

学位審査結果報告書

学位申請者氏名 梶田倫功
学位論文題目 Mechanisms Involved in Enhancement of Osteoclast Formation by Activin-A

審査委員（主査） 竹内 弘



（副査） 松尾 拓



（副査） 古株 彰一郎



学位審査結果の要旨

TGF- β ファミリーに属するサイトカイン activin-A は、赤芽球分化誘導因子あるいは下垂体の FSH 分泌を促進するタンパク質として発見され、主に SMAD シグナル伝達経路を介して細胞の分化や機能を制御することが知られている。Activin-A は骨基質中にも豊富に存在し、骨芽細胞や破骨細胞に作用して骨代謝の制御に関与するが、その詳細な分子メカニズムは解明されていない。これまで申請者の梶田倫功氏が研究をおこなった感染分子制御学分野では、activin-A がマウス骨髄細胞を用いた培養系で破骨細胞の分化に抑制的に作用することを報告してきた。梶田氏はそのメカニズムの解明を目指し、本研究においてマウス骨髄細胞に加えて細胞株を用いた *in vitro* 培養系によって破骨細胞形成に対する activin-A の作用を検討した。

Activin-A は、マウス骨髄細胞の macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) および receptor activator for nuclear factor- κ B ligand (RANKL) による破骨細胞への分化と、マウスマクロファージ由来の破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞の RANKL による破骨細胞分化をいずれも促進した。また、activin-A は、マウス骨髄細胞から分化した破骨細胞のアクチンリング形成および骨吸収活性も増強した。さらに、activin-A は、RANKL 刺激によって誘導される破骨細胞形成のマスター転写因子 NFATc1 の発現、およびその下流の破骨細胞形成関連遺伝子である TRAP、OC-STAMP、cathepsin K の発現を亢進させた。NFATc1 の発現亢進に対する activin-A の作用は、Activin-A 受容体のアンタゴニストとして作用する分泌タンパク質 follistatin や、受容体を構成するキナーゼ ALK4/5/7 の阻害剤 A83-01 によって抑制されたことから、activin-A は特異的な受容体に結合し、下流の SMAD シグナル伝達経路を介して破骨細胞形成を促進していることが示唆された。また、activin-A は、RANKL 刺激によって活性化される NF- κ B および MAPK シグナル経路には影響を及ぼすことなく、c-fos の発現を増加させた。そこで SMAD シグナルと NFATc1 の発現上昇との関連を調べるため RAW264.7 細胞を SMAD2/3 特異的阻害剤 SIS3 で前処理したところ、activin-A 依存的な NFATc1 の発現は減弱した。また、抗リン酸化 c-fos 抗体を用いた共免疫沈降実験において、activin-A 刺激によって破骨細胞前駆細胞内のリン酸化 c-fos とリン酸化 SMAD2 タンパク質の相互作用の亢進を認めた。以上の結果は、activin-A が NF- κ B および MAPK シグナル経路非依存的に、活性化 c-fos と SMAD2/3 の相互作用を増強して、NFATc1 の発現を上昇させ、RANKL 誘導による破骨細胞形成を増強することを示唆している。

本研究内容について申請者の梶田氏に対し、公開審査会において主査と2名の副査による試問を行い、本研究の新規性、実験方法や結果の解釈および当該分野における意義、今後の展望と課題について概ね適切な回答を得た。Activin-A の破骨細胞への直接作用とその機序の一端を解明した本研究の成果は、骨代謝の詳細な調節機構の全容を理解し、骨関連疾患の発症機序の解明を通じて新たな治療法開発に寄与することが期待できることから、審査委員会では本論文を学位論文として価値あるものと判断した。