

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	山 中 康 裕
学 位 論 文 題 目			
<p>Map Kinase c-JUN N-Terminal Kinase Mediates PMMA Induction of Osteoclasts. (Map Kinase c-JUN N-Terminal Kinase(JNK)はPMMAによる破骨細胞分化に関与する)</p>			
共 著 者 名			
<p>Abu-Amer Y, Faccio R, Clohisy J.</p>			
<p>Journal of Orthopaedic Research July 2006 p1349-1357</p>			
研 究 目 的			
<p>高齢化社会が進み、股関節及び膝関節の人工関節置換手術数が増加している。それに伴い人工関節周囲骨融解による人工関節再置換手術数の増加が、患者のADL及びコスト上で問題となっている。人工関節周囲骨融解の主な原因として、人工関節の摺動面より生じる微小な摩耗粉のために人工関節周囲の骨吸収が進むことが挙げられる。この反応は炎症と骨溶解の過程によると考えられる。PMMA, PE, Metalなどの人工関節摩耗粉へリンパ球、マクロファージ、破骨前駆細胞などが遊走し、さまざまなサイトカインの分泌を促し人工関節と骨の間に慢性的な炎症を引き起こす。もう一つの過程である骨融解は、それらのサイトカインによってマクロファージから破骨細胞への分化が促進し、その骨吸収によるものである。現在広く述べられているように、破骨細胞分化にはRANKL及びTNF, IL-1, IL-6などの炎症性サイトカインが重要な役割を果たす。特にRANKLはマクロファージ細胞表面の受容体RANKに結合し、細胞内シグナル伝達を経て転写因子NF-κBやc-jun/AP-1を活性化させ、破骨細胞分化に関与する。本研究で人工関節磨耗粉であるPMMAはマウスのマクロファージ細胞内のJNK及びその下流の転写因子c-jun/AP-1をすばやく活性化させ、破骨細胞分化を促進することを示した。これらの反応はJNK阻害剤SP600125で抑制された。以上よりJNKが人工関節周囲骨融解に重要な役割を果たしていることが示唆された。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<ol style="list-style-type: none"> 1) 人工関節磨耗粉: Polymethylmethacrylate Particles (PMMA) 平均 6.0μm 95% < 10μm を使用した。洗浄しエンドキシンが付着していない事を LAL Assay にて確認した。 2) 動物: 生後 3-4 週 の C57Bl/6 及び TLR-null マウスを使用した。 3) 細胞: マウス大腿骨、脛骨から採取した骨髄を10%ウシ胎児血清を含む培養液で M-CSF(10ng/ml)存在下に培養しマクロファージを得た。 4) Osteoclast Assay: マクロファージを M-CSF と RANKL(20ng/ml)存在下に4日間培養し破骨細胞に分化させた。細胞を固定後に TRAP 染色を施行し核が 3 個以上の細胞を破骨細胞とした。JNK 阻害剤、PMMA を実験内容に応じて加えた。 5) JNK Kinase Assay: サンプルへ媒体である c-jun を加え 12 時間インキュベートし 100μM の ATP 存在下に c-jun のリン酸化を調べた。 6) Immunoblotting 法: サンプルは SDS PAGE によって分離しニトロセルロース膜にブロットした。膜を各1次抗体と HRP で標識された2次抗体で処理しECLでバンドを検出して各蛋白の発現を検討した。 7) EMSA 法: サンプルの核成分(10μg)を c-jun/AP-1 プローブ存在下で30分間インキュベートし、ゲルシフトアッセイにてバンドを検出し転写因子 c-jun/AP-1 の発現を検討した。 			

