

|           |                                                                                                                                                 |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | 矢 野 かず き 樹                                                                                                                                      |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                                                                                                                                       |
| 学 位 記 番 号 | 論 農 博 第 2432 号                                                                                                                                  |
| 学位授与の日付   | 平 成 14 年 5 月 23 日                                                                                                                               |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当                                                                                                                         |
| 学位論文題目    | Immunological Studies on the Physiopathological Functions of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF)<br>(破骨細胞形成抑制因子 OCIF の生理・病理学的機能の免疫学的研究) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 永 尾 雅 哉    教 授 伏 木    亨    教 授 井 上 國 世                                                                                             |

### 論 文 内 容 の 要 旨

骨は絶えず骨芽細胞による形成と、破骨細胞による吸収を繰り返し、再構築されている。破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor, OCIF) は、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) 受容体ファミリーに属する骨吸収抑制因子である。破骨細胞形成には RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) と、その真の受容体である RANK 間でのシグナル伝達が必須であり、OCIF はデコイ (おとり) 受容体としてこのシグナルを特異的に抑制することにより、骨吸収の負の調節因子として中心的な役割を担っていると考えられている。本論文では、ヒト OCIF とマウス OCIF に対するモノクローナル抗体を作製して高感度な酵素免疫学的測定法 (ELISA) を構築し、ヒトおよびマウス体液中の OCIF 濃度の変動や慢性関節リウマチ患者滑膜細胞における OCIF 産生調節メカニズムにつき検討している。主な研究成果は次の通りである。

1. ヒト OCIF 濃度の測定に利用できる高感度 ELISA を作製するため、まず抗ヒト OCIF モノクローナル抗体を作製した。得られた種々の高親和性抗ヒト OCIF モノクローナル抗体を組み合わせ、ダイマー型 OCIF とモノマー型 OCIF が等しく測定出来る ELISA (トータル OCIF ELISA) と、ダイマー型 OCIF のみを特異的に測定できる ELISA (ダイマー特異的 OCIF ELISA) の 2 種の高感度 ELISA を構築した。これらの ELISA を用いて健常人の血清を評価し、血清中 OCIF は殆どモノマー型として存在する事を示した。若齢者の血清中 OCIF 濃度は男女とも約 1 ng/ml であり、その濃度は加齢と共に上昇する傾向があることを示した。また平均年齢を揃えた閉経後の女性では、骨粗鬆症の女性の血清中 OCIF 濃度が健常な女性と比較して有意な高値を示すことを明らかにした。これらの結果は、骨吸収が亢進した生体の補償的応答と解釈された。この結果から、今回構築した OCIF ELISA はヒト血清中の OCIF 濃度を測定するのに十分な感度を有しており、ヒト血清中 OCIF 濃度の測定が骨粗鬆症患者の診断に有用なツールであることが示された。
2. 骨破壊には関節局所での OCIF 濃度の変動が関与していると考え、リウマチ患者由来滑膜細胞を用いて、様々な因子による OCIF 産生の調節について検討した。その結果、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) やインターロイキン-6 (IL-6) 等の骨破壊に関係するとされる炎症性サイトカインが、破骨細胞形成をブロックするのに十分な濃度 (5—20 ng/ml) に達するまで OCIF 産生を促進することを明らかにした。一方で、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) はこれらの炎症性サイトカインによる OCIF 産生を強力に抑制すると同時に、骨吸収因子の一つであるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の産生を促進することを示した。以上の結果から、リウマチ患者由来滑膜細胞において、炎症性サイトカインと bFGF のネットワークによる逆方向の OCIF 産生調節メカニズムが存在し、bFGF が骨破壊の増悪因子として作用していることが示唆された。
3. OCIF ノックアウトマウスに、マウス OCIF を免疫して抗マウス OCIF モノクローナル抗体の作製を行い、11種類の高親和性抗マウス OCIF モノクローナル抗体の作製に成功した。これらの抗体を組み合わせ、ヒト OCIF ELISA と同様に、ダイマー型、モノマー型 OCIF を等しく測定できる ELISA と、ダイマー型 OCIF のみを特異的に測定できる ELISA の、2 種の高感度 ELISA の構築に成功した。これらの ELISA を用いてマウス血清を評価したところ、健常マウス血清中の OCIF 濃度は約 0.5 ng/ml で、年齢・性別・系統による差は見られないことを明らかにした。一方、妊娠に伴って血清

