

論文の内容の要旨

論文題目 骨組織石灰化を制御する細胞内情報伝達系に関する研究

指導教員 中村耕三 教授

東京大学医学部大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

河野慎次郎

骨基質の石灰化は骨組織形成の最終段階に位置する重要なステップであるが、石灰化という現象自体がどのようなメカニズムによって誘導されるのかについては未だに解明されていない点が多く存在する。

Classical MAP kinase (MAPK) シグナル伝達系である Erk pathway は、すべての真核生物に共通するプロテインキナーゼカスケードであり、種々の増殖因子受容体から Ras、Raf-1、Mek を経て Erk の活性化が誘導され核内へ情報を伝達する。

ここで石灰化における Classical MAP kinase (MAPK) シグナル伝達系である Erk pathway に着目すると、Jaiswal らは Adult Human Mesenchymal Stem Cell においてステロイド、アスコルビン酸、 β -glycerophosphate (β -GP) による、ALP ならびに calcium の上昇が、Erk pathway の活性により促進されると報告し、Lai らは Human Osteoblastic Cells において Erk pathway の抑制により calcium が低下すると報告している。また逆に

ChaudharyらはMC3T3-E1細胞においてErk pathwayの活性がType I Procollagen Geneの発現を抑制し石灰化が低下すると報告し、HiguchiらはBMP付加したC2C12細胞およびMC3T3-E1細胞においてErk pathwayの抑制によりcalciumが上昇すると報告している。

このように一見矛盾したような結果が生じる理由としては、これまでの研究では実験に使われる細胞が未分化な骨芽細胞系細胞であることが多く、骨芽細胞の分化に伴う石灰化亢進と石灰化自体の亢進とを混同していること、研究に用いられた阻害剤などが必ずしも特異的にErk pathwayのみを抑制しているとは限らないことなどが考えられる。

本研究においては分化が前骨細胞系へとすでに進んだ株細胞MLO-A5、および前骨芽細胞株であるMC3T3-E1細胞にRunx2を強制発現させ、強制的に最終分化を誘導した骨芽細胞を利用し、阻害剤のみならずアデノウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いることによって、石灰化におけるErk pathwayの特異的な役割を分化過程から切り離して明らかにしようと実験を行なった。

マウス長幹骨から樹立されたMLO-A5細胞は、分化の最終段階である前骨細胞の形質を有する株細胞であり、高い石灰化誘導能を持つものである。またMC3T3-E1細胞は未熟な骨芽細胞様の形質を有する株細胞であるが、コンフルエントの状態になると基質産生が亢進し、成熟した骨芽細胞の形質を示すようになる。このMC3T3-E1細胞の分化にはrunt domain 転写因子Runx2が重要な役割を果たしており、Runx2を過剰発現させたMC3T3-E1細胞は骨芽細胞の最終分化の段階となることが示されており、MLO-A5細胞と同様に高い石灰化誘導能を持つ。

MLO-A5細胞にErk阻害剤であるPD98059を添加しアリザリンレッド染色により石灰化の変化を検討すると、MLO-A5細胞の石灰化は促進した。MLO-A5細胞にPDGFで刺激するとErkの活性化を示すとともに石灰化が著明に抑制された。PD98059によりPDGFの石灰化抑制効果がほぼ完全にレスキューされることから、PDGFによる石灰化抑制作用

は Erk 活性化を介する作用と考えられた。さらにドミナントネガティブ型の Ras 変異体 (Ras^{DN})、および恒常活性型 Mek1 (Mek^{CA}) 遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルス (AxMek^{CA}、AxRas^{DN}) を MLO-A5 細胞に感染させたところ、AxMek^{CA}による Erk 活性化は石灰化を抑制し、AxRas^{DN}による Erk 不活性化は石灰化を促進した。また Runx2 を過剰発現させた MC3T3-E1 細胞においても同様に、AxMek^{CA}は石灰化を抑制し、AxRas^{DN}は石灰化を促進した。その結果 Erk pathway の亢進により石灰化の抑制が、Erk pathway の抑制により石灰化の促進が起きることが明らかになった。このときの石灰化の変化がウイルス感染などによる細胞増殖や細胞死によって生じている可能性を否定するために MTT アッセイをおこなったが、細胞の viability の値に変化はなく、少なくともこの実験系において細胞死を介したメカニズムで石灰化の変化が生じていることは否定的であった。

次いで MLO-A5 細胞にアデノウイルス (AxLacZ、AxMek^{CA}、AxRas^{DN}) を感染させた際の骨関連蛋白遺伝子の発現の変化を調べるために Real time RT-PCR 法をおこなったところ、AxMek^{CA}を作用させた際に OPN の著明な発現上昇が認められ、これが石灰化の変化に重要な働きをしていることが示唆された。

最後に生体における Erk の活性化、不活性化が骨組織石灰化に及ぼす影響を検討するために、1 日令マウスの頭蓋骨上に AxLacZ、AxMek^{CA}、AxRas^{DN}を投与し、投与 5 日後に頭蓋骨をアリザリンレッド染色に供した。AxLacZ 投与群と比較して、AxRas^{DN}投与群においては明らかな石灰化の亢進が、AxMek^{CA}投与マウスにおいては石灰化の抑制が認められた。

これらの MLO-A5 細胞や Runx2 を強制発現させた MC3T3-E1 細胞を使った実験により分化と石灰化が完全に切り離されたとはいえないが、現在においてはこれらの分化が最終段階へ進んだ細胞を使っての解析が、分化の作用を除外した石灰化の観察にもっとも適した方法だと考えられる。またアデノウイルスベクターを使用することにより、他の情報伝達系を介することなく Erk pathway のみを変化させることが可能となった。

Erk pathway は石灰化に対して抑制的に作用することが示されたが、OPN がその作用に関連していることが示唆された。これまでの報告も OPN は石灰化に対して抑制的に作用することが明らかにされているが、今後ノックアウトマウスやマイクロアレイなどを利用して、OPN 誘導と石灰化との関係を解析することが必要である。また骨芽細胞特異的なプロモーターを用いたトランスジェニックマウスの作成などを通じて、骨組織石灰化に対する Erk pathway に対する役割を *in vivo* で明らかにすることが重要である。