

論文の内容の要旨

論文題目 受容体型チロシンキナーゼシグナル Gas6/Tyro 3 を介する
破骨細胞の機能解析

指導教官 高戸 毅教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 片桐未佳

1. 背景及び目的

成熟破骨細胞を直接刺激して活性化を促すシグナルは、ほとんど解明されていないが、近年この成熟破骨細胞に Tyro 3, FGFR1 といった複数の受容体型チロシンキナーゼ(RTK)の発現が報告されている。中でも Tyro 3 は最も強く発現している RTK でそのリガンドである Gas6 の刺激によってウサギ長管骨由来の成熟破骨細胞の骨吸収活性を促進する事が知られている。

本研究では、マウスの脾細胞単独培養及び骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養を用いた実験系で、破骨細胞の分化段階における Tyro 3 の発現、また、Gas6 による破骨細胞の分化誘導能、骨吸収活性について検討をおこなった。さらに Tyro 3 を介する細胞内シグナリングについても蛋白レベルでの解析を行った。

以上の解析の後、Tyro 3 / Gas6 シグナリングの *in vivo* における機能との関連を検討するために、卵巣摘出術を施した骨粗鬆症モデルマウスを作成し、脛骨と骨髄細胞における Tyro 3 と Gas6 の発現を検討し、すでに卵巣摘出によってその発現が上昇することが明らかになっている M-CSF を含む他の RTK とそのリガンドについて発現パターンを比較した。

2. 方法

①Gas6 による骨吸収活性の検討：8週令マウス脛骨由来の骨髄細胞と新生児マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞様細胞を 1,25(OH)₂D₃ と PGE2 存在下で共存培養を行うことにより、酒石酸耐性酸フォスファターゼ(TRAP)陽性多核破骨細胞様細胞をコラーゲンゲル上で形成させた。これをコラーゲナーゼ処理によって剥離し、象牙片上に播種して Gas6 存在下及び非存在下で形成された骨吸収窩の数及び面積を測定することにより（吸収窩形成法）、Gas6 の骨吸収活性を検討した。

②Gas6 による破骨細胞の形成能の評価：8週令マウス脛骨由来の骨髄細胞と新

生児マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞様細胞を Gas6 存在下で共存培養を行い、TRAP 陽性多核破骨細胞様細胞形成能を検討した。

③Gas6 による破骨細胞の延命作用の評価：TRAP 陽性多核破骨細胞様細胞をコラーゲンゲル上で形成させたのち、12 well dish に播種、pronaseE+EDTA を用いて単離したのち、Gas6 存在下、非存在下で72時間まで培養した。ポジティブコントロールとして M-CSF を加えた群を置いた。延命効果の評価は、TRAP 染色とトリパンブルー染色によって行った。

④骨系細胞における Gas6 と Tyro 3 の発現の検討：8週令マウス脛骨由来の骨髓細胞と新生児マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞様細胞を $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ と PGE2 存在下で共存培養を行うことにより、TRAP 陽性多核破骨細胞様細胞を形成させ、pronaseE+EDTA を用いて成熟破骨細胞様細胞を単離精製した。骨芽細胞様細胞、成熟破骨細胞様細胞、脾細胞、骨髓細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR にて Gas6 と Tyro 3 の発現を検討した。また、TRAP 陽性多核破骨細胞様細胞および骨芽細胞様細胞からは、蛋白も抽出し、抗 Tyro 3 抗体を用いた Western blot によって Tyro 3 の発現を確認した。さらに脾細胞を RANKL/ODF と M-CSF 存在下で培養し1日ごとに RNA を抽出、破骨細胞の分化段階における Tyro 3 の発現も合わせて検討した。

⑤Tyro 3 を介する細胞内シグナリングの検討：単離した成熟破骨細胞様細胞を Gas6 で1-10分刺激を行い蛋白を抽出、抗 phospho-tyrosine 抗体を用いた Western blot によってチロシンリン酸化の検討を行った。さらに、抗 phospho-p42 / p44 mitogen activated protein (MAP) kinase, 抗 phospho-c-Jun amino-terminal kinase (JNK), 抗 phospho-p38 MAP kinase 抗体で免疫染色を行い、下流の細胞内シグナリングについても検討した。Tyro 3 の自己リン酸化は *In vitro kinase assay* を用いて確認した。さらに、吸収窩形成法を用いて p42 / p44 MAP kinase の inhibitor である PD98059, p38 の inhibitor である SB203580 存在下における Gas6 の骨吸収促進作用への影響も検討した。