中 OCIF 濃度は顕著に上昇し、妊娠 8—11 日目には非妊娠時の約 20 倍に達した。血清中 OCIF 濃度はその後急激に低下し、出産時には非妊娠時と殆ど変わらない濃度に戻った。妊婦は、胎児のために大量のカルシウムを必要としているにも関わらず、妊娠中に骨粗鬆症を発症することはまれであり、妊娠中の過剰な骨吸収を OCIF が効果的に抑制して骨粗鬆症の発症を防止していると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

破骨細胞形成を促進する RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) がその受容体である RANK に結合するのを、破骨細胞形成抑制因子 OCIF はデコイ (おとり) 受容体として阻害することで破骨細胞形成を抑制する。しかし、生体中の OCIF を簡便かつ正確に定量する方法がなかったため、生理的、病理的な血中 OCIF 量の変動、ならびにその意義に関する研究は遅れていた。本論文ではヒト並びにマウスの OCIF を測定する方法を確立し、それらの課題について検討している。成果として評価すべき主な点は次の通りである。

1. 33 種の高親和性抗ヒト OCIF モノクローナル抗体を作製し、これらを組み合わせて、ダイマー型 OCIF とモノマー型 OCIF が等しく測定できる酵素免疫測定法 (ELISA) と、ダイマー型 OCIF のみを特異的に測定できる 2 種の高感度 ELISA を構築した。これらの OCIF ELISA はヒト血清中の OCIF 濃度を測定するのに十分な感度を有しており、①健常人の血清中 OCIF は殆どモノマー型として存在すること、②ヒトでは血清中 OCIF 濃度は加齢と共に上昇する傾向があること、③閉経後の女性のうち、骨粗鬆症の女性の血清中 OCIF 濃度は健常な女性と比較して有意な高値を示すことを明らかにした。骨粗鬆症の女性で血清中 OCIF 濃度が高値を示すことは、骨吸収が亢進した生体の補償的反応と解釈された。

2. リウマチ患者由来滑膜細胞を用いて、OCIF 産生制御について解析し、①骨破壊に関係するとされる炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IL-6 が、OCIF 産生を促進すること、②逆に bFGF はこれらの炎症性サイトカインによる OCIF 産生を強力に抑制すると同時に、骨吸収因子の一つである PGE<sub>2</sub> の産生を促進することを示した。

3. OCIF ノックアウトマウスに対し、マウス OCIF を感作することで、11 種類の抗マウス OCIF モノクローナル抗体の作製に成功した。これらの抗体を組み合わせて、ヒト OCIF ELISA と同様に、ダイマー型、モノマー型 OCIF を等しく測定できるタイプと、ダイマー型 OCIF のみを特異的に測定できるタイプの 2 種の高感度 ELISA の構築に成功した。これらの ELISA を用いて、妊娠に伴うマウス血清中の OCIF 濃度の変動を解析し、妊娠中期の 8—11 日目には非妊娠時の約 20 倍になり、その後急激に低下して、出産時には元の濃度に戻ることを示した。これは胎児へのカルシウム供給が要求される妊娠中において、過剰な骨吸収を OCIF が効果的に抑制して骨粗鬆の発症を防止していると解釈できた。

以上のように、本論文は、ヒトおよびマウス OCIF を特異的に高感度に測定できる ELISA 系を確立することで、加齢や妊娠に伴う生理的な血中 OCIF の変動や、リウマチや骨粗鬆症などの病理的な状況での血中 OCIF の変動を測定可能にし、OCIF の生理機能を明らかにしたものであり、酵素免疫化学、食品栄養化学、生体情報応答学、細胞分子生物学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 14 年 4 月 12 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。