

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 金 宣 和

本研究は、免疫応答に重要な役割を果すインターフェロン (IFN) $-\beta$ 及び転写因子 Stat (signal transducer and activator of transcription) 1 が骨代謝の制御に関与するという新たな機能を明らかにし、その分子機構を詳しく調べ、骨破壊の病態での臨床応用の新たな道を開いたものであり、下記の結果を得ている。

1. RANKL 標的遺伝子を gene chip を用いて解析した結果、破骨細胞から RANKL シグナルにより様々な I 型 IFN (IFN $-\alpha/\beta$) 誘導遺伝子が誘導されることが見い出された。さらに、IFN- β mRNA が RANKL シグナルにより誘導されることも明らかにした。I 型 IFN 系が RANKL シグナルによる破骨細胞の分化系にどうかかわっているのかをまず、I 型 IFN シグナルを欠損したマウスの骨組織を検討した結果、I 型 IFN 受容体 (IFNAR1) 欠損マウスおよび IFN- β 欠損マウスが、過剰な破骨細胞形成の結果、骨粗鬆症様の病態、すなわち骨減少症 (osteopenia)を呈することが見い出され、I 型 IFN 系が破骨細胞の分化の負の制御系を担っていることが明らかになった。IFNAR1 欠損マウスの破骨細胞前駆細胞では、可溶性 RANKL による破骨細胞形成が亢進しており、RANKL 刺激により前駆細胞自身が産生する IFN- β の破骨細胞分化制御における重要性が明らかになった。さらに、IFN- β による RANKL シグナルの抑制機構の解析を行い、IFN- β は下流で活性化される転写因子複合体 ISGF 3 (IFN stimulated gene factor 3) 依存的に RANKL シグナルの必須転写因子である c-Fos の発現をタンパク質レベルで低下させることも明らかになった。レトロウイルスを用いた c-Fos 過剰発現により、IFN- β の抑制作用が解除されたことから、IFN- β シグナルの標的が c-Fos であることが示された。また、

IFN- β による c-Fos 抑制作用の一部が PKR (double strand RNA-dependent protein kinase) を介して行われていることも明らかになった。さらに、IFN- β プロモータに c-Fos が直接結合すること、RANKL による IFN- β 誘導が Fos 欠損マウスでは認められないこと及び IFN- β プロモータの RANKL 及び c-Fos による活性化が IFN- β プロモータの c-Fos 結合部位に変異を入れることで消失することから、RANKL による IFN- β の誘導には c-Fos 自身が必須であることが判明した。即ち、RANKL シグナルが c-Fos を介し自らの抑制因子である IFN- β を誘導する、いわゆる「自己制御」と呼べるフィードバック制御機構が働いていることが明らかになった。IFN- β 投与は LPS (lipopolysaccharide) による炎症性骨破壊モデルの過剰破骨細胞形成と骨量減少を抑制し、IFN- β が固体レベルでの骨量維持を調節できることが示された。以上より、ウイルス感染時に誘導される生体防御因子である IFN- β に、破骨細胞分化の抑制因子として生理的な骨代謝維持に必須のサイトカインであるという新たな側面が明らかになり、治療への応用の可能性も示唆された。

2. IFN- β による破骨細胞分化の抑制に必須であった転写因子複合体 ISGF3 を構成する Stat1 及び IRF-9 の骨代謝における意義を明らかにするため、私は Stat1 及び IRF-9 欠損マウスの骨組織の解析を行った。IRF-9 の欠損マウスは IFN- β 及び IFNAR1 欠損マウスと同様の過剰な破骨細胞形成による骨減少症を呈することを明らかにした。しかしながら、興味深いことに Stat1 欠損マウスでは破骨細胞の形成や活性の増加が見えながらも、骨芽細胞の機能がさらに亢進したため、骨量が著しく増加していた。さらに、*in vitro* 培養系において、Stat1 欠損細胞における骨芽細胞への分化マーカーの発現の増加が見られ、Stat1 欠損マウスの骨量増加が骨芽細胞の分化の亢進によるものであることが明らかになった。また、レトロウイルスを用いた Stat1 過剰発現により骨芽細胞分化が抑制されたことより、Stat1 が骨芽細胞分化の負の制御にかかわっていることが判明した。骨芽細胞の分化を誘導するシグナルの解析により Stat1 欠損細胞は BMP-2 による反応性が高まっていること、その下流の骨芽細胞分化の必須転写因子である Runx2 の DNA 結合能が著しく増加していることが明らかになった。さらに、Stat1 と Runx2 が骨芽細胞内で結合することを明らかにし、相互結合に必須な領域を同定し

た。Stat1 及び Runx2 のレトロウイルスを用いた過剰発現の実験により、主に核に局在する Runx2 が Stat1 と複合体を形成することで細胞質に留まることが明らかになった。また、Stat1 の tyrosine701 のリン酸化が起きない Stat1CYF が Stat1 と同様に Runx2 と複合体を形成し、Runx2 の機能を抑制することから、Runx2 を介し骨芽細胞の分化を調節する Stat1 の機能にはリン酸化が関係ないことが判明した。本研究により Stat1 による新たな骨芽細胞分化調節機構が明らかになった。すなわち Stat1 転写因子は細胞質内で Runx2 の核内移行を負に調節する“attenuator”として作用することが判明した。

以上、本論文は IFN- β 及び Stat1 の骨代謝調節における新たな機能とその作用機構を明らかにした。この研究の結果は、生理的な骨代謝制御機構の解明において重要な意義をもつだけでなく、骨疾患の治療という臨床的な応用も期待され、学位の授位に値するものと考えられる。