

論文の内容の要旨

論文題目 骨芽細胞分化における基質細胞間相互作用の役割
—その細胞内シグナルの解明—

指導教官 藤田敏郎 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

内科学専攻

氏名 田村康博

I型コラーゲンは骨の細胞外基質を構成する成分として重要な物質であるが、骨芽細胞分化にとっても必須の促進因子であることが知られている。私はI型コラーゲンが骨芽細胞分化を促進する機序を解明するために、Focal adhesion kinase(FAK)と discoidin domain receptor-2 (DDR2)の2つのシグナル分子に着目し、以下の実験を行った。

まず私は、マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、 $\beta 1$ インテグリンシグナルの直接下流に位置する FAK が、bone morphogenetic protein 2(BMP-2) - Smad1 シグナルや骨芽細胞分化のために必須の役割をすることを示した。

インテグリンを介する細胞基質間相互作用は骨芽細胞分化に不可欠なことが知られている。竹内らはI型コラーゲンによる $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンの集結により活性化されるシグナルが骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の分化に関与していることを示してきた。FAK は $\beta 1$ インテグリンシグナルの直接下流に位置し、その不活性化は骨芽細胞分化を障害することが示されている。骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞における FAK の役割を明らかにするため、私は antisense FAK messenger RNA(mRNA)を恒常的に発現する MC3T3-E1 細胞(asFAK 細胞)を用い実験を行った。asFAK 細胞において、骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性は、21 日後までの長期培養においても、BMP-2 処理下においても上昇しなかった。また asFAK 細胞に BMP-2 を処理してもオステオカルシンの発現は刺激されなかった。対照 MC3T3-E1 細胞では BMP-2 は Smad1 の核内移行を促進し、Smad1 反応領域を含む Smad6 遺伝子プロモーターの転写活性を刺激した。しかし、asFAK 細胞において BMP-2 は、Smad1 の核移行を起こすにもかかわらず、Smad6 遺伝子

プロモーターの転写活性を増加させることができなかった。これらの結果から骨芽細胞様細胞において FAK は Smad1 核移行ではなく Smad1 依存性の転写活性に関与していると考えられた。このことより骨芽細胞様細胞におけるインテグリン-FAK 活性化によるシグナルは、BMP シグナルに転写活性化の部位で収束する可能性があると考えられた。以上より、FAK 活性化は骨芽細胞分化を刺激する BMP-Smad シグナルに必須であることが示唆された。

次に、骨芽細胞様細胞における、Ⅰ型コラーゲンに対するチロシンキナーゼレセプターDDR2 の働きを検討した。

Ⅰ型コラーゲンに対する非インテグリンレセプターである DDR2 は骨芽細胞様細胞に発現している。チロシンキナーゼ配列を含む DDR2 の細胞内領域は、Ⅰ型コラーゲン刺激によって DDR2 自身や他の蛋白のチロシンリン酸化を起こすと考えられている。DDR2 は、インテグリンを介してコラーゲンにより活性化される FAK や PI3-K やその下流の分子を直接リン酸化しない。しかし FAK や phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-K)に対する抗体での免疫沈降により、これらの分子と密接な相互作用をすることがわかった。チロシンキナーゼ欠失 DDR2 は細胞骨格を障害し、骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を抑制するが、DDR2 全長の過剰発現は骨芽細胞における分化マーカーを増加させた。このように DDR2 は骨芽細胞において、基質コラーゲン刺激に対しインテグリン関連のシグナル伝達分子と協調しつつ機能している可能性があると考えられた。

以上のように、骨芽細胞においてⅠ型コラーゲンは、インテグリン・DDR2 を介し FAK、PI3-K などを活性化させ、それらの分子同士および BMP2 シグナルとの協調の下に骨芽細胞分化を促進するものと考えられる。この経路をさらに解明していくことが、代謝性骨疾患の病態解明等に重要と思われる。