

論文の内容の要旨

論文題目 骨芽細胞分化調節因子に関する研究

氏名 須澤美幸

目的

骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞、脂肪細胞は共通の未分化間葉系細胞（関葉系肝細胞）に由来し、それぞれ数多くの分化促進因子や、抑制因子等による複雑なバランスによりそれぞれの細胞への分化能を獲得するものと考えられる（図 1）。分子生物学的手法の発達により現在様々な分化促進因子がクローニングされ、更に遺伝子欠失マウスを用いる事で、飛躍的に骨芽細胞、脂肪細胞に重要な因子が明らかとなってきた。

しかしながら現在までの検討では、増殖、分化に係わる因子の取得、解析は進歩したものの細胞本来の持つ細胞分化機序、それぞれの分化振り分けのメカニズムに関しては今だ不明な点が多い。上記背景をふまえ、本研究では骨芽細胞、脂肪細胞分化に着目し、これら細胞分化がどのように制御されているか解明する事を目的とし、骨芽細胞、未分化間葉系細胞を用い 1) 骨芽細胞自身が産生する内因性 BMP-2/4 の骨芽細胞分化に及ぼす役割とその重要性 2) 骨芽細胞により産生される I 型コラーゲンと、細胞接着因子 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンとの結合により活性化される focal adhesion kinase(FAK)と BMP-2 シグナルとのクロストーク 3) 脂肪細胞分化において負のレギュレーターである TGF β 、IL-1、TNF α シグナルが PPAR γ の転写制御機構に及ぼす影響の以上 3 点を分子生物学的手法を用いて解析した。

1) 内因性に発現する BMP-2 の骨芽細胞分化に及ぼす影響

骨芽細胞は骨形成に関与する主要な細胞であり、骨基質蛋白を産生し類骨を形成する事により骨基質を増加していく。in vitro の系で前骨芽細胞様細胞を骨形成促進因子としてクローニングされた BMP とともに長期培養すると、骨芽細胞としての機能を保持する細胞へと分化する。しかしながら、本来細胞自身が保持している成熟した骨芽細胞分化のメカニズムは不明確な部分が多い。そこで、マウス頭蓋骨由来前骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を用い 1) BMP が発現しているか否か、また分化によって発現に差が認められるかどうか、2) BMP のたんぱく質の局在、3) 細胞内キナーゼ領域を欠失させた BMP I 型レセプターを恒常的に発現させた MC3T3-E1 細胞をクローニングし、骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討した。結果として MC3T3-E1 細胞において mRNA レベルでの発現を確認し、更にその発現は分化段階による影響は認められない事が RT-PCR 法を用い明らかにした。また BMP は細胞外基質に強く局在していることを確認した。分化によって基質蓄積能が多くなる事から、MC3T3-E1 細胞は自ら産生した BMP を基質に貯える事により自信の分化を促進させるオートクリン的な働きをする事が確認された。また BMP のシグナルを遮断する為、BMP レセプタードミナントネガティブ体 stable MC3T3-E1 細胞(Δ BMPRI MC3T3-E1)を取得し機能解析を行った。その結果 Δ BMPRI MC3T3-E1 細胞は骨芽細胞への分化能を持たなかった。今回の検討により細胞外基質中に蓄積された内因性 BMP-2/4 が骨芽細胞分化において不可欠である事を明らかにした。

2) I 型コラーゲン $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンからのシグナル伝達系と BMP-2 下流シグナル伝達因子 Smad1 のクロストーク

骨芽細胞は細胞外基質産生能の高い細胞である。中でも I 型コラーゲンは主要骨基質タンパクであり、I 型コラーゲンを中心として秩序だった配列により類骨を形成し骨量の増大とともに骨の形態を適切に保持することに寄与している。つまり、成熟したコラーゲンの合成が個築地において重要であると言える。成熟したコラーゲン繊維を形成する為には補酵素としてアスコルビン酸が必須であり、アスコルビン酸非存在下で MC3T3-E1 細胞を培養すると骨芽細胞への分化の進展が認められなくなる。I 型コラーゲンは細胞接着因子 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンと結合し FAK (Focal adhesion kinase) を介し MAP kinase を活性化する。またこの MAP kinase の活性化機構は EGF によ

