

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目 骨形成促進の分子機構の解明
力学的負荷モデルおよび細胞内情報伝達機構の検討

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成6年4月1日入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 中山 耕之介

地上で生活する脊椎動物の骨には、身体の支持機能とカルシウム・リンの貯蔵庫としての機能がある。骨は活発な代謝を営むことにより再構築(リモデリング)を繰り返しており、骨は、このような骨吸収と骨形成過程の間の動的平衡関係の上に、その機能を果たしている。骨の再構築は、破骨細胞と骨芽細胞による骨吸収と骨形成が、全身性因子、局所性因子、さらには細胞—細胞間あるいは細胞—基質間相互作用などにより、緻密に調節される。この平衡状態が何らかの理由により破綻した結果、骨量や骨強度が著明に減少して、正常な骨の支持機能を維持できなくなった状態が骨粗鬆症である。原発性骨粗鬆症には、骨吸収が亢進して、骨代謝回転が亢進した閉経後骨粗鬆症と、骨形成が優位に低下して、骨代謝回転の低下した老人性骨粗鬆症がある。また、骨への力学的負荷が軽減すると、骨吸収が亢進する一方で、皮質骨の骨外膜側の骨形成が低下し、著明な骨粗鬆症を来す。

近年、破骨細胞の研究は著しい進展を見せ、有効な骨吸収抑制薬の開発が進められている。一方骨芽細胞分化や、骨芽細胞機能発現の機序についてはいまだに不明の点が多く、骨形成を著明に促進する薬剤も存在しない。しかし、老人性骨粗鬆症や力学的負荷の軽減のように骨形成が有意に低下した病態では、骨形成を強力に促進する薬剤こそが、

より本質的な治療法である。そこで、骨形成を担う骨芽細胞の主として分化のメカニズムの解明を通して、骨形成を促進する新たな薬剤の開発、ひいては骨粗鬆症のより有効な予防・治療法の開発への寄与を目指して、以下の検討を行った。

I. 力学的負荷による骨形成促進機序の解明のため、尾部懸垂ラットに再び力学的負荷をかけて、ノーザンブロット法により、各種遺伝子の発現を検討した。また、従来の人工的な実験系を用いた検討から、力学的負荷により、骨細胞により産生されたプロスタグランジン (PG)を介して、骨の細胞で c-fos の発現が誘導される可能性がある。そこで、生理的な力学的負荷による骨での c-fos の発現の変化、また PG 合成と c-fos の発現との間の関係を検討した。

大腿骨の骨外膜と骨内の細胞における I 型コラーゲン $\alpha 1(I)$ 鎖とアルカリフォスファターゼ(ALP)、オステカルシン、cyclooxygenase (COX)-2 mRNA の発現は、14 日間の尾部懸垂による力学的負荷の軽減でも、その後の回転ケージによるこれらのラットの後肢の再負荷でも、変化は認めなかった。しかし、骨外膜細胞での c-fos の発現は、運動開始 20 分後に劇的に増加し、2 時間後まで持続し、その後減少したが、運動開始 6 時間後でも非運動群に比べて増加していた。骨内の細胞でも c-fos の発現は、運動開始 20 分後に一時的に亢進し、その後速やかに低下した。これに対して、COX-2 mRNA の発現は、運動負荷開始 2 時間後に骨内の細胞でのみ増加していた。これらの細胞でも、COX-2 mRNA の発現は、運動負荷開始 6 時間後には、非運動群とほぼ同程度にまで低下した。

しかし、COX 阻害薬インドメサシンを経口投与しても、骨外膜細胞、骨内の細胞のいずれにおいても、運動再負荷後 20 分、60 分での c-fos mRNA 発現亢進に対して、何らの効果も認められなかった。

したがって、生理的な力学的負荷に伴い、*in vivo* の骨の細胞、とりわけ骨外膜細胞で、PG の産生・分泌とは独立に、c-fos の発現が誘導されることが示された。

II. c-fos による AP-1 の活性化は、一般に骨芽細胞の分裂、増殖と関連すると考えられる。チロシンキナーゼ受容体 (RTK) -Ras - extracellular signal regulated kinase (ERK)を介してシグナルを伝達し、さらに c-fos を介して AP-1 を活性化する EGF、bFGF などの

