

【別紙 2】

審査の結果の要旨

氏名 分山秀敏

本研究は、破骨細胞のアポトーシスおよび骨吸収活性において重要な役割を担っていると考えられている、Bcl-2 family に属するアポトーシス促進分子である Bim の発現調節機構について詳細な解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. Bim と結合し、アポトーシス抑制作用をもつ Bcl-2 を恒常的に発現し、なおかつ Tet-off system を用いて、doxycycline を添加することで Bcl-2 の発現を抑制することが可能なマウス線維芽細胞株 (MEF/Bcl-2 cells) を樹立し実験をおこなった。Bim を強制発現した MEF/Bcl-2 細胞では doxycycline の添加により、Bcl-2 の発現低下に続き caspase-3 および caspase-7 の活性化が起こり、それに伴い Bim の発現レベルも低下した。Bim の mRNA レベルは変化しておらず、また proteasome-inhibitor および caspase inhibitor によりこの Bim の degradation は抑制をうけた。以上のことより、MEF/Bcl-2 細胞において Bim は caspase 依存性に蛋白レベルで degrade をうけていることが示された。
2. MEF/Bcl-2 細胞における Bim の degradation に与える caspase-3/7 の影響をさらに詳細に解析するために、shRNA (small hairpin RNA) をもちいた遺伝子ノックダウンを行った。Caspase-3 の shRNA を導入した MEF/Bcl-2 細胞では、doxycycline 添加による Bim の degradation が著明に抑制を受けた。しかしながら、Caspase-7 の shRNA を導入した細胞では Bim の degradation の抑制は見られなかった。以上の結果から、MEF/Bcl-2 細胞における Bim の degradation には caspase-3 が促進的に働くことが示された。
3. 次にマウス破骨細胞で実験をおこなった。成熟破骨細胞においては生存因子の除去後約 12 時間で Bim の発現上昇がみられるが、同時に Caspase-3 の活性化が観察され、それに伴い Bim の degradation がみられた。これは proteasome-inhibitor ならびに caspase inhibitor により抑制をうけた。ShRNA をもちいて、caspase-3 および caspase-7 の遺伝子ノックダウンを行ったところ、caspase-3 の発現抑制によって Bim の degradation は抑制された。Caspase-7 の

発現抑制では Bim の degradation は抑制されなかった。以上をふまえ caspase-3 欠損マウスの骨髄細胞より分化誘導した破骨細胞においても同様の解析を行ったところ、野生型とくらべ、Bim の degradation は著明に抑制されていた。これらの結果より、破骨細胞においても Bim のアポトーシスにおける degradation はみられ、caspase-3 が促進的に働いていることが示された。

4. Caspase-3 が Bim の degradation に促進的に働くメカニズムを明らかにするために、まずリコンビナントタンパク同士を作用させたところ、caspase-3 には Bim を直接 degrade させる作用はなかった。Bim のプロテアソーム系を介した degradation に関与することが既に分かっている分子 c-Cbl と Bim との結合を解析したところ shRNA/caspase-3 導入破骨細胞および caspase-3 欠損破骨細胞のいずれにおいてもコントロールと比較して Bim と c-Cbl の結合能は低下していた。以上の結果より、Caspase-3 は Bim と c-Cbl の結合を調節することで Bim の degradation に促進的に働いていることが示された。
5. Bim-caspase-3 という系が破骨細胞の生存と活性に及ぼす影響を観察した。ShRNA/caspase-3 導入破骨細胞、および caspase-3 欠損破骨細胞のいずれにおいても、コントロール群と比べて、生存はむしろ低下していた。また骨吸収能はむしろ亢進していた。Caspase-3 欠損群では caspase-7 の活性化はコントロールと比べて同等もしくは亢進しており、Bim の degradation の抑制すなわち発現上昇が、caspase-7 を介したアポトーシスの亢進につながり、Bim の発現上昇が骨吸収能の活性化につながったものと考えられた。また Caspase-3 欠損マウスは in-vivo においても破骨細胞数の減少を来していた。以上の結果より、Bim-caspase-3 という軸が破骨細胞の生存と活性にも重要な役割をはたしていることが示された。

以上、本論文は、破骨細胞の生存と活性に重要な役割を持つ Bim が、そのアポトーシス活性の下流分子である Caspase-3 によって degradation を受け、発現をむしろ negative に調節されているという全く新しい調節機構の存在を明らかにした。破骨細胞の生存および活性の調節機構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。