

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 秋山 達

本研究は骨のホメオスターシスの維持は骨形成をつかさどる軟骨細胞並びに骨芽細胞と骨吸収を行う唯一の細胞である破骨細胞のバランスにより行われている。破骨細胞は最終分化を起こした細胞であり、分化後すぐにアポトーシスに陥るという特徴がある。しかしながら破骨細胞アポトーシスのシグナル伝達系については何も分かっていないのが実情である。本研究は破骨細胞のアポトーシスシグナル伝達経路を明らかにするために行われたもので下記の結果が得られている。

1:破骨細胞に Bim はミトコンドリアを介してアポトーシスを起こす

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電位の観測並びにミトコンドリアよりの cytochrome C の放出を観測することにより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。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。

2:骨組織において Bim は破骨細胞特異的に発現する

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。

3:Bim 遺伝子欠損マウスは低回転型の骨硬化傾向を示す

Bim 遺伝子欠損マウスの骨組織におけ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。正常型マウス骨髓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髓細胞から分化した破骨細胞の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。

4:Bim 遺伝子欠損マウスの生体内で破骨細胞は生存が延長している

正常型マウス骨髓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髓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。

5:Bim の分解系において MEK-ERK 系が重要である

Bim の発現調節に関してはこれまで MEK-ERK 系ならびに AKT の重要性が報告されている。正常型破骨細胞に対しアデノウイルスベクターを用いて MEK-ERK 系並びに AKT をそれぞれ恒常活性化させ Bim の発現量に対する影響を検討した

結果 MEK-ERK 系が有意に Bim の発現量を減少させることが明らかになった。
また、M-CSF により破骨細胞の MEK-ERK 系が活性化されるが、PD98059 により MEK を阻害すると Bim の発現量抑制効果が阻害されることが明らかになった。これらのことから破骨細胞における M-CSF による Bim の抑制効果はおもに MEK-ERK 系が重要であることが明らかになった。

6:破骨細胞において Bim は転写レベルではなくユビキチン化による蛋白レベルでの分解系で調節される

正常型マウス骨髓細胞より分化した破骨細胞にプロテアソーム阻害薬である MG132 ならびに M-CSF を作用させ、Bim の発現量上昇が観察されたことと、同一条件下において Bim の免疫沈降実験を行うことで M-CSF 依存性に Bim がユビキチン化されることが確認された。さらに 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た。また、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。これらのことより破骨細胞における M-CSF による Bim の発現抑制効果ならびに生存延長効果は、Bim の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。

7:Bim のユビキチン化には Cbl family が重要である

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。

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。