

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 古 山 直 樹

本論文は破骨細胞の機能制御機構の解明を目的に、骨粗鬆症治療薬の一つであるイプリフラボンの骨吸収抑制作用機構の解析を中心に論じたもので、五章より構成されており、要約すれば以下のようになる。

第一章では、骨代謝研究の背景と課題について概説している。特に破骨細胞の骨吸収作用発揮における役割の解明には、I型コラーゲン分解性システインプロテアーゼの産生・分泌に対するpp60^{c-src}活性の関与を明らかにすることの必要性を論じている。

第二章では、3種類のカテプシン（カテプシンK、LおよびB）の破骨細胞における産生・分泌動態とそれらの骨吸収への関与が解析された。その結果、各種骨吸収刺激因子の有無に無関係にカテプシンKの分泌が最大であった。カテプシンBは痕跡程度であり、骨吸収刺激因子によってその産生・分泌量は影響を受けなかった。一方、骨吸収刺激因子の添加によって、カテプシンLの分泌量は増大したが、その総分泌量はカテプシンKより少なかった。そして、カテプシンKおよびカテプシンLの産生あるいは酵素活性の阻害によって骨吸収が抑制されることが明らかにされた。以上の結果より、破骨細胞から分泌され、骨吸収作用を発揮するI型コラーゲン分解性のカテプシン様システインプロテアーゼとしては、カテプシンKおよびカテプシンLが主体であると考えられた。

第三章では、閉経後骨粗鬆症のモデルマウスを用いてカテプシンの関与が解析された。卵巣摘出によって、破骨細胞におけるカテプシンKおよびカテプシンLの産生量が増大し、この増大は両者ともにエストロゲンの投与によって抑制された。しかし、カテプシンBは、いずれの条件においてもほとんど検出されず、*in vivo*においても骨吸収への関与は低いと考えられた。以上の結果より、カテプシンKおよびカテプシンLの産生はエストロゲンによって抑制的な調節を受けており、卵巣の摘出によるエストロゲン欠乏が、該カテプシンの産生増大をもたらすことが示された。

第四章では、カテプシンKおよびカテプシンLの産生・分泌と、これらの分泌に必須と考えられる波状縁の形成にpp60^{c-src}が関与するかが検討された。その結果、骨吸収刺激時および非刺激時のいずれにおいても、pp60^{c-src}阻害化合物であるgenistein、pp60^{c-src}のセカンドメッセンジャーの一つであり細胞骨格の調節に関与することが知られているPI3-kinaseの阻害化合物であるwortmanninおよび、アクチンの重合阻害化合物であるcytochalasin Bは、いずれも破骨細胞におけるカテプシンの産生には影響を与えず、カテプシンLおよびカテプシンKの分泌を抑制することが明らかになった。また、genistein、cytochalasin Bあるいはwortmanninは、破骨細胞のF-actin ringの形成を抑制し、また、I型コラーゲンの分解を抑制した。以上の結果から、pp60^{c-src}活性の阻害は、カテプシンの産生には影響を与え

ずに、PI3-kinaseを介する経路で破骨細胞の細胞骨格の形成不全をきたし、その結果、カテプシンKおよびカテプシンLの分泌が抑制されることによって骨吸収の抑制をもたらすことが示された。

第五章では、既存の骨粗鬆症治療薬の一つであるイプリフラボンの骨吸収抑制作用について、pp60^{c-src}活性の制御を中心に解析した結果が記されている。すなわち、成熟破骨細胞へのイプリフラボンの添加によって該細胞内のpp60^{c-src}のキナーゼ活性は阻害され、また、破骨細胞におけるアクチンの重合が抑制された結果、F-actin ringの形成不全がもたらされた。これらの結果から、イプリフラボンは破骨細胞のpp60^{c-src}のキナーゼ活生の阻害を介して細胞骨格構築を抑制しカテプシンの分泌を抑制することにより、骨吸収を抑制すると考えられた。

以上の結果より、破骨細胞におけるc-Src活性を介したカテプシンの産生・分泌調節機序、および、カテプシンの骨吸収作用機構を中心とした骨代謝機構が明らかになった。従来、破骨細胞の形態学的な分化促進因子のほとんどが骨吸収活性を促進することから、破骨細胞の骨吸収能は破骨細胞の分化により時系列的に発現するものと考えられてきた。しかし、本論又は破骨細胞の分化過程において、形態学的な分化とは別に機能発現を独立して調節する機序が存在することを証明している。これらの発見は骨代謝機構を理解する上で重要な知見で、獣医学領域に貢献しているところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。