

## 別紙 1

### 論文の内容の要旨

論文題目  $G\alpha_q$  タンパク質を介するシグナルの骨代謝における機能解析に関する研究

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9年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 緒方直史

#### 【背景】

従来の骨粗鬆症治療は、骨吸収抑制療法、ビタミン療法、ホルモン補充療法がその中心であり、主に骨吸収を抑える事により骨量を維持しようとする薬剤の開発応用が進められ、骨芽細胞に直接作用して骨形成を促進することにより骨量を増加させる薬剤は全く臨床応用されていなかった。しかしながら近年、従来は血中カルシウム濃度を上昇させるために骨吸収を促進することが主な作用と考えられていた副甲状腺ホルモン (PTH) に強力な骨形成促進作用があることが明らかとなり、PTH は骨量を増加させる唯一の因子として注目を集めている。実際、PTH には骨吸収作用も有するが、その作用時間および使用量によって骨芽細胞に直接作用し、骨形成を促進させることが *in vivo*, *in vitro* における研究で証明されるようになり、PTH の骨代謝における多様な作用が明らかとなってきた。しかし現在のところ PTH の骨形成作用機序の薬理効果の分子メカニズムについてはまだ十分解明されていないのが現状であり、そのメカニズム解明研究が、より強力な骨粗鬆症治療薬の開発につながるのではないかと考えられている。PTH は副甲状腺で産生、分泌される 84 アミノ酸からなるペプチドホルモンで、生体内では主に血中カルシウムとリン濃度の調節に働いている重要なホルモンで、骨吸収および腎臓におけるカルシウムの再吸収、リンの排出を促進して血中カ

## 別紙 1

ルシウム濃度を上昇させリン濃度を低下させる。PTH 受容体は七回膜貫通部位を有する受容体で、その作用はその受容体に結合するGタンパク質を介して情報を伝達する。これまで PTH 受容体に結合することが知られているGタンパク質は、 $G\alpha s$  と  $G\alpha q$  の二種類であり、 $G\alpha s$  を介したシグナルが Adenylate cyclase (AC)、それに続いて cyclic AMP(cAMP)からプロテインキナーゼA(PKA)を活性化する経路と、 $G\alpha q$  を介して Phospholipase C (PLC)を活性化し、 $Ca^{++}$ の蓄積とプロテインキナーゼC (PKC)を活性化する二つの主たる経路があることが報告されている。今までの報告では骨芽細胞における PTH のシグナルは主に AC を介した PKA へのシグナルが重要であると考えられてきた。しかしながら、未だ  $G\alpha s$  のみを介したシグナルだけでは PTH の多彩な作用を説明できていないのみならず、もう一方のシグナルである  $G\alpha q$  を介した検討は骨代謝に関してはほとんど行われなかった。骨芽細胞において PTH が受容体に結合後、そのシグナルが二つのどちらか、あるいは両方に流れるようにするスイッチ機構が働くことにより、PTH の骨芽細胞への複雑な作用が働くとも考えられるが、実際にはそのどちらのシグナルが骨形成に具体的にどのように作用しているのか、未だはっきりと解明されていない。

本研究においては、PTH シグナルに存在するもう一方の  $G\alpha q$  を介したシグナルに着目し、*in vitro* での検討として  $G\alpha q$  を介したシグナルの骨芽細胞における増殖分化への関与を調べた。その後、*in vivo* における検討を行うために、遺伝子操作により骨芽細胞特異的に  $G\alpha q$  を介したシグナルが恒常的に流れるようにしたトランスジェニックマウスを作成し、それらのマウス骨組織を *in vivo*, *in vitro* で解析することにより、 $G\alpha q$  を介したシグナルの骨代謝における重要性およびメカニズムを解明した。

### 【方法と結果】

#### 培養骨芽細胞における $G\alpha q$ シグナルの機能解析

恒常的に活性作用を持つ CA- $G\alpha q$  を作製し、 $G\alpha q$  を安定強制発現する MC3T3-E1 細胞株を樹立した。そのイノシトールリン酸産生能は上昇しており、 $G\alpha q$  シグナルが恒常的に流れていることが確認された。CA- $G\alpha q$  を安定発現する骨芽細胞では増殖能は異常が見られなかったが、ALP 活性が有意に低下しており、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現もコントロールと比べて明らかに低下しており、恒常的な  $G\alpha q$  シグナルにより骨芽細胞の分化能が抑制されていることが解明された。

#### 骨芽細胞特異的に恒常活性型 $G\alpha q$ 遺伝子を強制発現させたトランスジェニックマウスの作成およびその骨組織の解析

骨組織における $G\alpha q$ シグナルの*in vivo*における役割を調べるために、Col.1-2.3プロモーターを用いて骨芽細胞特異的に恒常的活性型 $G\alpha q$ 遺伝子を発現させたトランスジ

## 別紙 1

ェニックマウスを作成し、その骨組織の表現型を解析した。

**表現型の解析：**トランスジェニック(Tg)マウスは合計3ライン作られ、ライン間で有意な差はなかった。Tgマウスは正常に生まれ、発生および生下時ではワイルドタイプ(Wt)マウスと比較して違いはなかった。しかし、生後2週目以降Tgマウスにおいて成長障害が認められ、体重においてはWtマウスと比べて約60%、脛骨長においては約70%しか成長しなかった。一部のTgマウスにおいて長官骨の骨折が認められ、骨の脆弱性が示唆された。血中のCa、PTH濃度には違いがなかった。

