

## 論文の内容の要旨

論文題目 骨芽細胞の分化ならびに老化における p57<sup>Kip2</sup>  
の役割に関する研究

指導教官 大内 尉義 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入(進)学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 臼井 貴彦

### 【目的】

骨粗鬆症とそれに伴う骨折は、高齢者が寝たきりとなる主要な原因であり、老人医療において重要な問題として知られている。骨粗鬆症の成因は幾つか想定されているが、以下の二つのモデルは特に重要と考えられる。

- 1) エストロゲン欠乏による骨吸収の上昇
- 2) 骨芽細胞老化による骨形成の低下

このような骨量減少は、骨吸収量に骨形成能が追いつかない非共役状態が原因と考えられている。この治療においては、積極的に骨形成を亢進させて骨量増加作用をおこすことが理想ではあるが、現在まで強力な骨形成促進薬は存在していない。*In vitro* で骨芽細胞の分化を誘導する物質は複数存在する。しかしながら、これらの臨床応用は実際には困難である。その大きな原因の一つとして、ホルモンやサイトカインをはじめとする、様々な増殖や分化の制御因子に対する骨芽細胞の反応性が、老化によって低下していることが考えられる。

高等動物細胞の細胞増殖において、細胞周期制御因子はホルモンやサイトカインといった液性因子による細胞外シグナルによって、厳密に制御されている。細胞周期を負に制御する因子としては、CDK (Cyclin-Dependent Kinase) 阻害因子が知られている。CDK 阻害因子

は、哺乳類細胞においては Ink4 ファミリー (p16<sup>Ink4a</sup>, p15<sup>Ink4b</sup>, p18<sup>Ink4c</sup>, p19<sup>Ink4d</sup>) と Cip/Kip ファミリー (p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>) の 2 つのファミリーが知られている。CDK 阻害因子は、細胞増殖時には、蛋白分解などを介した発現減少が誘導されることで細胞増殖を引き起こす。逆に増殖停止刺激に対してその発現が亢進し、細胞周期停止を誘導する。このように CDK 阻害因子は細胞増殖制御の **Key regulator** であることが明らかにされている。

CDK 阻害因子は細胞老化との関連も指摘されている。培養細胞の継代、すなわち細胞老化によっておこる細胞周期停止においては、p16<sup>Ink4a</sup> ならびに p21<sup>Cip1</sup> の発現上昇が重要であることが明らかにされている。

CDK 阻害因子は、細胞分化においても重要な役割をはたしている。p21<sup>Cip1</sup> および p27<sup>Kip1</sup> は筋細胞、神経細胞、造血細胞などの細胞種において、その分化の過程で発現誘導される。また、p57<sup>Kip2</sup> ノックアウトマウスは複数の臓器に発生異常がみられ、長管骨の軟骨内骨化の障害に伴う短肢となることが報告されている。この p57<sup>Kip2</sup> ノックアウトマウスの骨における表現系は、他の CDK 阻害因子には見られないものである。このことは、p57<sup>Kip2</sup> は、骨芽細胞の分化ならびに骨代謝において、他の CDK 阻害因子では代償されない役割を果している可能性を示唆する。しかし、骨芽細胞において、p57<sup>Kip2</sup> がどのような遺伝子に影響をもたらしているかに関しては、十分明らかにされていない。

骨芽細胞の機能の一つとして骨基質蛋白の分泌が挙げられる。骨芽細胞により分泌される代表的な骨機質蛋白には **Osteocalcin**, **Osteopontin** などがあり、これらは骨芽細胞の分化マーカーとしても知られる。ビタミン D は骨芽細胞の増殖・分化を促進するホルモンの一つであり、**Osteopontin** 遺伝子は、そのプロモーター領域にビタミン D 応答配列(VDRE)を有するビタミン D 一次応答遺伝子である。初代培養骨芽細胞において、加齢に伴うビタミン D 応答性の低下がヒトやラットで報告されているが、その分子機序は十分明らかにされていない。

申請者は、老化に伴う骨芽細胞の分化能の低下の分子機序の一つとして、CDK 阻害因子の関与を検証するため、骨芽細胞の細胞老化モデルの作成を試みた。また 7 種類の CDK 阻害因子の中で、特に p57<sup>Kip2</sup> に注目し、p57<sup>Kip2</sup> が **Osteopontin** 遺伝子のビタミン D 応答性に影響をあたえる可能性を検証した。

#### 【方法】

以下の方法で、ラット初代培養骨芽細胞を継代培養し、骨芽細胞の細胞老化モデルの系を作成した。ラット頭蓋骨より酵素消化により分離した、初代培養骨芽細胞を  $\beta$ -glycerophosphate 添加  $\alpha$ -MEM メディウムにて、3 日毎に 3 倍の表面積に継代培養した。細胞老化の誘導を検証するため、senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) 染

