

審査の結果の要旨

氏名 田村 康博

本研究は骨芽細胞分化における細胞外基質の役割を明らかにするため、骨芽細胞様 MC3T3 細胞の長期培養により骨芽細胞分化形質発現が経時的に進展する系を用いて、細胞内分子 FAK(focal adhesion kinase)によるシグナルとコラーゲンレセプターDDR2(discoidin domain receptor2)シグナルの骨芽細胞分化との関連を検討したものであり、以下の結果を得ている。

1. Antisense FAK messenger RNA(mRNA)を恒常的に発現する MC3T3-E1 細胞(asFAK 細胞)では、長期培養においても骨芽細胞分化誘導因子 BMP-2(bone morphogenetic protein-2)処理下においても骨芽細胞分化マーカーが上昇せず、骨芽細胞分化が障害されていることが分かった。
2. BMP-2 シグナルの細胞内伝達因子 Smad1 に FLAG タグのついた蛋白を発現するプラスミドを asFAK 細胞に導入し、免疫染色によって Smad1 細胞内局在を調べたところ、asFAK 細胞では BMP-2 刺激による Smad1 核移行は障害されていないことがわかった。
3. Smad1 反応領域を含む Smad6 遺伝子プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子をつないだプラスミドを asFAK 細胞に導入して転写活性を調べたところ、asFAK 細胞では BMP-2 刺激にともなう Smad1 依存性の転写が障害されていることが分かった。さらに 1. 2. を考え合わせるにより FAK は骨芽細胞分化に不可欠な役割を果たし、その役割は Smad1 核移行でなく Smad1 依存性の転写を支持することによると考えられた。
4. コラーゲン刺激後の MC3T3-E1 細胞溶解液を抗 FAK 抗体、抗

PI3-K(phosphatidyl inositol 3-kinase)抗体で免疫沈降することにより、DDR2、FAK、PI3-K はコラーゲン刺激下で密接な関係を示すことが分かった。

5. チロシンキナーゼ欠失 DDR2 を発現するプラスミドを MC3T3-E1 細胞に導入したところ、細胞骨格は障害され骨芽細胞マーカーは抑制されたが、MC3T3-E1 細胞に DDR2 全長を過剰発現させると骨芽細胞分化マーカーは増加した。4. と考え合わせると 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骨芽細胞分化を促進する可能性があると考えられた。

以上、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において、FAK シグナルおよび DDR2 シグナルを操作し、FAK シグナルが骨芽細胞分化において不可欠な働きをすること、DDR2 シグナルも FAK シグナルと協調しつつ骨芽細胞分化を促進する可能性があることを明らかにした。本研究はこれまで明らかにされてこなかった細胞外基質による骨芽細胞分化促進作用の機序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。