

審査の結果の要旨

氏名 白井貴彦

本研究は、高齢者の骨量減少の一因と考えられる、老化に伴う骨芽細胞のホルモン応答性の低下に、CDK(Cyclin Dependent Kinase)阻害因子の一つである $p57^{Kip2}$ が関与する可能性を検証するため、骨芽細胞の細胞老化モデルを用いて解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ラット初代培養骨芽細胞を3日毎に13 Passageまで継代培養した系を作成した。本系の初代培養骨芽細胞において、senescence-associated- β -galactosidase(SA- β -Gal)染色を行った結果、継代の進行に伴い SA- β -Gal 活性陽性細胞の割合の増加を認めた。これより、本系において、継代による骨芽細胞の細胞老化が誘導されていると考えられた。
2. ラット初代培養骨芽細胞の継代による細胞老化の系において、各 Passage の細胞における、 $p57^{Kip2}$ を含む CDK 阻害因子の発現量を、RT-PCR により検証したところ、継代の進行に伴う $p57^{Kip2}$ の発現量の減少を認めた。また、 $p57^{Kip2}$ は蛋白レベルにおいても継代の進行に伴い発現量の減少を認めた。
3. ラット骨芽細胞様株 UMR106 に $p57^{Kip2}$ を安定過剰発現させた cell line を用いたマイクロアレイ解析において、Osteopontin 遺伝子が $p57^{Kip2}$ により発現が上昇する遺伝子の一つとして同定された。また、ヒト骨芽細胞様株 SaOS-2 に Tet-off システムを導入して $p57^{Kip2}$ を安定過剰発現させた cell line においても、 $p57^{Kip2}$ による Osteopontin 遺伝子の正の発現制御が示された。更に、ラット初代培養骨芽細胞の継代による細胞老化の系において、継代の進行に伴い Osteopontin 遺伝子の $1,25(OH)_2D_3$ 応答性が mRNA レベルで低下することが示された。
4. 培養細胞における免疫沈降法により、 $p57^{Kip2}$ とビタミン D レセプター(VDR) が培養細胞内で結合することが示された。また、この結合に関与するドメインは、

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。

5. SaOS-2 細胞 および Tet-off システムを導入した SaOS-2 p57^{Kip2} 安定発現 cell line における, マウス Osteopontin promotor 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 および 1,25(OH)₂D₃ と共に Osteopontin promotor の転写活性を増強することが示された。

以上, 本論文は p57^{Kip2} は骨芽細胞の細胞老化に伴い, その発現が減少すること, ならびに p57^{Kip2} が, 骨芽細胞の細胞老化の過程において, Osteopontin 遺伝子のビタミン D 応答性を修飾する可能性を示した。p57^{Kip2} による, ビタミン D 応答遺伝子の発現調節はこれまで報告されておらず, また本結果は, 加齢に伴う骨芽細胞のホルモン応答性の低下を説明する, 新たな分子機序を提案しており, 学位の授与に値するものと考えられる。