The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The immunosuppressant FK506 promotes development of the chondrogenic phenotype in human synovial stromal cells via modulation of the Smad signaling pathway
Author(s)	立石, 耕介
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47516
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【80】

氏　　名	立　石　耕　介（たて いし こう すけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０９７８　号
学位授与年月日	平成 19 年３月 23 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学　位　論　文　名	The immunosuppressant FK506 promotes development of the chondrogenic phenotype in human synovial stromal cellls via modulation of the Smad signaling pathway. （免疫抑制剤 FK506 はヒト滑膜間質細胞の軟骨分化を Smad signaling Pathway を介して促進する。）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　吉川　秀樹 （副査） 教　授　大薗　恵一　　教　授　仲野　　徹

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

近年、滑膜組織に骨髄と同様に多分化能を持つ間葉系間質細胞が含まれることが明らかとなってきた。滑膜間質細胞は採取が比較的簡易であり、しかも増殖速度が速く、また継代によっても分化能が消失しにくい等の特徴があり、軟骨修復に適した細胞種と考えられる。一方これら間質細胞の軟骨細胞への分化誘導にはこれまで多くの場合 TGF-βや BMP などの生物製剤に依存してきた。しかし臨床への応用を配慮した場合、これら生物製剤の生体への安全性に関しては不明な点も多く使用するとしても低濃度での使用が推奨される。FK506（tacrolimus）は既に臨床使用されている免疫抑制剤であるが、近年、同薬剤が軟骨前駆細胞 ATDC5 の軟骨分化を促進することが報告された。本研究では、同薬剤の滑膜間質細胞の軟骨分化促進効果及び作用機序について検討を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

手術時に採取した滑膜組織より細胞を単離し、FK506 添加軟骨分化誘導培地でペレット培養し、さらに BMP2 または TGFβとの相乗効果について検討した。評価は培養開始後３週にペレットの大きさ、alcian blue 染色、dimethylmethlene blue（DMMB）法および RT-PCR で行った。培養開始後３週において FK506 添加群ではペレットは大きくなり、alcian blue に対する濃染性を認め、DMMB 法にてもプロテオグリカンの産生が増加を認めた。RT-PCR では FK506 添加群では軟骨分化マーカー遺伝子の発現上昇が認められた。これらは BMP2 または TGFβの添加によりさらに促進された。次に単層培養にて FK506 による軟骨分化シグナルの下流を解析するために FK506 添加後の軟骨分化誘導培地における phospho-Smad1/5/8 および phosopho-Smad3 の発現を経時的に western blot にて解析した。phospho-Smads は軟骨分化誘導培地群で発現をみとめ FK506 添加群では非添加群に比し 30 分後、１時間後及び 2 時間後で有意に発現レベルの上昇を認めた。さらに、Smad signaling pathway を阻害することにより FK506 による滑膜細胞の軟骨分化促進効果が影響を受けるかを BMP2 の antagonist である Noggin、TGFβRI の選択的 inhibitor である SB431542 の存在下でペレット培養を行い検証した。Noggin、SB431542 の存在下では FK506 による軟骨分化の促進は認めず、Smad1/5/8、Smad3 のリン酸化も有意に阻害されていた。

〔 総　　括 〕

本研究において、FK506 は滑膜細胞の軟骨分化を促進し BMP2、TGFb の添加により相加的に促進を認めた。さらに、FK506 による軟骨分化は TGFβの signal を仲介する Smad3 および、BMP2 の signal を仲介する Smad1/5/8 のリン酸化を介していることが明らかとなった。FK506 は FK506 binding protein（FKBP）と結合後、Ca^{2+} /calmodurin 依存性 serine/threonine phosphatase である calcineurin（protein phosphatase 2B）を抑制することにより転写因子 NFAT（Nuclear Factor of Activate T cell）の活性を阻害し免疫抑制作用を呈する。FKBP の一つである FKBP12 が TGFβ receptorⅡによる TGFβ receptor I のリン酸化を阻害するとの報告がある。また、FKBP12 を 293 cell に強制発現すると Smad1/5/8 のリン酸化が抑制され、その際に FKBP12 は BMPRI と結合するとの報告もある。本研究においても FK506-FKBP 複合体によりその活性が調節されている可能性があり、その解析が必要であろう。さらに、他の軟骨分化に関わる signal についても解析を行ったが、MEK、MAPK、PI3K については FK506 による軟骨分化には関わっておらず、他の signal についての検討も必要と考えられる。

最後に、FK506 の長期投与にともなって発ガンの報告があること、本研究で使用した FK506 濃度が臨床で使用されている濃度よりも高いことなどから、使用の際は注意が必要であるものの、FK506 の使用に伴い BMP2 や TGFβの使用量を減らせる可能性があること、すでに臨床での使用が認められているため ex vivo での軟骨再生に早期での応用が可能であることから、さらに最適化を進めることで有力な軟骨分化促進剤となることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

広範な軟骨損傷は自然修復が期待されないため、細胞治療などの新たな治療法が必要である。間葉系幹細胞はその細胞源として期待されている。関節滑膜の間質細胞はその増殖能および軟骨分化能において他の組織由来のものより優れているため有用であると考えられている。本研究はすでに臨床使用され、使用法、安全性について実績のある免疫抑制剤 FK506 を用いてヒト滑膜間質細胞を軟骨分化させることに成功するとともに、その作用が TGFβ・BMP2 と相加的に増強すること、軟骨分化における作用機序が Smad signal を介することを明らかにした。再生医療領域において細胞を安全かつ確実に標的組織に分化させることは最も重要であり、既存の薬剤を用いてそれを可能にしたことは、軟骨再生治療における大きな進歩を促す。また同様のアプローチによる創薬の可能性も考えられ、軟骨再生の新たな方法論を提示したという点で、本研究は学位に値すると考える。