色を施行した。本系を用いて、継代により細胞老化を誘導した時の、7種類のCDK阻害因子の発現量を39日間、13 Passage に渡り、定量的RT-PCRにて測定した。

ラット骨芽細胞様株 UMR106 を用いた、p57<sup>Kip2</sup> 安定発現細胞株 (UMR106 p57<sup>Kip2</sup> 安定発現 cell line) を樹立した。本細胞株を用いたマイクロアレイにて、p57<sup>Kip2</sup> によって発現に影響を受ける遺伝子を網羅的に検索した。また、ヒト骨芽細胞様株 SaOS-2 を用いて、Tet-off システムを導入した p57<sup>Kip2</sup> 安定発現細胞株 (SaOS-2 Tet-Off p57<sup>Kip2</sup> 安定発現 cell line) を樹立した。本 cell line を用いて、p57<sup>Kip2</sup> による Osteopontin 遺伝子の発現制御を、定量的 RT-PCR により検証した。更に、ラット初代培養骨芽細胞の継代に伴う、p57<sup>Kip2</sup> ならびに Osteopontin の発現量の変化、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (活性型ビタミン D) 応答性の変化を検証した。

COS-7 細胞に、p57<sup>Kip2</sup> およびビタミン D レセプター(VDR) を共発現させた系を用いた免疫沈降法により、p57<sup>Kip2</sup> と VDR との結合を検証した。また、両分子のドメイン欠失変異体を共発現させた系にて、この 2 分子の結合に関与するドメインの同定を行った。

マウスゲノム DNA より VDRE (ビタミン D 応答配列) を含む Osteopontin プロモーター領域を PCR 法により合成した。これをルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入した、レポータープラスミド (マウス Osteopontin promoter luciferase レポータープラスミド) を作成した。SaOS-2 細胞において、本レポータープラスミド、VDR および p57<sup>Kip2</sup> を一過性共発現系させた系にて、ルシフェラーゼアッセイを施行し、VDR、p57<sup>Kip2</sup> および 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> が、Osteopontin 遺伝子のプロモーターの転写活性に及ぼす影響を解析した。また、SaOS-2 Tet-Off p57<sup>Kip2</sup> 安定発現 cell line を用いて、同様の解析を行った。

## 【結果】

継代培養されたラット初代培養骨芽細胞において、継代の進行に伴う SA-β-Gal 活性陽性細胞の増加を認めた。このことから、本系において細胞老化が誘導されていると考えられた。本系の第 13 Passage までの細胞において、定量的 RT-PCR 法により各種 CDK 阻害因子の発現量を検証したところ、継代の進行に伴う p16<sup>Ink4a</sup>、p21<sup>Cip1</sup> の発現量の増加、p57<sup>Kip2</sup> の発現量の減少を認めた。

UMR106 p57<sup>Kip2</sup> 安定発現 cell line による、ラットゲノムマイクロアレイにおいては、p57<sup>Kip2</sup> による正の発現制御を受ける分子の候補として、Osteopontin を含む 33 個の遺伝子を同定した。また、SaOS-2 Tet-Off p57<sup>Kip2</sup> 安定発現 cell line において、テトラサイクリン除去による p57<sup>Kip2</sup> の発現誘導に伴い、Osteopontin の mRNA レベルでの発現量の増加が誘導されることが示された。

ラット初代培養骨芽細胞において、p57<sup>Kip2</sup> の蛋白レベルの発現は、継代の進行に伴い減

少した。また、 $p57^{Kip2}$  の蛋白レベルの発現は、 $1,25(OH)_2D_3$  添加により増加を認めたが、この応答性も、継代の進行に伴い減少した。一方、Osteopontin 遺伝子の  $1,25(OH)_2D_3$  による mRNA レベルでの発現誘導も、継代の進行に伴い低下した。

COS-7 細胞での免疫沈降法により  $p57^{Kip2}$  と VDR の結合が確認された。この結合に関するドメインは、 $p57^{Kip2}$  の CDK 阻害ドメインと、VDR のリガンド結合ドメインであることが示唆された。

SaOS-2 細胞および SaOS-2 Tet-Off  $p57^{Kip2}$  安定発現 cell line を用いて、マウス Osteopontin promoter luciferase レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、 $p57^{Kip2}$  は VDR、 $1,25(OH)_2D_3$  とともに Osteopontin プロモーターの転写活性を増強することが示された。

#### 【結論】

$p57^{Kip2}$  は骨芽細胞の細胞老化に伴い、発現量が減少する。また、 $p57^{Kip2}$  は VDR と直接結合し、 $p57^{Kip2}$  は Osteopontin 遺伝子のビタミン D 応答性の発現を制御する。これらのことから、 $p57^{Kip2}$  の発現量減少が、老化に伴う骨芽細胞のビタミン D 応答性の低下の一因となる可能性が示唆される。