

審査の結果の要旨

氏名 岩 澤 三 康

本研究は、Bcl-2 ファミリー分子に属する抗アポトーシス分子 Bcl-xL が破骨細胞の生存、機能および分化に対して果たしている役割を明らかにすることを目的とした。In vivo では破骨細胞特異的 *bcl-x* 遺伝子ノックアウトマウスを作出し、in vitro ではアデノウイルスやレトロウイルスを導入する系を用いて破骨細胞の生存・機能・分化それぞれの段階における Bcl-xL の役割を詳細に解析することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス幼弱破骨細胞に Bcl-xL アデノウイルスを導入することで、Bcl-xL 強制発現破骨細胞を作出した。抗アポトーシス分子 Bcl-xL によって破骨細胞生存は延長する（すなわちアポトーシスが抑制される）ことが、生存率と活性型 caspase 3 の蛋白発現によって示された。また、Bcl-xL 強制発現破骨細胞は生存延長するにも関わらず、pit formation assay により骨吸収機能の低下が示された。
2. cre-loxP recombination system を用いて *bcl-x flox* マウス幼弱破骨細胞に cre recombinase アデノウイルスを導入することで Bcl-xL ノックアウト破骨細胞を作出した。強制発現系同様の評価手法により、Bcl-xL ノックアウト破骨細胞ではアポトーシスが亢進した。これより非常にアポトーシスに陥りやすい破骨細胞においても、Bcl-xL は抗アポトーシス分子としてその生存に寄与していることが示された。生存能が低下する一方で、骨吸収機能は亢進していることが示された。
3. Bcl-xL が骨吸収活性に関与する経路を解明することを目的とした。骨吸収機能を反映するリン酸化 c-Src は Bcl-xL ノックアウト破骨細胞で亢進し、Bcl-xL 強制発現破骨細胞では低下した。c-Src 活性化においては、RGD 配列を有する蛋白をリガンドとするインテグリン経路が重要である。この経路を解析すると、インテグリン自体の発現は差がないが、代表的な RGD 配列を有する蛋白である fibronectin と vitronectin が、real time PCR によって Bcl-xL ノックアウト破骨細胞で亢進し、Bcl-xL 強制発現破骨細胞では低下していることが示された。これらの結果は、破骨細胞自身による RGD 配列を有する蛋白の発現調節が骨吸収機能に関与している可能性を示唆した。
4. cathepsin K – cre ノックインマウスと *bcl-x flox* マウスを交配して破骨細胞特異的 *bcl-x* 遺伝子ノックアウト(*bcl-x cKO*)マウスを作出した。cKO マウスをコントロールマウスと比べると生後早期は差を見ないが、生後 8 週から放射線学のおよび組織学的に骨量の減少傾向を認め、生後 1 年に至って著明な骨量減少を呈した。骨形態計測の結果では、cKO マウスにおいて骨形成に差はなく、骨吸収活性の亢進が認められた。血清中の骨吸収マーカー CTx-I は cKO マウスで増加しており骨吸収能亢進が示された。これらの結果から cKO マウスは骨吸収能亢進によって骨量減少の表現型を呈することが示

5. RNAi の手法を用い、レトロウイルスを破骨細胞前駆細胞に導入することによって Bcl-xL 発現抑制を行い、破骨細胞分化に対する Bcl-xL の役割を検討した。前駆細胞の proliferation は差がなかったが、differentiation では、破骨細胞分化のマスターレギュレーターである NFATc1 が Bcl-xL 発現抑制前駆細胞で亢進し、Bcl-xL 強制発現前駆細胞で低下した。また、Bcl-xL 発現抑制群ではより早期に数多く破骨細胞が形成される一方、Bcl-xL 強制発現群では破骨細胞形成が遅延した。これらの結果より、Bcl-xL は破骨細胞分化において抑制的に作用することが示された。

以上、本論文は抗アポトーシス分子 Bcl-xL が破骨細胞生存について促進的に作用するだけでなく、破骨細胞の骨吸収機能と分化においては抑制的に作用することを、in vitro では強制発現と発現抑制の両方を行うことで、また in vivo では破骨細胞特異的遺伝子欠損マウスを作出することで明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、破骨細胞の生存・機能・分化を制御する細胞内シグナルの解明、およびアポトーシス関連分子として知られる Bcl-xL が果たすアポトーシス以外の細胞内メカニズム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。