

別紙 2

審査の結果の要旨

氏名 片桐未佳

本研究では、骨吸収において中心的な役割を果たしている成熟破骨細胞での発現が報告されている受容体型チロシンキナーゼ Tyro 3 とそのリガンドである Gas6 が、破骨細胞の分化、延命、骨吸収活性にどのように関与しているかを明らかにし、さらに細胞内シグナリングや、*in vivo* における Gas6 / Tyro 3 シグナルの解明も試みたものであり、下記の結果を得ている。

I. マウスを用いた骨吸収窩形成系において、Gas6 は、 10^9 M 以上の濃度で、2.3 倍以上の骨吸収促進効果が見られたが、一方で骨吸収窩の数には変化が見られなかった。また Gas6 は、破骨細胞形成に関しては、濃度に依存することなく全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見られず、48 時間でほとんどの細胞は死滅していた。

II. 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 はすべ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。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 の発現が見られた。このことから、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。

III. マウス成熟破骨細胞を Gas6(5×10^9 M)で刺激したところ、刺激後 1 分から細胞内の複数の蛋白においてチロシンリン酸化が見られ、最大 10 分まで続いた。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。また、p42/p44 MAP キナーゼも刺激後 1 分からリン酸化が起り、2 分でピークに達することから、Gas6 は Tyro 3 の自己リン酸化を介して複数の蛋白をリン酸化し、下流で p42/p44 MAP キナーゼを介して破骨細胞の機能を促進していることが明らかになった。このことは、p42/p44 MAP キナーゼの阻害剤である PD98059 の添加により Gas6 による破骨細胞の骨吸収活性がコントロールレベルまで抑制されることから証明された。

IV. 卵巣摘出モデルマウスの骨髄細胞において偽手術群との比較で Gas6 の発現が著明に上昇し、さらにエストロゲン添加によってその上昇が抑制されることが明らかになった。このことから、エストロゲン欠乏による骨吸収性疾患において骨髄での Gas6 の発現が関与していることが示唆された。

以上、本研究では、間葉系細胞や造血系細胞で発現している Gas6 は、破骨細胞の分化及び延命には作用せず、成熟破骨細胞に特異的に発現している受容体 Tyro 3 の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示された。

本研究は破骨細胞の分子レベルでの機能解明に役立つと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。