成 績

1) PMMAによるマクロファージ細胞内JNKの活性化

C57Bl/6マウス骨髄から抽出したマクロファージをPMMAで刺激した。c-junを媒体としてJNKの酵素活性を調べた。PMMAが0.5mg/ml以上の濃度、30分間の刺激でJNKの酵素活性が見られた。次にマクロファージ細胞内のJNK及びその下流のc-junのリン酸化を調べた。細胞内のJNK、c-junの蛋白量は各条件でほぼ一定だが、PMMA刺激によりJNK及びc-junはリン酸化された。JNK阻害剤、SP600125でJNKの酵素活性とJNK、c-junのリン酸化が濃度依存性に抑制された。

2) PMMAによるマクロファージ核内の転写因子 c-jun/AP-1 の発現

マクロファージから核成分を抽出し、c-jun/AP-1 DNA-Binding Activityを調べた。PMMA刺激でc-jun/AP-1の発現が認められ、JNK阻害剤により濃度依存性に抑制された。

3) PMMAによるマクロファージ細胞内JNKの活性化とエンドキシンの関連

人工関節摩耗粉にはしばしばエンドキシンが付着し、それが人工関節周囲骨融解の原因とする説がある。LPS(エンドキシン)に反応しないTLR4-null マウスの骨髄から分離したマクロファージをPMMAで刺激すると、JNKはリン酸化された。PMMAによるJNKの活性化はエンドキシンと関連しないと考えられた。

4) PMMAによる破骨細胞分化と阻害剤による抑制

PMMAにより少量(20ng/ml)のRANKL存在下で破骨細胞分化が促進した(4.8倍 $p < 0.001$)。これはJNK阻害剤により濃度依存性に抑制された。次にJNK阻害剤による細胞毒性の影響を調べた。JNK阻害剤投与後24時間の培地を、JNK阻害剤を含まない培地に変えて48時間後に破骨細胞分化能が回復した。以上よりJNK阻害剤の細胞毒性が否定された。

考 案

骨吸収に関連して、炎症や破骨細胞分化に寄与するサイトカインについての報告は散見されるが、人工関節摩耗粉によって生じる人工関節周囲骨融解についての詳細なメカニズムはまだ明らかになっていない。しかし、人工関節周囲骨融解が炎症に関連する事は広く認められており、そのシグナル伝達の解明は人工関節周囲骨融解の治療に重要である。我々は人工関節摩耗粉(PMMA)の刺激により、マウスのマクロファージのJNK及びc-junがリン酸化され、転写因子c-jun/AP-1が発現することを示した。さらに、人工関節摩耗粉によるこれらのシグナル伝達はJNK阻害剤によって濃度依存性に抑制された。Osteoclast Assayで人工関節摩耗粉のみではマクロファージの破骨細胞分化を誘導できないが、少量のRANKL存在下で破骨細胞分化を有意に促進した。またこの破骨細胞分化はJNK阻害剤により濃度依存性に抑制され、その細胞毒性の影響も否定された。最近の報告では、JNK阻害剤によりc-junのリン酸化が抑制され、炎症に関連するCOX-2, IL-2, INF- γ , TNFの遺伝子発現が抑制されたというものがあり、これは我々の結果と矛盾しない。また、c-jun/AP-1が破骨細胞分化のKey mediatorであると言われるNFAT2と協調して働くという報告もあり、今後NFAT2とJNK,c-jun/AP-1の相互作用を含め、破骨細胞分化、人工関節周囲骨融解のシグナル伝達の解明が進むと考えられる。本研究によりJNKがPMMA摩耗粉による破骨細胞分化に重要な役割をしており、そのシグナルを抑制することで破骨細胞分化を抑制できることが解明した。JNKが人工関節周囲骨融解の治療のターゲットになる可能性が示唆された。

