

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 小笠原 徹

本研究は、骨芽細胞の分化過程において細胞周期関連蛋白がどのような役割を演じているかを明らかにすることを目的として、細胞分化の起こる G1 期に機能する分子に注目し、BMP-2 による骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) 分化誘導系における細胞周期関連蛋白の関与について検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. MC3T3-E1 細胞において、BMP-2 処理によって CDK6 の発現レベルが著明に抑制されることが Western blot により示された。また、CDK6 以外に BMP-2 に反応性を有する分子が存在しなかったことから、分化に関して CDK6 が重要な機能を果たしていることが示唆された。
2. BMP-2 処理による CDK6 蛋白レベルの低下がユビキチン-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 の影響を検討したところ、MG132 添加群でも 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分解系は関与しないことが推測された。
3. アデノウイルスベクターを用いて細胞内に抑制型 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 の発現レベルを検討したところ、Smad6 感染群においては CDK6 の発現低下が認められなかった。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。
4. CDK6 蛋白の細胞内機能解析のために、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、その分化能を検討した。評価に関しては、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性および RT-PCR によるオステオカルシン mRNA の発現をその指標としたが、いずれの場合も CDK6 強制発現によって分化能が著しく抑制された。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 の発現を RT-PCR によって検討したところ、その発現の有無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 強制発現による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ことが示唆された。

5. 本来増殖と分化のメカニズムは互いに拮抗し合うものであり、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 CDK6 高発現細胞における増殖能の評価を行った。DNA 合成能を評価する BrdU incorporation assay の結果、CDK6 強制発現が増殖能を有意に亢進させるという所見は得られなかった。さらに CDK6 強制発現によって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ところ、細胞周期の分布に大きな差は認められなかった。したがって、CDK6 強制発現による分化能の低下は、増殖促進の結果もたらされた二次的なものではなく直接的効果によるものであることが示唆された。

以上、本論文は、骨芽細胞分化過程における細胞周期関連蛋白の関与、特に CDK6 の役割を明らかとし、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を示した。本研究は、これまで未知に等しかった細胞分化における細胞周期メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。