

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 疋田 温彦

本研究は破骨細胞の分化および成熟に必須の膜タンパクである receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)の切断に関連する分子を同定し、切断の生理学的、病理学的意義を明らかにするためのスクリーニングを行い、得られた分子についての解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. RANKL 切断を簡便に検出するため、RANKL の細胞内ドメインから切断を受ける部位である stalk region までの部分と secreted placental alkaline phosphatase (SEAP)の融合タンパクを発現するプラスミドを作成した。これを用いてマウス骨髄ストローマ系の細胞株である ST2 細胞の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、9つのポジティブクローンを得た。そのうち比較的高い活性を持つものとして、matrix metalloproteinase 14 (MMP14), Ca²⁺-promoted Ras inactivator (CAPRI)の新しいスプライスバリエント、 Δ CAPRI が同定された。
2. Δ CAPRI は wtCAPRI とともに骨芽細胞に発現していることが示されたが、wtCAPRI に比してその発現量は低かった。 Δ CAPRI は 293T 細胞、SaOS2 細胞において RANKL 切断を促進したが、wtCAPRI はそれを促進せず、また、 Δ CAPRI の RANKL 切断促進作用は wtCAPRI を同時に発現させることにより抑制された。この結果より、 Δ CAPRI は wtCAPRI と拮抗する働きを持つことが示唆された。
3. Δ CAPRI は wtCAPRI と同様に、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により細胞膜へと

移動した。また、wtCAPRIはRasの下流分子であるERKの活性化を阻害したが、 Δ CAPRIは逆に促進した。この結果より、 Δ CAPRIはwtCAPRIとは逆にRasシグナル系を活性化することが示された。

4. 293T細胞において Δ CAPRIはRANKL切断を亢進したが、ドミナントネガティブ型Rasを同時に発現させることにより抑制された。恒常活性型Rasの発現によりRANKL切断は亢進したが、Rasの下流シグナル分子であるMekの恒常活性型を発現させてもRANKL切断は亢進しなかった。この結果から、 Δ CAPRIはRasシグナルの活性化を通じてRANKL切断を促進していると考えられた。
5. 293T細胞において Δ CAPRIは、今回クローニングされた唯一のプロテアーゼであるMMP14の発現量を上昇させたが、ドミナントネガティブ型Rasを同時に発現させることにより抑制された。恒常活性型Rasの発現によりMMP14の発現量は上昇したが、恒常活性型Mekを発現させてもMMP14の発現量は上昇しなかった。また、SaOS2において Δ CAPRIはRANKL切断を亢進したが、MMP14のRNA interference plasmidを同時に導入することにより切断は抑制された。この結果から、 Δ CAPRIはRasシグナルの活性化を通じてMMP14の発現を上昇させ、RANKL切断を促進していると考えられた。
6. MMP14と同じくその欠損マウスが骨変化を生じることが報告されているMMP13についてもRANKL切断を検討したが、明らかな活性は見られなかった。

以上、本論文はST2 cDNAライブラリーに対する新しいスクリーニング法を用いてRANKL切断関連分子としてMMP14、およびCAPRIの新しいスプライスバリエントである Δ CAPRIをクローニングし、 Δ /wtCAPRI-Ras-MMP14系がRANKL切断に重要な働きを持つことを明らかにした。本研究はこれまでほとんど未知に等しかったRANKL切断機構およびその生理学的、病理学的意義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。