

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 福 田 明

本研究は低分子量 G タンパク質の中で、従来、成長因子受容体シグナルの下流に位置し、主に細胞骨格の制御に関わることが知られていた Rho ファミリー低分子量Gタンパク質、特に Rac1 と破骨細胞の機能および生存との関わり、さらにそれらのシグナル伝達の詳細を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 主要なRho ファミリー低分子量Gタンパク質であるRhoA、Rac1、Cdc42の恒常抑制型変異体(RhoA^{DN}, Rac1^{DN},Cdc42^{DN})のアデノウィルスを作製し、これらを用いて破骨細胞の生存、活性におけるRho ファミリー低分子量Gタンパク質の役割が検討された。RhoA、Rac1の活性を抑制すると、破骨細胞の骨吸収は著明に減少したが、Rac1の機能抑制では破骨細胞の生存も抑制され、この効果はRac1に特異的であることが示された。
2. Rac1が介する成長因子のシグナルが検討された。破骨細胞の生存を促進する因子のうち、M-CSFに注目している。M-CSFは強力な抗アポトーシス作用を持つと同時に、細胞のSpreading、移動にも関わり、Rac1との関連を想起させるためである。M-CSFの投与は速やかにRac1を活性化し、M-CSF の添加により破骨細胞の生存は促進されたが、Rac1^{DN}の過剰発現により、この生存促進効果はほぼ完全に打ち消された。逆に恒常活性型のRac1^{CA} によりRac1のシグナル伝達経路を活性化することでサイトカインなどを加えることなしに破骨細胞の生存は促進された。これらの結果より、Rac1がM-CSFの下流で破骨細胞の生存促進のシグナルを伝えることが示された。
3. Rac1が生存シグナルを伝える経路の検討として、Ras/MEK/ERKのいわゆる古典的MAPキナーゼカスケードとPI-3'キナーゼ/ Aktの経路のそれぞれについて、特異的阻害剤と活性型変異体のAktを発現するアデノウィルスを用いて実験が行われた。Rac1^{CA}は著明に破骨細胞生存を促進したが、MEKの阻害剤PD98059はこれを有意には抑制しなかった。一方PI-3'キナーゼ阻害剤である、ワートマニンとLY294002は共に完全にこれを抑制した。さらに、活性型Aktを破骨細胞に発現させると破骨細胞の生存は有意に延長した。以上の結果からRac1による破骨細胞の生存促進のシグナルにはMEK/ERKの経路よりもPI-3'キナーゼ/ Aktの経路がより大きく関与することがわかった。
4. さらに、シグナル伝達のタンパクレベルでの検討がなされた。まず、M-CSFによるRac1の活性化がPI-3'キ

ナーゼ阻害剤で抑制されるかを調べると、全く抑制されなかった。一方PI-3'キナーゼの触媒サブユニット p110の過剰発現で生じるAktのリン酸化はRac1^{DN}により部分的に抑制された。同様にM-CSF添加で生じるAktのリン酸化もRac1^{DN}でのみ部分的に抑制されたが、この効果はERKのリン酸化に関しては認められなかった。以上の結果からM-CSF刺激後の破骨細胞において、Rac1とPI-3'キナーゼはどちらかが上流に位置するという単純なシグナル伝達経路では説明が困難で、相互作用をしつつシグナル伝達が行われるのではないかと結論づけられた。

5. Rac1の不活化が破骨細胞の細胞骨格に与える影響についての検討が、微速度ビデオ顕微鏡撮影の画像解析によりなされた。動的な細胞骨格の変化を評価するため、M-CSF投与の前後で画像解析を行ったところ、投与後に生じる膜運動の活性化がRac1^{DN}を過剰発現させると有意に抑制されていることがわかった。Rac1^{DN}が動的な細胞骨格の制御に関わることが示された。

以上、本論文は従来、細胞骨格の制御に関わるとされてきたRhoファミリー低分子量Gタンパク質の一つRac1が、破骨細胞の生存シグナルにも大きく関与することが初めて示され、そのシグナル伝達経路として、Rac1がM-CSF受容体の下流に位置し、生存シグナルをPI-3'キナーゼとAktを介して伝えることが示された。また、同時にRac1は細胞膜の運動を制御することにより、骨吸収能に関与する可能性も示唆された。本研究は、病的な骨量減少を引き起こす疾患の治療薬として、破骨細胞のアポトーシスをターゲットにする上で不可欠な、その分子生物学的メカニズム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。