

【別紙 1】

論文の内容の要旨

論文題目

破骨細胞におけるアポトーシス促進分子Bimの発現調節機構に関する研究

指導教官 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 分山 秀敏

正常な骨組織の発達ならびに維持は恒常的な骨形成・吸収バランスの調節により行われている。骨形成は軟骨細胞や骨芽細胞による内軟骨性骨化や膜性骨化によって行われ、骨吸収は破骨細胞が中心的な役割を果たすことが知られている。成長を終えた後の骨組織の新陳代謝の過程は「骨リモデリング」と呼ばれるが、リモデリングサイクルの開始を規定するのは破骨細胞による骨吸収であり、多くの骨代謝疾患が破骨細胞の形成や機能の異常を原因としていることが知られている。骨吸収の異常によって骨組織機能の破綻した例を挙げるならば、骨粗鬆症や関節リウマチ、あるいは悪性腫瘍の骨転移などが挙げられる。これらは相対的な骨吸収亢進によって病的な状態に陥った例であり、骨組織の脆弱性、骨破壊をきたす。一方骨吸収が低下したためにやはり病的な状態に陥った例として大理石病が挙げられる。

骨吸収量を総合的に規定しているのは破骨細胞の分化・活性化・アポトーシスの3つの要素である。破骨細胞は最終分化した細胞であり、分化後、生存因子や骨芽細胞などの支持細胞が存在しない状態では速やかにアポトーシスを起こして細胞死に陥り生体内から除去される。

破骨細胞のアポトーシスメカニズムの詳細は明らかになっていないが、Bcl-2ファミリーに属するアポトーシス誘導因子 Bim が重要な役割を果たすことが明らかになっている。Bim は BH (Bcl-2 homology) 3-only family に属するアポトーシス促進作用を持つタンパクであり、ミトコンドリアを経由するアポトーシス経路を調節している。Bim はミトコンドリアに局在し、Bim と他の Bcl-2 family タンパクの相互作用により最終的に effector caspases である、Caspase-3 や Caspase-7 を活性化し、アポトーシスに至る。これまでに遺伝子欠損マウスを用いた実験により、Bim は T 細胞、B 細胞、骨髄細胞、神経細胞のアポトーシスに不可欠であることが報告されている。また破骨細胞においても、*bim* 遺伝子欠損細胞は野生型と比較して長い生存期間を持つ一方で、骨吸収能はむしろ低下していたことから、Bim は破骨細胞の生存能と活性化の双方に必須の調節因子であることが明らかになっている。

Bim の発現は転写レベルと転写後レベルの双方で調節を受けている。Bim の調節機構については、様々の報告がなされているが、破骨細胞においては転写レベルの調節ではなく、ユビキチン-プロテアソーム系を介した調節を受けていることが既に明らかにされている。本研究は Bim の転写後調節の更なる詳細な解析をすることを目的とした。

まず、Bim の強制発現を行うための細胞として、Bim と拮抗した働きを持つ

Bcl-2 の発現を、doxycycline の投与によって調節可能なマウス線維芽細胞株 (MEF/Bcl-2 cell-line) を樹立した。この細胞において、強制発現された Bim は Bcl-2 の発現低下およびそれに引きつづいて起こる caspase の活性化・アポトーシスに伴って発現が急速に低下することがわかった。Bim の mRNA 量は変化していないことより、この現象は転写後の調節 (degradation) であると考えられた。また、この degradation は、カスパーゼインヒビターならびにプロテアソームインヒビターにより抑制をうけた。このことより、MEF/Bcl-2 cell における Bim の degradation はカスパーゼ、ユビキチン-プロテアソーム系によって調節をうけていると考えられた。次に、sh(small hairpin) RNA を用いた遺伝子ノックダウンを caspase-3, caspase-7 について行った。Sh/caspase-3 を導入した MEF/Bcl-2 cell においては Bim の degradation は抑制をうけた。しかしながら、sh/caspase-7 導入群では抑制を受けなかった。このことより、caspase-3 が Bim の degradation に重要な役割を果たしていると考えられた。また次に、MEF/Bcl-2 細胞に UV を照射することでアポトーシスを誘導したところ、Bcl-2 の発現量は変化しないものの、Bim は Bcl-2 との結合を弱め、Bax との結合を強めることで caspase-3 の活性化を生じ、やはり Bim の degradation が見られた。このことは caspase が Bim の degradation に重要な役割を果たしていることを更に強く示唆する結果であった。

次に、破骨細胞において同様な Bim の調節機構が見られるかを解析した。成熟破骨細胞では、生存因子を除去することで 12 時間後に急速な Bim の上昇が観察されるが、同時に caspase-3 の活性化が生じ、生存因子除去後 24 時間では再び Bim の発現レベルは急速に減少することがわかった。また、これはカスパーゼインヒビター並びにプロテアソームインヒビターにより抑制された。次に

shRNA を用いて、caspase-3,caspase-7 の遺伝子ノックダウンを破骨細胞前駆細胞に行ったのちに破骨細胞に分化誘導することで実験をおこなった。Sh/caspase-3 を導入した破骨細胞においては、casapse-7 の活性化はみられるものの caspase-3 の活性化はほとんど見られず、Bim の degradation は抑制をうけた。Sh/caspase-7 導入群では抑制されなかった。以上の結果より、破骨細胞においても Bim の degradation は観察され、caspase-3 が重要な役割を果たしていることがわかった。

以上の結果をふまえ、Caspase-3 欠損破骨細胞について解析をおこなった。Bim の degradation は Caspase-3 欠損破骨細胞において抑制されていることがわかった。

次にこのような Bim の調節機構が破骨細胞の生存と活性に与える影響を見るために実験をおこなった。Sh/caspase-3 を導入した破骨細胞、並びに caspase-3 欠損細胞のいずれも、コントロール群と比較して生存能はむしろ低下し、骨吸収活性はむしろ上昇していた。また、Caspase-3 欠損マウスは、野生型に比べて in-vivo においても破骨細胞数の減少を来していた。

Caspase-3 が Bim の degradation を誘導するメカニズムを解析するために、リコンビナントタンパクを用いて in-vitro の活性を調べたところ、caspase-3 は Bim を直接 degrade する作用は持たなかった。Bim のプロテアソーム系を介した degradation には c-Cbl が関与していることが既に報告されているが、sh/caspase-3 導入破骨細胞および caspase-3 欠損破骨細胞のいずれでも、Bim と c-Cbl の結合性はコントロール群に比べて抑制されていた。このことより、caspase-3 は Bim と c-Cbl の結合を調節することで、Bim の degradation を調節していることが考えられたが、正確なメカニズムについては未知であり、今後も解析を続けていく予定である。

以上の結果から、Bim の下流に位置しアポトーシスを実行する分子である Caspase-3 が Bim の degradation を促進するという、全く新しい negative-feedback 機構の存在が明らかになった。