




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第 号	氏 名	宮崎 正志
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	大 橋 京 一	
	副査氏名	小 野 克 重	
	副査氏名	藤 邊 誠	
<p>論文題目 Tacrolimus and cyclosporine A inhibit human osteoclast formation via targeting the calcineurin-dependent NFAT pathway and an activation pathway for c-Jun or MITF in rheumatoid arthritis. (タクロリムスとシクロスポリンAは関節リウマチにおいてカルシニューリン依存性のNFAT経路とc-JunやMITFを介した活性化経路に作用してヒト破骨細胞の形成を抑制する)</p> <p>論文掲載誌 Clinical Rheumatology 26: 231-239, 2007</p> <p>論文審査要旨 関節リウマチの発症には T 細胞などの免疫担当細胞の異常によって過剰に産生される炎症性サイトカインが関与するとされる。カルシニューリン阻害薬である tacrolimus や cyclosporine A は近年、臨床において関節リウマチへの効果が認められており、その機序として NFAT の核内移行を阻害することで炎症性サイトカインの転写を制御するといわれているが、その詳細については十分に解明されていない。申請者は tacrolimus や cyclosporine A が関節リウマチ患者破骨細胞の形成・分化の機序について検討を行った。 申請者は関節リウマチ患者から同意取得後に、末梢血より単核球を分離し、破骨細胞に分化誘導するため M-CSF と RANML 存在下で glass coverslip 及び象牙切片上で培養を行った。この系の単核球をコントロール群と tacrolimus, cyclosporine A 投与群に分け、破骨細胞の形成と活性化について比較検討を行った。破骨細胞の形成は酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色による多核巨細胞数で、活性化については象牙切片上の吸収窩の面積で評価した。また、tacrolimus 及び cyclosporine A の作用機序を検討するため転写因子 (TRAF6, NFATc1, c-Fos, c-Jun, MITF, PU.1) の mRNA 発現をリアルタイム PCR で調べた。 Tacrolimus 並びに cyclosporine A 投与により用量依存的に破骨細胞形成、活性化が抑制された。また、この抑制効果は培養後 7~14 日、7~21 日における tacrolimus 並びに cyclosporine A の投与群にのみ認められた。転写因子のうち NFATc1, c-Jun, MITF の mRNA 発現は培養 10 日後を最大に抑制された。 本研究はヒト破骨細胞形成に対する tacrolimus, cyclosporine A の効果を検討したものである。現在末梢血マクロファージの骨への接着、その後の細胞融合により多核のヒト破骨細胞が形成される機序に働く分子が明らかになりつつある。それら分子に特異的に関与するシグナル伝達系と、破骨細胞形成とは無関係のシグナル伝達系との区別が本研究では未検討であるが、多数の患者の存在する関節リウマチの根本原因解明から治療を目指そうとする姿勢を評価し、審査委員の合議により学位論文に値するものと判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 宮崎正志

論 文 題 目

Tacrolimus and cyclosporine A inhibit human osteoclast formation via targeting the calcineurin-dependent NFAT pathway and an activation pathway for c-Jun or MITF in rheumatoid arthritis

(タクロリムスとシクロスポリン A は関節リウマチにおいてカルシニューリン依存性の NFAT 経路と c-Jun や MITF を介した活性化経路に作用してヒト破骨細胞の形成を抑制する)

要 旨

(緒言) 関節リウマチの発症には T 細胞などの免疫担当細胞の異常によって過剰に産生される炎症性サイトカインが関与するとされる。tacrolimus 及び cyclosporine A は NFAT の核内移行を阻害することで炎症性サイトカインの転写を制御し関節炎を改善する。近年、NFATc1 が破骨細胞分化、成熟のマスター転写因子との報告もあり破骨細胞への直接作用も示唆されている。今回、tacrolimus 及び cyclosporine A のヒト破骨細胞前駆細胞への直接作用及び、その作用機序を解明するために in vitro における tacrolimus 及び cyclosporine A の破骨細胞形成に対する影響を検討した。

(方法) リウマチ患者の末梢血から単核球を分離し M-CSF と RANKL の存在下に破骨細胞を分化誘導し glass coverslip 及び象牙切片上で培養した。この系においてコントロール群と tacrolimus、cyclosporine A を投与した群の破骨細胞の形成と活性化について比較検討した。破骨細胞の形成は酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色での多核巨細胞数を活性化については象牙切片上の吸収窩の面積で評価した。tacrolimus、cyclosporine A の細胞毒性を評価するため Cell viability assay

を行った。また、薬剤の作用段階を解明するために time course による実験も行った。その作用機序を解明するために破骨細胞の分化、活性化におけるシグナル伝達においてリアルタイム PCR を用いて tacrolimus 及び cyclosporine A 投与時の転写因子 (TRAF6、NFATc1、c-Fos、c-Jun、MITF、PU.1) の mRNA の発現を評価した。

(結果) tacrolimus、及び cyclosporine A を投与した群では破骨細胞形成、活性化が容量依存性に抑制された。Cell viability assay においても tacrolimus、cyclosporine A の細胞毒性は認めなかった。time course による実験を行ったところ、7-14 or 7-21 day に投与した群のみ抑制された。転写因子の mRNA の発現をリアルタイム PCR で測定したところ 10 day を peak に NFATc1、c-Jun、MITF の mRNA の発現が抑制された。

(考察) 破骨細胞前駆細胞において RANKL は RANK と結合し TRAF6 を介してシグナルを細胞内に伝える。その結果、p38/MITF、JNK/c-Jun などの MAPK 経路、それとは別に転写因子複合体 AP-1 を構成する c-Fos を活性化させる。また、NFATc1 は破骨細胞分化、成熟のマスター転写因子とされる。今回、我々は tacrolimus 及び cyclosporine A 投与時の転写因子の mRNA の発現をリアルタイム PCR で測定したところ、NFATc1、c-Jun、MITF の mRNA の発現が late stage で抑制された。tacrolimus 及び cyclosporine A は NFATc1 の核内移行を阻害することで NFATc1 の自己増幅転写を抑制して活性化破骨細胞の形成を抑制すると考えられた。我々の結果では NFATc1 以外にも c-Jun と MITF の mRNA の発現が抑制されており c-Jun や MITF を介した他のシグナル伝達の関与が考えられた。これは破骨細胞前駆細胞では報告がないが T 細胞や歯肉線維芽細胞では同様の報告がある。その機序は明らかではないが、その一因として細胞内のカルシウムシグナルが関与していることが考えられた。

(結語) cyclosporine A 及び tacrolimus はヒト破骨細胞前駆細胞に直接作用し破骨細胞形成を抑制し作用段階は分化の late stage と思われる。その作用機序はカルシニユリン活性を阻害することで NFATc1 の自己増幅転写を抑制することのみならず、c-Jun や MITF を介した他のシグナル伝達の関与が示唆された。