結 論

- 1) 人工関節摩耗粉(PMMA)による刺激でマウスのマクロファージの JNK 及び転写因子 c-jun/AP-1 の活性化が認められた。JNK阻害剤 SP600125 によりそれらは濃度依存性に抑制された。
- 2) PMMA による JNK の活性化は PMMA に付着したエンドキシンとは関連がないと考えられた。
- 3) PMMA によりマウスのマクロファージの破骨細胞分化が促進した。JNK 阻害剤により破骨細胞分化は濃度依存性に抑制された。この反応は JNK 阻害剤による細胞毒性とは関連がないと考えられた。
- 4) 以上の結果より、JNKが人工関節摩耗粉による破骨細胞分化、人工関節周囲骨融解に重要な役割を果たしてしており、JNKがその治療のターゲットになる可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. Harris W H. The problem is osteolysis. Clin Orthop Rel Res. 1995 311:46-53
2. Clohisy J, Hirayama T, Frazier E, et al. NF- κ B signaling blockade abolishes implant particle-induced osteoclastogenesis. Journal of Orthopaedic Research 2004 22:13-20
3. Ikeda F, Nishimura R, Matsubara T, et al. Critical roles of c-jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. J Clin Invest. 2004 114:475-484

参 考 文 献

1. Clohisy J, Yamanaka Y, Faccio R, Abu-Amer Y. Inhibition of IKK Activation, through sequestering NEMO, blocks PMMA-induced Osteoclastogenesis and Calvarial Inflammatory Osteolysis. Journal of Orthopaedic Research 2006 July p1358-1365
2. Hirayama T, Simon D, Abbas S, Yamanaka Y, Abu-Amer Y. Inhibition of inflammatory bone erosion by constitutively active STAT6 through blockade of JNK and NF- κ B activation. ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol52 No9 2005 p2719-2729

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	山 中 康 裕
審査委員長 <u>松 田 光 悦</u> ㊞ 審査委員 <u>立 野 正 敏</u> ㊞ 審査委員 <u>松 野 丈 夫</u> ㊞			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Map Kinase c-JUN N-Terminal Kinase Mediates PMMA Induction of Osteoclast</p> <p>(Map Kinase c-JUN N-Terminal Kinase(JNK)は PMMA による破骨細胞分化に関与する)</p>			
<p>人工関節置換手術後に人工関節周囲骨融解がしばしば出現する。主な原因として、人工関節の摺動面より生じる微小な摩耗粉のために人工関節周囲の骨吸収が進むことが挙げられるが、その詳細な機序は解明されていない。</p> <p>本論文提出者の目的は、人工関節材料の一つである Polymethylmethacrylate (PMMA)の摩耗粉が、骨融解の主役である破骨細胞の分化、増殖に影響するか否かを検討することである。</p> <p>本研究ではまず、生後3-4週のマウスの大腿骨、脛骨の骨髓から得たマクロファージを RANKL 存在下で培養し、破骨細胞への分化を確認した。次いで同様の方法で得たマクロファージを PMMA で刺激して培養後、JNK Kinase Assay を行い、c-jun を媒体とした JNK の酵素活性を示した。さらに Immunoblotting 法で細胞内の JNK, c-jun の蛋白発現を検討し、PMMA 刺激により JNK 及び c-jun がリン酸化されることを示した。また PMMA 刺激で転写因子 c-jun/AP-1 が発現することをゲルシフトアッセイで証明した。これらの反応は、JNK 阻害剤で抑制され、さらにエンドトキシンに反応しない TLR4-null マウスからのマクロファージにおいても PMMA 刺激で JNK がリン酸化されることから、PMMA による JNK の活性化はエンドトキシンと関連しないことを示した。</p>			

従って本研究から、人工関節磨耗粉である PMMA はマウスのマクロファージ細胞内の JNK 及び転写因子 c-jun/AP-1 をすばやく活性化させ、破骨細胞分化を促進することが示され、JNK が人工関節周囲骨融解に重要な役割を果たしていることが証明された。

本研究は、人工関節置換術後の関節周囲骨融解のメカニズムの一端を解明し、新しい生体材料や骨融解防止の創薬研究に寄与するものとする。本学位論文提出者は、当該領域について十分な知識を有しており、試問審査においても明快な回答が得られた。よって本審査委員会は、本論文が学位論文に値するものと判断した。