

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 細胞周期関連蛋白による骨芽細胞分化制御機構に関する研究

指導教官 高戸 毅教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 小笠原 徹

(要旨) 細胞周期は、細胞が増殖するか、分化に向かうか、あるいは休止期 (G0 期) に入るかを最終的に決定する場であり、細胞の分化増殖を研究する上で重要な要素であるにもかかわらず、骨系細胞の分化、増殖において細胞周期というシステムがどのように関わっているのかはこれまで殆ど検討されてこなかった。そこで、本研究では、分化の起こる G1 期に機能する分子に注目し、BMP-2 による骨芽細胞分化誘導における細胞周期関連蛋白の関与について検討した。まず第 1 章では、BMP-2 による細胞周期関連蛋白の発現調節を検討した。次に第 2 章では、CDK6 の細胞内機能解析を目的として遺伝子導入を行い、CDK6 蛋白を安定的に高発現する細胞株を樹立し、それらを用いて分化能および増殖能の評価を行った。

### 第 1 章 骨芽細胞における BMP-2 による細胞周期関連蛋白の発現調節

第 1 章では、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 培養系における BMP-2 による細胞周期関連蛋白の発現調節を分析した。

#### 1-1 BMP-2 に反応性を有する、G1 期に機能する細胞周期関連蛋白

MC3T3-E1 細胞培養系において、BMP-2 に反応する細胞周期関連蛋白を検討する目的で、BMP-2 処理 0、6、10、24、28、32、55 時間後に蛋白を抽出し、Western blotting を行った。分析の結果、細胞分化の起こる G1 期に機能する分子の中でも、特に CDK6 の発現レベルが BMP-2 処理によって著明に抑制されることが分かった。同種の蛋白である CDK2 および CDK4 の発現レベルには変動が認められなかった。また、CDK4 と CDK6 の共通の基質である Rb 蛋白の発現レベル並びにそのリン酸化について、55 時間後ではコントロール群と BMP-2 処理群との間に明らかな差は認められなかったが、経

時的な変動パターンにはやや違いが見られ、コントロール群が 10 時間後くらいから発現レベルが強く上昇するのに対して、BMP-2 処理群はそれより遅れて 24 時間後から発現レベルの強い上昇が見られた。

また、サイクリンならびに CKI の中には、BMP-2 に対する明らかな反応性を有するものはなかった。これらの検討から、MC3T3-E1 細胞に BMP-2 による分化シグナルが入ると、CDK6 の蛋白レベル低下が起こることが明らかとなり、さらに CDK6 以外に BMP-2 に反応性を有するものがなかったことから、分化に関して CDK6 が何らかの重要な役割を持っていることが示唆された。

### 1-2 CDK6 蛋白レベル抑制のメカニズム

MC3T3-E1 細胞を BMP-2 処理すると CDK6 蛋白レベルが著明に低下することが明らかとなったため、次にそのメカニズムを分析した。細胞周期関連蛋白が一般にユビキチン-プロテアソーム系によって分解されることから、BMP-2 処理による CDK6 蛋白レベルの低下もユビキチン-プロテアソームを介した蛋白分解系によるものか否かを分析する目的で、プロテアソームとカルパインの阻害剤である MG132 (2  $\mu$ M) の影響を検討した。BMP-2 処理 24、28 時間後に蛋白を抽出し、Western blotting を行った結果、MG132 を加えていないコントロール群においても、MG132 添加群においても BMP-2 による CDK6 蛋白レベルの低下が認められた。つまり、BMP-2 による CDK6 蛋白レベルの低下にユビキチン-プロテアソームによる蛋白分解系は関与しないことが推測された。

### 1-3 シグナル伝達経路の分析

アデノウイルスベクターを用いて MC3T3-E1 細胞内に抑制型 Smad である Smad6 を過剰発現させ、Smad シグナルを遮断した状態で細胞を BMP-2 処理した場合の CDK6 の発現レベルを Western blotting で検討した。コントロール群で、BMP-2 処理 12、24、30 時間後に CDK6 の発現低下が認められたが、Smad6 感染群では、CDK6 の発現低下は認められなかった。この結果から、BMP-2 処理による CDK6 の発現低下は Smad シグナルを介していることが示唆された。

## 第 2 章 骨芽細胞における CDK6 の機能解析

### 2-1 CDK6 高発現細胞株の樹立

CDK6 蛋白の細胞内機能解析のために、MC3T3-E1 細胞に CDK6 遺伝子を導入し、

CDK6 蛋白を安定的に高発現する細胞株を樹立した。親株 (MC3T3-E1 細胞) と同程度の発現レベルの細胞株を低発現群、親株の数倍の発現レベルを示す細胞株を高発現群と判定した。

#### 2-2 アルカリフォスファターゼ活性を指標とした分化能の評価

培養 72 時間後における親株、低発現群、高発現群の分化能を評価するために ALP 活性を指標とする分析を行った。親株および低発現群では BMP-2 処理によって ALP 活性が著明に促進されたが、高発現群では BMP-2 によるこれらの促進効果は軽度だった。

#### 2-3 オステオカルシン mRNA の発現を指標とした分化能の評価

BMP-2 処理 48 時間後におけるオステオカルシンおよび BMP-2 のシグナルを伝達する BMP レセプター I A と BMP レセプター II の発現を RT-PCR によって検討した。親株および低発現群では BMP-2 処理によってオステオカルシンの発現が誘導されるのに対し、高発現群ではその誘導が認められなかった。また、BMP-2 非処理群は、どの群でもオステオカルシンの誘導は認められなかった。さらに、BMP-2 のシグナルを伝達する BMP レセプター I A と BMP レセプター II の発現は遺伝子導入によって明らかな影響を受けていなかったことから、CDK6 高発現群での分化能の低下はレセプターの変化を介するものではないと思われた。

#### 2-4 BrdU の取り込みによる増殖能の評価

本来増殖と分化のメカニズムは互いに抑制し合うものであり、CDK6 が細胞周期のエンジンであることから、その強制発現による分化能の低下は主に増殖促進効果によるものである可能性が考えられた。その点を検討するために増殖能の評価を行った。親株、低発現群、高発現群それぞれに対して BMP-2 非処理と BMP-2 処理群を置いて分析した。培養 1 日目および培養 3 日目の BrdU incorporation assay の結果、BMP-2 非処理と BMP-2 処理を問わず、細胞群間で顕著な増殖能の差は認められなかった。

#### 2-5 フローサイトメトリーによる分析

親株、低発現群、高発現群で細胞周期の分布に差が認められるかを検討するために、フローサイトメトリー (FACS) による分析を行った。親株、低発現群、高発現群それぞれにおける細胞播種 24 時間後の細胞周期の分布を分析したところ細胞群間で細胞周期の分布に大きな差は認められなかった。

過去の研究により、BMP-2 による骨芽細胞分化誘導シグナルは BMP レセプター II、

BMP レセプター I を経て、Smad を介して伝達されることが明らかになっているが、本研究によって、さらにその下流に CDK6 の抑制という現象が存在することが示された。また、CDK6 強制発現による分化抑制効果は、増殖の促進による二次的なものではなく、直接的な効果である可能性も示された。すなわち、本研究によって CDK6 が骨芽細胞分化効率に直接的に働く因子のひとつである可能性が示された。