**骨組織の解析：**8週齢のTgマウスは軟線X線写真上、同胞Wtマウスに比べて著しい骨粗鬆化を呈した。Tgマウスの脛骨骨密度は同胞Wtマウスに比べて約35%低下しており、3次元CTにおいて、この骨量減少は海綿骨・皮質骨ともに見られた。組織学的検討でも、Tgマウスの脛骨近位端では海綿骨の骨梁構造が低下しており、皮質骨でも菲薄化が認められ、明らかなwoven boneの像を呈していた。骨量そのものは減少していたが、類骨の増大はなく石灰化能に異常はなかった。骨組織形態計測でもTgマウスにおいて単位骨量が雄性WTに比し60%減少しており、骨芽細胞の指標(Ob.S/BS、OS/BS)が有意に低下した。一方、骨吸収の指標(N.Oc/B.Pm、Oc.S/BS)には差が無く、骨芽細胞機能の低下により骨量減少を呈することが明らかとなった。カルセイン二重ラベルによる動的形態計測でも(BFR、MAR)明らかにTgマウスにおいて骨形成能が低下した。骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現の低下も見られ、Tgマウスにおいて明らかな骨芽細胞の分化異常認められた。一方、BrdUの取り込みによる増殖能の検討では、成長板の軟骨細胞における増殖能には差が認められなかった。TUNEL法によるアポトーシスの検討では、Tgマウスの骨芽細胞において明らかなアポトーシスの亢進が認められた。

### 初代培養系における骨芽細胞の分化増殖に関する解析

Tgマウスにおける骨量減少のメカニズム解明のために、新生仔頭蓋骨由来の骨芽細胞(POB)培養系において、<sup>3</sup>H-thymidineの取り込み、ALP活性、Alizarin red染色を指標としてその増殖・機能を検討した。TgマウスのPOBでは増殖能には差がなかったが、基質合成能がWtマウス由来のPOBよりも有意に低下しており、石灰化能もほとんど消失していた。骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現も低下しており、特にオステオカルシンの発現はほとんど見られず、著明な最終分化の抑制が認められた。骨髄細胞の単独培養でも、Tgマウス由来の骨芽細胞での分化能の低下が認められた。一方骨芽細胞におけるRANKLの発現を半討したところ、どちらの骨芽細胞でも差は見られず、破骨細胞形成支持能は差がなかった。Gαqシグナルの下流に存在するPKCのインヒビター(GF109203X)を加えて培養したところ、Tgマウス由来の骨芽細胞でのALP活性が

## 別紙 1

Wtマウス由来骨芽細胞レベルにまで上昇し、またWtマウス由来の骨芽細胞においても、PKCインヒビターを加えるとそのALP活性が上昇し、 $G\alpha q$ シグナルを介したPKCシグナルをブロックすることにより分化能が上昇した。このことから、 $G\alpha q$ を介したPKCシグナルに骨芽細胞の分化を抑制する作用があることが示された。

### 【考察と結論】

骨芽細胞に恒常的活性型  $G\alpha q$  遺伝子を強制発現させてイノシトールリン酸産生能を亢進させると、その細胞の増殖能には差がなかったが、分化が抑制されることが分かった。この *in vitro* での検証をふまえて、*in vivo* での  $G\alpha q$  シグナルの骨芽細胞での機能を解析するために、恒常的活性型  $G\alpha q$  遺伝子を骨芽細胞特異的に強制発現させたトランスジェニックマウスを作製した。そのマウスの骨組織の検討を行ったところ、成長障害を来し、著明な骨粗鬆化が見られ骨量が減少しており、その原因としてトランスジェニックマウスにおける骨芽細胞の分化抑制およびアポトーシスの亢進によることが判明した。また、このトランスジェニックマウスから取り出した初代骨芽細胞の検討でも CA- $G\alpha q$ シグナルの存在により骨芽細胞の分化が抑制されており、アポトーシスの亢進が認められたことから、 $G\alpha q$  タンパクを介したシグナルに分化抑制作用およびアポトーシス誘導作用があると考えられた。今まで、PTH の骨形成作用に対して  $G\alpha s$  を介した cAMP/PKA シグナルが注目され多くの解析がされてきたが、今後は  $G\alpha q$  を介した PLC/PKC シグナル、さらには他のシグナルとのクロストークも含めた包括的な検討が必要となってくると思われる。特に PTH 刺激により、 $G\alpha s$ ,  $G\alpha q$  が共に活性化されシグナル伝達を行っていることから、両者のシグナルのバランスの違いにより PTH の多彩な作用が伝わっている可能性も考えられる。PTH の濃度の差により濃度が濃いときには  $G\alpha s$ 、薄いときは  $G\alpha q$  に選択的にシグナルが流れるという報告もあることから、両者のシグナルの密接な関係無しにはメカニズムの解明に進まないと考えられる。さらなる  $G\alpha q$  シグナルの研究により、PTH の骨芽細胞への骨形成促進作用のメカニズムの解明、さらには  $G\alpha q$  シグナルを選択的に抑制させることにより、PTH の骨形成作用を効率よく発現させることができる骨形成促進剤の開発の可能性が考えられる。