

## 審査の結果の要旨

氏名 釘宮 典孝

本研究は骨形成作用のあるインスリン/IGF と Wnt シグナル経路に共通の Gsk-3 $\beta$ に着目し、Gsk-3 $\beta$  ヘテロノックアウトマウスの骨形成を解析した。さらにその制御メカニズムについて分子生物学的、遺伝学的手法を適用して下記の結果を得ている。

1. Gsk-3 $\beta$ ヘテロノックアウトマウスは、大きな骨格パターンニングの異常はなかったが、骨の放射線学的解析および組織学的解析により、海綿骨と皮質骨とも骨量が増加していることが分かった。一方、成長板における軟骨分化は正常であった。骨形態計測により Gsk-3 $\beta$ ヘテロノックアウトマウスの骨代謝は、骨形成と骨吸収が共に亢進している高回転型であることが分かり、これは *in vitro* の系でも確認された。これらのデータは、生理的な骨芽細胞分化に対して GSK-3 $\beta$  は抑制的に制御していることを示唆する。

2. *in vitro* における GSK-3 $\beta$  の機能亢進および機能喪失の実験により、Runx2 の転写活性が GSK-3 $\beta$  により制御されていることが判明した。この制御メカニズムについて Runx2 の mRNA 発現量、蛋白発現量、細胞内局在やリン酸化に着目したが、GSK-3 $\beta$  シグナルはこれらのどれも変えなかった。またこの GSK-3 $\beta$  と Runx2 の関連が生理的なものかを確認するために、Gsk-3 $\beta$  ヘテロノックアウトマウスと Runx2 ヘテロノックアウトマウスを掛け合わせたところ、Runx2 の対立遺伝子が 1 つ欠損しているために生じている鎖骨頭蓋異形成症を表現型が、Gsk-3 $\beta$  の対立遺伝子を 1 つ欠失させることや、GSK-3 $\beta$  の選択的阻害剤のリチウムの投与で部分的に救済された。以上より、GSK-3 $\beta$  は生理的な Runx2 機能の制御に深く関与していると示唆される。

3. 以上より、骨芽細胞分化においてGSK-3 $\beta$ がRunx2の機能を*in vitro*と*in vivo*の両方で抑制していることが分かったが、GSK-3 $\beta$ シグナルはRunx2のmRNA発現量、蛋白発現量、細胞内局在やリン酸化を変えなかった。このことからRunx2シグナルを修飾するGSK-3 $\beta$ の他の標的の存在が示唆される。そこで現在知られているGSK-3 $\beta$ の下流分子を検索し、骨芽細胞分化においてRunx2と相互作用する分子を探索することにしたところ、GSK-3 $\beta$ の下流分子の中から、CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)  $\beta$ とC/EBP $\delta$ がRunx2のコアクチベーターとして働くことを解明した。GSK-3 $\beta$ シグナルはこれらコアクチベーターの細胞内局在とDNA結合能を制御することで、Runx2による骨芽細胞分化を修飾していることを示した。

以上、本論文は高度な分子生物学的、遺伝学的手法を利用して、骨芽細胞分化におけるGSK-3 $\beta$ の役割を明らかにした。本研究はこれまで知られていなかったGSK-3 $\beta$ の骨形成における役割と鎖骨頭蓋異形成症の治療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。