

審査の結果の要旨

氏名 河野 慎次郎

本研究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骨基質の石灰化が、Classical MAP kinase (MAPK) シグナル伝達系である **Erk pathway** によってどのように変化するか明らかにするため、インヒビターや増殖因子のみならず他の情報伝達系の影響を除外するためアデノウイルスベクターを使い、また分化の進んだ株細胞を使用して分化のプロセスと石灰化を切りはなして解析をおこなったものであり、下記の結果を得ている。

1. 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。**Mek** の特異的阻害剤である **PD98059** を **MLO-A5** 細胞に添加しアリザリンレッド染色を行うと、濃度依存性に **MLO-A5** 細胞の石灰化が促進していることが観察された。また **PDGF** 添加により **MLO-A5** 細胞内の **Erk** 活性が上昇していることが観察され、同時に **MLO-A5** 細胞の石灰化が濃度依存性に抑制されていることが確認された。ここで **MLO-A5** 細胞に **PD98059** を添加後に **PDGF** を添加すると、**PDGF** の石灰化抑制効果がほぼ完全にレスキューされたことより **PDGF** による **MLO-A5** 細胞の石灰化抑制作用は **Erk** 活性化を介することが示された。以上の結果より、**PD98059** は **MLO-A5** 細胞の石灰化を促進し、**PDGF** は **Erk pathway** を介して石灰化を抑制していることが示された。

2. **LacZ** 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (**AxLacZ**) を **MLO-A5** 細胞と **MC3T3-E1** 細胞に感染させると **AxLacZ** の **MOI** 増加に従って **MLO-A5** 細胞の **X-gal** 陽染像が認められ、アデノウイルスによって効率よく遺伝導入が可能なが示された。次に恒常活性型 **Mek1** (**Mek^{CA}**)、およびドミナントネガティブ型の **Ras** 変異体 (**Ras^{DN}**) 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。**AxMek^{CA}** 感染によって **Erk** 活性は上昇し、**AxRas^{DN}** 感染によって **Erk** 活性は抑制された。石灰化の程度をアリザリンレッド染色で検討したところ、コントロールである **AxLacZ** 感染細胞と比較して、**AxMek^{CA}** 感染細胞では石灰化が著明に抑制され、**AxRas^{DN}** 感染細胞では石灰化が促進していた。同様の石灰化に対する効果は初代培養マウス骨芽細胞や **MC3T3-E1** 細胞さらには **Runx2** 遺伝子を強制発現し分化を最終段階まで進めた **MC3T3-E1** 細胞においても認められた。またこれらのウイルス感染は **MLO-A5** 細胞の **viability** に影響しないことが **MTT** アッセイによって示された。以上よりアデノウイルスを使用した遺伝子導入においても、**Erk pathway** はこれらの細胞の石灰化に抑制的に作用することが示された。

3. 次に MLO-A5 細胞にアデノウイルス (AxLacZ、AxMek^{CA}、AxRas^{DN}) を感染させ、total RNA を抽出し、Real time RT-PCR 法をおこなった。MLO-A5 細胞においては AxMek^{CA} により ALP 発現はコントロールと比べ変化がなかったが、OCN 発現が軽度増加、OPN 発現は著しく増加、BSP 発現と Col I 発現では有意な変化がみられなかった。AxRas^{DN} を感染させたものでは、ALP 発現が軽度上昇し、OCN 発現は軽度低下、OPN 発現は著しく低下、BSP 発現と Col I 発現では有意な変化がみられなかった。以上より Erk pathway による石灰化に対する作用で OPN が重要な働きをすることが示唆された。
4. 1 日令マウスの頭蓋骨に AxLacZ を投与し、頭蓋骨を採取し X-gal 染色すると、頭蓋骨全体に一樣に X-gal 染色の濃染像が認められ、生体内の細胞においてもアデノウイルスによって効率よく遺伝子導入できることが示された。次に 1 日令マウスの頭蓋骨上に AxLacZ、AxMek^{CA}、AxRas^{DN} を投与し、頭蓋骨を採取しアリザリンレッド染色に供すると AxLacZ 投与群と比較して、AxRas^{DN} 投与群では明らかな石灰化の亢進が、AxMek^{CA} 投与群では石灰化の抑制が認められ、生体内においても Erk pathway が石灰化に抑制的に作用することが示された。

以上、本論文は骨組織石灰化において、Erk pathway が抑制的に作用することを明らかにした。本研究はこれまでの研究では明確でなかった分化の影響をできる限り排除した点と、Erk pathway 以外の作用を除外できた点において、骨組織石灰化の細胞内情報伝達系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。