る活性化と異なり、EGF による ERK の活性化が 15 分程度から比較的早い速度で活性化されるのに対し FAK*による ERK の活性化は 1 時間後から開始され、その活性化が比較的長い時間起こる事が報告されている。(ref)この FAK を介する MAP kinase の活性化が骨芽細胞の分化に重要である事が報告された。(ref)そこで 1)に示した BMP のシグナルと I 型コラーゲン- $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンからのシグナル伝達系のどちらが分化において重要か、またこれら両者の間にクロストークが認められるか検討した。BMP シグナル伝達因子として 1997 年に Masage らによりクローニングされた下流シグナル伝達因子 Smad1 タンパクを用い検討した。1) FAK anti sense DNA を恒常的に発現させ、FAK のシグナルを遮断した MC3T3-E1 細胞 (FAK antisense 細胞) をクローニングしその分化に及ぼす影響を検討した。2) 長期 MAP kinase を活性化させるモデル系として活性化型 Ras の発現ベクターを用い細胞に co-transfect し Smad1 の転写活性化に影響を及ぼすか検討した。3) Smad1 の MAP kinase リン酸化領域を欠失した Smad1(Δ Smad1)、もしくは serine を alanine に置換しリン酸化されない Smad1 発現ベクター(mut Smad1)を作成し活性化型 Ras による影響が認められるか否か検討した。その結果 FAK antisense MC3T3-E1 細胞は骨芽細胞分化能を保持しなかった。Smad1 の転写は活性化型 Ras により活性化された。 Δ Smad1、もしくは mut Smad1 では活性化が認められなかった。以上の結果より、FAK のシグナル BMP のシグナル共に、骨芽細胞の分化において重要であり、更に協調的に働く事が示唆された。

3) PPAR γ の転写制御機構に及ぼす脂肪細胞の負のレギュレーターである TGF β 、IL-1、TNF α の機構解析

脂肪細胞は未分化間葉系細胞より分化し、TGF β 、IL-1、TNF α の存在によりその分化は抑制される。その抑制機序は不明な点が多い。PPAR γ は、グルココルチコイド、エストロゲン、甲状腺ホルモンおよび脂溶性ビタミンなどをリガンドとするレセプター群と同族の核内受容体型転写因子であり、現在 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ の三種類のアイソフォームが報告されている。中でも PPAR $\gamma 2$ は脂肪細胞特異的に発現しており脂肪細胞分化の中核的な役割を担っている。そこで、TGF β 、IL-1、TNF α の脂肪細胞分化抑制機構が PPAR γ と関係するか否か分子生物学的手法を用い検討した。まず TGF β 、IL-1、TNF α 及びその下流シグナル伝達因子群が PPAR γ の転写活性化に影響を与えるか Luciferase assay を用い検討した。その結果 PPAR γ の転写活性化に対し

TGF β 、IL-1、TNF α 抑制的に作用する事が明らかとなった。更にその下流シグナル伝達因子群の中で TAK1 (TGF-beta-activating kinase 1)/TAB1, NIK (NF- κ B-inducing kinase), NF- κ B の pathway が負のクロストークに関与することが明らかとなった。しかしながら今回の検討では TGF β による負のクロストークがどのように行われているか確認することができなかった。次に、この負のクロストークがどのような機序で行われているか検討した。最初に NF- κ B による抑制機序がダイレクトなのか、インダイレクトなのか in vitro の結合実験 (GST-pull down 法、gel shift 法) を用いて解析した。更に、実際に PPAR γ により制御される遺伝子が TGF β 、IL-1、TNF α により抑制されるか Northern blotting 法、ChIP assay を用いて解析した。その結果、NF- κ B がこの抑制に強く関与し、その抑制機序は PPAR γ の DNA 結合阻害である事を発見した。更に PPARにより発現が制御される CAP(c-Cbl-associating protein)の発現を TNF α 、IL-1 は抑制した。以上の結果より脂肪細胞分化の抑制機序の一つに NIK を介した NF- κ B が関与する事を示すものである。

まとめ

骨芽細胞、脂肪細胞は同種の未分化間葉系細胞由来である。一つの細胞が多様な細胞へ分化する上で多くの分化促進因子、分化抑制因子がクローニングされている。しかしながら、どのような機序において来細胞自身が保持している細胞分化のメカニズムは不明確な部分が多い。本実験において 1) 骨芽細胞における分化制御が、自ら産生する BMP を骨基質中に蓄える事でそのシグナルを伝え、更に骨基質主要構成たんぱくである I 型コラーゲンが $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンを介し活性化される MAPK が分化において必要条件である事を明らかにした。更に、脂肪細胞分化においては、その分化抑制機序を解析した。今後更に基礎的な検討を行い、分化の振り分けがどのように行われているか明確にする事が、最終的に臨床応用につながって行くものと考えられる。今回の検討により、骨芽細胞骨芽細胞分化、脂肪細胞分化に着目し研究をすすめ、これら細胞分化がどのような因子により制御されているか、一部明らかにできたものと思われる。