cbfa1 の転写活性が著しく抑制された。この NF- κ B の効果は TNF α 添加によりさらに増強された。また免疫共沈降法により、NF- κ B は Cbfa1 と物理的に結合することが示された。ドミナントネガティブ JNK を用いて JNK シグナルの関与を検討したが、Cbfa1 による骨芽細胞分化誘導には影響を与えなかった。

2. 骨芽細胞のアポトーシスに対する TNF α の作用

1°OB に TNF α を作用させると、アポトーシスが誘導された。また、JNK シグナルを活性化する MEKK1 と JNK1 を過剰発現させると、1°OB のアポトーシスが誘導され、その効果は、TNF α の存在により増強された。さらに、NF- κ B のシグナルを遮断する I- κ B α 変異体を 1°OB に過剰発現させると、アポトーシスが誘導され、その効果は、TNF α 添加によりさらに増強された。したがって NF- κ B は骨芽細胞のアポトーシスを抑制することが示唆された。しかしながら、その効果は、JNK シグナルによるアポトーシス誘導効果より弱いことが判明した。

<結論・考察>

本研究結果より、TNF α は、骨芽細胞の分化および機能を抑制し、アポトーシスを誘導することが示された。このような骨芽細胞の分化抑制は TNF α 刺激により活性化された NF- κ B が Cbfa1 に物理的に結合し、Cbfa1 の転写機能を抑制することに起因することが示唆された。さらに、骨芽細胞のアポトーシスの誘導は JNK シグナルの活性化を介していること、一方、NF- κ B シグナルは、アポトーシスに対しては抑制的に作用することが示唆された。

以上の結果より、TNF α は JNK あるいは NF- κ B シグナルを通じて骨芽細胞の分化、機能、ならびに生存を負に制御することにより骨形成を抑制し、一方において破骨細胞の活性化により骨吸収を促進することにより、炎症性骨破壊を増悪させることが示唆された。これらの知見は炎症性骨破壊を伴う骨疾患の分子メカニズムの理解を深め、さらに治療法開発のための有用な指針となると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は炎症時における骨破壊のメカニズムの解明を目的として、炎症性サイトカイン TNF α の骨芽細胞に対する影響を調べたものである。

本研究により、TNF α は骨芽細胞の分化および機能を抑制し、アポトーシスを誘導することにより骨芽細胞に対して抑制的に作用することが明らかとなった。本研究の結果は、炎症時における骨破壊の分子メカニズムを理解する上で有用な科学的情報を提供するものであり、博士 (歯学) を授与するに値すると認める。