

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 口 甲口保 乙 口 乙口保 口 修	第 3 9 6 号	氏 名	篠原 宏貴
審査委員	主 査 岩本 勉 副 査 吉村 弘 副 査 田中 栄二			

題 目 **Double Stranded RNA-Dependent Protein Kinase is Necessary for TNF- $\alpha$ -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- $\alpha$ による破骨細胞形成に必要である)

要 旨

二本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ (PKR) は、細胞周期、細胞の増殖や分化、腫瘍発生などに関与する蛋白質リン酸化酵素である。本研究は、TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成における PKR の役割について in vitro 及び in vivo で調べた研究である。実験にはマウス骨髄由来の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- $\alpha$  誘導破骨細胞形成は、これら破骨前駆細胞を RANKL で処理後に TNF- $\alpha$  で 3 日間刺激する系を用いた。破骨細胞形成の評価は TRAP 染色で行い、RT-PCR 法にて破骨細胞分化関連遺伝子発現を調べた。また、骨吸収活性の解析を骨吸収アッセイで行い、細胞内情報伝達系の解析をウエスタンブロット法および免疫蛍光染色法で行った。さらに NF- $\kappa$ B の転写活性を Luciferase assay で、NFATc1 の局在を免疫蛍光抗体染色法で解析し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>オシレーション分析も行った。一方、マウスの頭蓋縫合部に PBS のみ、TNF- $\alpha$  のみ、TNF- $\alpha$ +PKR 阻害剤 C16 を局所投与し、マイクロ CT を用いて骨密度を解析し、組織標本を作製し破骨細胞形成の動態を解析した。その結果、TNF- $\alpha$  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。また、TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成は PKR 阻害剤 2AP の濃度に依存して抑制され、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破骨細胞形成が抑制された。2AP 添加により TNF- $\alpha$  で誘導される吸収窩の数と面積はともに抑制された。2AP 処理および PKR siRNA 導入細胞では TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B、p38MAPK および ERK 経路の活性が抑制された。2AP は TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の核移行と転写活性を抑制し、TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  刺激による NFATc1 の核移行は 2AP により抑制され、2AP が Ca<sup>2+</sup>オシレーションを抑制したことから PKR が Ca<sup>2+</sup>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 における PKR 阻害剤の投与は、TNF- $\alpha$  誘導による破骨細胞形成と骨吸収活性を抑制した。

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ることから、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、本論文の内容は歯科医学の発展に寄与するところが大きいと考えられた。よって、博士(歯学)の学位授与に値すると判定した。