

論 文 内 容 要 旨

題 目

Double Stranded RNA-Dependent Protein Kinase is Necessary for TNF- α -Induced Osteoclast Formation In Vitro and In Vivo

(二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼは in vitro と in vivo において TNF- α による破骨細胞形成に必要である)

著 者 篠原 宏貴

内容要旨

【緒言】二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (PKR) は、細胞周期、細胞増殖、細胞分化、腫瘍発生、アポトーシスに関与する蛋白質リン酸化酵素である。本研究室では、過去に PKR が骨芽細胞、軟骨細胞および破骨細胞の分化に必要であることを報告した。しかしながら、病的状態、特に TNF- α による破骨細胞形成における PKR の役割については不明である。そこで、本研究で私は炎症局所の破骨細胞分化・活性化における PKR の役割を in vitro 及び in vivo で調べた。

【材料と方法】実験にはマウス骨髄由来非接着性細胞を M-CSF で 3 日間刺激した破骨前駆細胞とマウス破骨前駆細胞株 RAW264.7 細胞を使用した。TNF- α 誘導破骨細胞形成は、上記破骨前駆細胞を RANKL で 24 時間処理後、TNF- α を 3 日間刺激する系を用いた。PKR の破骨細胞形成における役割を調べるため、RANKL 処理後に PKR 阻害剤である 2AP 処理または PKR 特異的 siRNA を導入した細胞を TNF- α で刺激した。破骨細胞形成の評価は TRAP 染色を用いた。RT-PCR 法にて破骨細胞分化関連遺伝子発現を調べた。骨吸収活性の解析を骨吸収アッセイで行った。細胞内情報伝達系の解析をウエスタンブロットティング法および免疫蛍光染色法を用いて行った。さらに NF- κ B の転写活性を Luciferase assay で調べた。NFATc1 の局在を免疫蛍光抗体染色法を用いて解析し、細胞内 Ca²⁺オシレーションをカルシウム蛍光プローブを細胞内に導入し調べた。最後に、マウスの頭蓋縫合部に PBS のみ、TNF- α のみ、TNF- α +PKR 阻害剤 C16 を 7 日間局所投与し、マイクロ CT を用いて骨密度を解析後、切片標本を作製し HE 染色、TRAP 染色により破骨細胞形成を解析した。

【結果】TNF- α で刺激した破骨細胞では RANKL 単独刺激の細胞と比較して、PKR の発現が強力に誘導された。TNF- α による破骨細胞形成は 2AP の濃度に依存して抑制された。2AP による細胞障害活性は本実験で用いた濃度では認められなかった。破骨細胞分化関連遺伝子発現も 2AP により抑制された。PKR 特異的 siRNA を導入した細胞においても対照群に比べ破骨細胞形成が抑制された。2AP 添加により TNF- α で誘導される吸収窩の数、面積は共に抑制された。2AP 処理及び PKR siRNA 導入細胞では TNF- α による NF- κ B、p38MAPK および ERK 経路の活性が抑制されていた。2AP は TNF- α による NF- κ B の核移行と転写活性を抑制した。TNF- α で誘導される NFATc1 と c-fos の発現は 2AP の濃度に依存して抑制された。TNF- α 刺激による NFATc1 の核移行は 2AP により抑制され、2AP が Ca²⁺オシレーションを抑制したことから PKR が Ca²⁺オシレーションを介して NFATc1 の核移行を制御している可能性が示唆された。In vivo において PKR 阻害剤は、TNF- α によって減少した骨密度を増加させ、破骨細胞形成と骨吸収活性を抑制した。

【結論】以上の結果より、PKR は破骨細胞分化と機能を制御する重要な機能調節因子であり、歯周病、関節リウマチなど病的骨吸収を伴う疾患において、PKR が新規治療標的となりうる可能性が示唆された。