

論文の内容の要旨

論文題目

アポトーシス誘導蛋白質 **Bim** による破骨細胞アポトーシスならびに骨吸収機能制御に関する研究

指導教官 中村耕三教授
東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学
医学博士課程
外科学専攻

氏名秋山 達

骨の機能は単に重力に抗して身体の形態を維持するだけでなく、カルシウムの貯蔵庫や血液を作る工場としての役割などさまざまな役割を担っている。そのため、骨組織は生体内において身体の成長が終了した後も骨形成と骨吸収を繰り返しながらその機能や形態を維持している。さまざまな要因により骨の骨形成と骨吸収のバランスは破綻し、骨の形質が変化することが知られている。骨形成は軟骨細胞や骨芽細胞による内軟骨性骨化や膜性骨化によって行われ、骨吸収は破骨細胞によってのみ行われることが知られている。骨吸収の観点から骨組織機能の破綻した例を挙げるならば、骨粗鬆症や関節リウマチ、あるいは悪性腫瘍の骨転移などが挙げられる。これらは骨吸収機能が亢進したために病的な状態に陥った例である。一方骨吸収が低下したためにやはり病的な状態に陥った例として大理石病が挙げられる。生体内における骨吸収は破骨細胞の分化・活性化・アポトーシスの 3 つの要素が密接に絡み合って調節されている。破骨細胞は最終分化した細胞であり、分化後、マクロファージコロニー刺激因

子(M-CSF)などの生存因子や骨芽細胞などの支持細胞が存在しない状態では速やかにアポトーシスを起こして細胞死に陥り生体内から除去されるという特徴がある。しかしながら破骨細胞のアポトーシスに関してはほとんど何も分かっていないのが実情である。本研究は破骨細胞アポトーシスのシグナル伝達経路を明らかにすることを目的として行った。アポトーシスとは、生体にとって不必要な細胞が遺伝子にプログラムされた様式にしたがって自分自身に細胞死を惹き起こす現象である。アポトーシス制御の異常は腫瘍、自己免疫疾患、そして変性疾患を惹き起こすとされている。アポトーシスシグナル伝達経路には大きく分けてデスレセプターを介する経路とミトコンドリアを介する経路の二つが存在するが、破骨細胞のアポトーシスシグナル伝達経路はミトコンドリアを介する経路であることが明らかになった。ミトコンドリアを経由するアポトーシス経路は **Bcl-2 family** に属する蛋白質により調節される。**Bcl-2 family** はアポトーシスを促進する蛋白群とアポトーシスを阻害する蛋白群の両者を含んでおり、4種類の **Bcl-2 homology (BH) domain** と呼ばれる共通ドメインの内、どのドメインを持っているかによってアポトーシス進行においてどの役割を果たしているのかが決定される。破骨細胞のアポトーシスは **pro-apoptotic Bcl-2 family** の内、細胞ならびにシグナル特異性が高い **BH3 domain only protein Bcl-2 family** に属するアポトーシス誘導蛋白質 **Bim** の急速な発現上昇ならびにその後の遷延した発現量に依存していることが明らかになった。**Bim** の発現は **M-CSF** によって抑制され、この発現量変化は **mRNA** の転写レベルではなく蛋白レベルで制御されていた。**Bim mRNA** の骨組織における発現は **in situ hybridization** ならびに **Bim** 遺伝子を **lacZ** 遺伝子に置換した **knock-in** マウスにおける β -galactosidase 染色によって解析した。解析の結果 **Bim mRNA** は骨組織において破骨細胞特異的に出ている。 **Bim** 遺伝子欠損マウスの骨組織にお

る組織学的所見ならびにエックス線像は、骨組織内の破骨細胞数は正常型マウスの骨組織に比べ増加しているが破骨細胞の骨吸収能の低下を反映したと思われる中等度の骨量増加が認められた。正常型マウス骨髄細胞より分化した破骨細胞に比べ、**Bim** 遺伝子欠損マウス骨髄細胞から分化した破骨細胞は M-CSF 非存在下でも著明な生存の延長を示したが、骨吸収能は大きく減少していた。**Bim** が破骨細胞機能をアポトーシスとは独立して亢進することが明らかになったがその詳細なメカニズムについては不明であり今後引き続き解析していく予定である。**Bim** 遺伝子欠損マウス由来の破骨細胞に正常型の **Bim** を過剰発現すると **Bim** は M-CSF によりユビキチン化により分解され、発現抑制がかかりアポトーシスが阻害されるが、ユビキチン化依存性の分解に対して耐性になるように作成したリジン残基欠損 **Bim** を過剰発現すると **Bim** は M-CSF による発現抑制がかからずアポトーシスも阻害されなかった。つまり、**Bim** の M-CSF による発現抑制効果はユビキチン化ならびにプロテアソーム系による分解系に依存していることが明らかになった。M-CSF の下流で破骨細胞においては **Cbl family** が活性化することがこれまでに明らかになっており、**Cbl family** はユビキチン化に重要な役割を果たすことから **Cbl family** に属する **c-Cbl** が **Bim** のユビキチン化に関係しているかを解析した。アデノウイルスで **c-Cbl** ならびに **c-Cbl** の抑制型である **v-Cbl** を破骨細胞に過剰発現したところ、**Bim** のユビキチン化は **c-Cbl** により促進され、**v-Cbl** により抑制された。**c-Cbl** 遺伝子欠損マウスを解析したところ **c-Cbl** 遺伝子欠損破骨細胞の **Bim** ユビキチン化が障害されていた。**Bim** のユビキチン化には **c-Cbl** が重要であることが明らかになった。以上の結果から破骨細胞のアポトーシスならびに骨吸収機能制御にユビキチン化を介した **Bim** の発現量調節が非常に重要であることが分かった。

制された。c-Cbl 遺伝子欠損マウスを解析したところ c-Cbl 遺伝子欠損破骨細胞の Bim ユビキチン化が障害されていた。Bim のユビキチン化には c-Cbl が重要であることが明らかになった。以上の結果から破骨細胞のアポトーシスならびに骨吸収機能制御にユビキチン化を介した Bim の発現量調節が非常に重要であることが分かった。

以上、本論文は破骨細胞のアポトーシスシグナル伝達経路において Bim の発現量調節が重要であるのみならず、機能調節においても Bim の発現調節が重要であることを明らかにした。本研究は、これまでほとんど解析されていなかった破骨細胞アポトーシスシグナル伝達経路の解明に重要な貢献をなすばかりでなく、アポトーシス分子がアポトーシス機能とは独立して機能調節を行うことを示したことから、破骨細胞の解析に非常に重要な役割を果たすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。