⑥卵巣摘出による骨粗鬆症モデルマウスより抽出した骨及び骨芽細胞を用いた m-RNA レベルにおける受容体型チロシンキナーゼとそのリガンドの発現の検討：骨吸収性疾患における Gas6 / Tyro 3 の機能を明らかにしていくために、卵巣摘出による骨粗鬆症モデルマウスを作成し、解析を行った。8週令マウスにケタラル+セレクトラル麻酔下で卵巣摘出術及び偽手術を施し、卵巣摘出群には、プラシーボペレットおよび17β-エストラジオールペレットを埋め込んだ。3週間後、脛骨と骨髓細胞より RNA を抽出し Northern blot によって Gas6, Tyro 3, FGF-2, FGFR1, M-CSF, c-Fms の発現を検討した。

3.結果

①Gas6 による破骨細胞の骨吸収促進効果：マウス骨芽細胞と骨髓細胞の共存培

養系において Gas6 の破骨細胞の機能に対する影響を検討したところ、Gas6 ($\geq 10^{-9}$ M) 群で 2.3 倍以上の骨吸収促進効果が見られたが、骨吸収窩の数には変化が見られなかった。一方、破骨細胞形成に対しては、Gas6 は濃度に関係なく影響を及ぼさなかった。さらに、Gas6 の単離成熟破骨細胞に対する延命作用を 72 時間まで検討したが、コントロール群と比較して差はみられず、48 時間でほとんどの細胞は死滅していた。

②骨系細胞における Tyro 3 と Gas6 の発現パターン：マウス骨芽細胞、破骨細胞、脾細胞、骨髄細胞、脳細胞（ポジティブコントロール）の mRNA レベルでの検討で、Gas6 は全ての細胞において発現が見られたが、Tyro 3 は破骨細胞と脳細胞にしか発現が見られなかった。蛋白レベルにおいても、Tyro 3 は成熟破骨細胞において発現が見られたが、骨芽細胞では発現が見られなかった。一方、破骨細胞の分化段階における Tyro 3 の発現の検討を行った結果、培養 5 日目の成熟破骨細胞の出現に一致して Tyro 3 の発現がわずかにみられ、培養 6 日目に破骨細胞が多数形成されるのに伴ってその発現も増大した。これらの検討から、Tyro 3 は、成熟破骨細胞に特異的に発現し、前駆細胞の段階では発現が見られないことが明らかになった。

③Gas6 における細胞内蛋白チロシンリン酸化

成熟破骨細胞を Gas6 (5×10^{-9} M) で刺激したところ、刺激後 1 分から細胞内蛋白のチロシンリン酸化が見られ最大 10 分まで続いた。MAP キナーゼ関連の抗体による免疫染色により、Tyro 3 の下流では p42 / p44 MAP キナーゼが刺激後 1 分からリン酸化が起これ、2 分で最大に達することが明らかになった。一方で、p38 と JNK はほとんどリン酸化を受けていなかった。さらに *in vitro kinase assay* により、Gas6 は、Tyro 3 のキナーゼ活性を 1 分後から促進し、2 分後にはピークを迎え、5 分後には消失することが明らかになった。

p42 / p44 MAP キナーゼの阻害剤である PD98059, p38 の阻害剤である SB203580 を添加し、Gas6 存在下、非存在下における骨吸収窩形成への影響を検討したところ、PD98059 は、Gas6 刺激による骨吸収窩形成をコントロールレベルまで抑制した。一方で SB203580 は、骨吸収窩形成促進に影響を与えなかった。

④卵巣摘出(OVX)マウスにおける Tyro 3 と Gas6 の発現：骨髄細胞における Gas6 の mRNA レベルでの発現は、同じ RTK で、すでに OVX によってその発現が上昇し、破骨細胞の分化を促進することが明らかになった。M-CSF と同様、卵巣摘出術を行った群で偽手術群よりも増加していたが、エストロゲン投与によってその増加は抑制された。一方で Tyro 3 の発現は、脛骨と骨髄細胞共に見られなかった。このことから、OVX による骨吸収性疾患の病態には、骨髄細胞での Gas6 の発現が関与していることが示唆された。

4. 結語

- ①間葉系細胞や造血系細胞で発現している Gas6 は、成熟破骨細胞特異的に発現している受容体 Tyro 3 に直接作用して骨吸収を促進することが明らかになった。一方で、破骨細胞の分化や延命には影響を与えないことが明らかになった。
- ②Gas6 は、Tyro 3 の自己リン酸化を含む細胞内チロシンリン酸化を介するシグナルによって破骨細胞の活性を促進していることが明らかになった。シグナルの下流には、p42 /p44 MAP キナーゼを介していることが示された。
- ③Gas6 は、成熟破骨細胞に直接作用し、閉経性骨粗鬆症などの骨吸収系疾患の病因となっている可能性が示唆された。今後、Gas6 の臨床的意義についてのさらなる検討を加えていく必要があるものと考えている。