

## 論文の内容の要旨

### 破骨細胞の延命および骨吸収機能活性化に関する研究

指導教官 中村耕三教授

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 宮崎 剛

---

【目的】骨吸収をつかさどる多核巨細胞である破骨細胞は、最終分化した細胞で、その寿命は短い。破骨細胞は支持細胞との接触あるいはいくつかのサイトカインが存在しない場合には速やかに細胞死をおこす。このときの細胞死はアポトーシスによるものであることが報告されているが、その詳細な分子機構は明らかにされていない。古典的MAPキナーゼ系であるRas-Raf-MEK-ERK系は種々の増殖因子刺激によって活性化され、神経細胞や血球系細胞では細胞死に対して抑制的に働くと考えられている。また、すでにIL-1による破骨細胞の延命においてNF- $\kappa$ Bが重要だという報告がある。今回我々はアデノウイルスベクターを用いて破骨細胞の延命、骨吸収機能活性化におけるERK経路とNF- $\kappa$ B経路の役割を検討し、ERKの活性化は破骨細胞の延命に必要であり、NF- $\kappa$ Bは破骨細胞の骨吸収機能の活性化に重要であることを見出したので報告する。

【方法】破骨細胞としては、マウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系において $1\alpha,25(\text{OH})_2$

Dの刺激で形成された破骨細胞様細胞を用いた。非増殖型の組換えアデノウイルス<sup>3</sup>は、斎藤らの方法（COS-TPC法）に従って作製した。すなわち増殖に必要なE1A、E1Bの2つの領域は欠損し、CAG[cytomegalovirus IE enhancer + chicken  $\beta$ -actin promoter + rabbit  $\beta$ -globin poly(A) signal]プロモーターを持つほぼ全長のウイルスゲノムを含むコスミドカセットに目的遺伝子[ドミナントネガティブRas (Ras<sup>DN</sup>)・恒常的活性化型MEK1 (MEK<sup>CA</sup>)・ドミナントネガティブI $\kappa$ B kinase 2 (IKK<sup>DN</sup>)・恒常的活性化型IKK2 (IKK<sup>CA</sup>)]を挿入し、293細胞での相同組換えにより目的のアデノウイルスベクターを得た。破骨細胞における遺伝子の発現はウエスタンブロットによって確認し、ERKの活性化は活性化型ERKのみを認識する抗リン酸化ERK抗体、あるいはin vitroキナーゼアッセイを用いて調べた。NF- $\kappa$ Bの活性化はI $\kappa$ Bのdegradation、EMSA(ゲル移動度シフト法)、あるいはNF- $\kappa$ Bの核移行を抗RelA抗体による免疫染色で検出することにより調べた。破骨細胞のアポトーシスはHoechstを用いた核染色、TUNEL法、DNA断片化の検出によって確認し、共存培養において骨芽細胞除去後、生存している破骨細胞数をカウントすることで定量化した。破骨細胞の骨吸収機能は、破骨細胞によって象牙質切片上に形成された吸収窩の面積を測定することによって定量化した。

**【結果】** 組換えアデノウイルスは、破骨細胞に効率よくそれぞれの遺伝子の発現を誘導した。破骨細胞においてはERKの恒常的な活性化が認められるが、MEK<sup>CA</sup>ウイルスはこれをさらに増強した。共存培養において形成された破骨細胞は、共存する骨芽細胞を酵素処理で除くと速やかに核の凝集・DNAの断片化をおこし、18時間後には約70%の細胞がアポトーシスによって死滅するが、MEK<sup>CA</sup>の発現はこの細胞死を著明に抑制し、ほぼ100%の細胞が72時間後にも生存していた。またRas<sup>DN</sup>の発現はERKの活性化を抑制するとともに破骨細胞のアポトーシスを促進し、18時間後には100%の破骨細胞

が死滅していた。Ras<sup>DN</sup>あるいはMEK<sup>CA</sup>ウイルスは破骨細胞の生存に大きな影響を与え  
るにもかかわらず、破骨細胞の骨吸収能に影響を与えなかった。IKK<sup>DN</sup>ウイルスは破骨  
細胞においてIL-1刺激で起こるNF-κBの核移行を抑制し、逆にIKK<sup>CA</sup>ウイルスでは、  
NF-κBの恒常的な活性化がみられた。興味深いことに、IKK<sup>DN</sup>あるいはIKK<sup>CA</sup>を発現さ  
せても破骨細胞の生存に影響はなく、逆に骨吸収機能がIKK<sup>DN</sup>で低下、IKK<sup>CA</sup>で上昇し  
た。また、IL-1による破骨細胞の骨吸収の上昇もIKK<sup>DN</sup>の発現により有意に抑制され  
た。

**【考察】** これまで"破骨細胞の活性化"を"サバイバルの延長"と"骨吸収活性の上昇"とに分離  
して解析するという概念はなかった。しかし、本研究により、ERKとNF-κBは破骨細  
胞の活性化において異なる役割を果たしていることが示唆された。つまり、ERKは破  
骨細胞の延命を、そしてNF-κBは破骨細胞の骨吸収活性化をそれぞれ制御しているこ  
とが明らかになった。今後は、ERKの下流で何が働いているのか、そしてNF-κBで転  
写される遺伝子の中で何が骨吸収機能発現に重要な役割を果たしているのか、これら  
の点を明らかにしていかなければならないと思われる。