成長因子は、骨芽細胞の増殖を促進する一方で、その分化を抑制する。そこでこれらの成長因子の骨芽細胞分化抑制機序を解明する目的で、Bone morphogenetic protein (BMP)反応性プロモータの活性へのこれら成長因子の作用を、マウス骨芽細胞系細胞 MC3T3-E1 細胞を用いて検討した。BMP はこれらの細胞に作用して、骨芽細胞分化を強力に促進する。抑制性 Smad の一つである Smad6 は、BMP によりその発現が速やかに誘導される。そのプロモータ上には、28 塩基対の BMP responsive element (BMPRE) が存在し、Smad1 と Smad5 が直接結合して、その転写活性を促進する。mS6-lux は、8.5kb の内因性マウス Smad6 プロモータを、一方 3GC2-lux は、X 型コラーゲンのコアプロモータの上流に、BMPRE のみを 3 個直列につなげたものを、それぞれルシフェラーズ遺伝子上流につないだコンストラクトである。

EGF 処理およびアデノウィルスによる constitutively active MEK (caMEK)の強制発現は、BMP により誘導される MC3T3-E1 細胞の ALP 活性を抑制した。一方、EGF と MEK 阻害薬 PD098059 の同時処理および dominant negative Ras (dnRas)の強制発現により、この EGF の効果は阻害された。したがって、これらの成長因子は、RTK - Ras - ERK 経路を介して、BMP により誘導される骨芽細胞分化を抑制する。

EGF、bFGF および caMEK は、BMP で誘導される mS6 の活性を抑制したが、PD098059 および dnRas により、むしろその活性は促進された。同様の効果は BMPRE のみを含む 3GC2-lux においては認められたが、BMPRE に突然変異を導入した 3GC2mut1-lux では認められなかった。したがって Ras - ERK 経路の BMP シグナルに及ぼす効果は、BMPRE および Smad 蛋白を介する可能性が高いことが示された。

免疫蛍光抗体法による Smad1 の細胞内分布の検討では、BMP 処理により Smad1 の核内への集積を認めたが、bFGF を同時処理しても、核内移行の阻害は認めなかった。

以上より、Ras - ERK 経路が、Smad 蛋白の転写活性を直接抑制することにより、BMP シグナルを抑制する可能性が示された。

III. 力学的負荷により実際には骨形成が促進され、c-fos による AP-1 活性化に続いて、骨芽細胞分化が誘導される。BMP は未分化間葉系細胞に作用して骨芽細胞分化を強力に促進する。その機序は不明であるが、BMP によって活性化される Smad 蛋白と複合体を形成して骨芽細胞分化を特異的に誘導する転写因子が関与するものと想定される。

そこで、このような転写因子を同定する目的で、Smad1 の Mad Homology 2 (MH2) 領域をプローブに cDNA ライブラリーをスクリーニングし、発現クローニングを試みた。

その結果、既知の 3 遺伝子 230 kD Phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K230)、QKI、p21^{WAF1/CIP1} と未知の遺伝子 8 クローンを得た。p21^{WAF1/CIP1} は cell cycle を調節する cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor (CKI) で、G1/S 移行を阻害する。p27、p57 とともに CKI のサブファミリーを構成する。BMP が、強力な骨芽細胞分化促進因子であり、細胞によっては増殖の調節にも関与することから、この知見は大変興味深い。実際、p21^{WAF1/CIP1} ファミリーのノックアウトマウスでは、内軟骨性骨化の障害による骨格形成異常が認められる。

今回同定された PI4K は、230kD の III 型 PI4K であり、phosphatidylinositol (PI) の D-4 位のリン酸化を媒介する酵素である。この蛋白は核移行シグナル、leucine zipper、helix-loop-helix (HLH)、Src-homology domain 3 (SH3)、pleckstrin homology domain、proline-rich 領域など種々の調節領域をもち、骨にも強い発現を認める。私たちの得た cDNA クローンは、leucine zipper と HLH を含む。この蛋白の生理的機能は、いまだ不明である。

QKI は、quaking と呼ばれる突然変異マウスの原因遺伝子としてポジショナルクローニングされた、signal transduction and activation of RNA (STAR) ファミリーに属する RNA 結合蛋白である。このマウスでは神経のミエリンの形成に異常が生じ、特徴的な振戦を発症する。Alternative splicing により、QKI-5、-6、-7 の三種類の転写産物がつくられる。この蛋白は、KH 領域と呼ばれる RNA 結合領域、proline-rich 領域と 2 個の SH3 など、種々の調節領域をもつ。私たちが得たクローンは、KH 領域と SH3 を 1 個含む。この蛋白の機能はやはり不明であるが、最近 QKI-6 が、転写抑制因子である可能性が報告され、さらに QKI-5 は主に核内に分布するため、QKI は主として転写調節に関与している可能性もある。QKI の骨での発現は不明であり、quaking マウスでは、骨の異常は報告されていないが、今後 BMP 反応性を中心に、骨の代謝状態を詳細に検討するのも興味深い。

今後も、骨形成を有効に促進する新規の治療法の開発へと実を結ぶべく、これらの検討を重ねていく必要があるものと考えられる。