

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 中 山 耕 之 介

本研究は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、尾部懸垂による力学的負荷軽減動物モデルを用いた *in vivo*、ならびに骨芽細胞分化を強力に促進する BMP のシグナルに着目した *in vitro* の検討を行ったもので、下記の結果を得ている。

1. ラットの尾部を懸垂して後肢の力学的負荷を 14 日間軽減の後、回転ケージによりこれらのラットの後肢に再負荷をかけ、mRNA を抽出してノーザンブロット解析を行った。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、力学的負荷の軽減でも、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は、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、何らの効果も示さなかった。したがって、生理的力学的負荷に伴い、とりわけ骨外膜細胞で、プロスタグランディンの産生・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。
2. 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、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 を用いて検討した。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。mS6-luxはBMP responsive element (BMPRE)の存在する 8.5kb の内因性マウス Smad6 プロモータを、3GC2-luxはBMPREのみ3個を有するレポータープラスミドである。EGF、bFGFおよび constitutively active MEK (caMEK)は、BMPで誘導される mS6 の活性を抑制したが、MEK 阻害薬 PD098059 および dominant negative Ras (dnRas)は、むしろその活性を促進した。同様の効果は3GC2-luxにおいても認められたが、BMPREに突然変異を導入した3GC2mut1-luxでは認められなかった。免疫蛍光抗体法では、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。

3. 力学的負荷により、c-fosによる増殖促進に続いて、骨芽細胞分化が誘導される。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。

以上、本研究はより生理的な実験系である力学的負荷軽減動物モデルを用いて、骨外膜細胞において、c-fosの発現がプロスタグランジンとは独立に促進されること、またこのc-fosの発現を誘導する各種成長因子が、RTK-Ras-ERK経路を介してSmad1の転写因子を直接抑制すること、さらにそのSmad1と相互作用する可能性のある種々の蛋白を同定した。本研究はこれまで人工的な系でのみ観察されていた力学的負荷によるc-fosの発現誘導を生理的な動物モデルにより証明し、c-fos発現が誘導されて骨芽細胞増殖が促進される際に、骨芽細胞分化が抑制される機序を明らかにし、さらにはこれまで未知であったBMPによる骨芽細胞分化促進機序に重要な示唆を与えるものである。したがって本研究は骨形成促進機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。