

## 審査の結果の要旨

氏名 永瀬 雄一

本研究は、抗アポトーシス分子 *Bcl-2* の骨代謝調節における生理的な役割を解明し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、*Bcl-2* 遺伝子欠損マウスの解析を行い、さらに *in vitro* においてその機能の解析を試みた。また、*Bcl-2* 遺伝子欠損マウスは腎不全症により 6 週以内に死亡してしまうため、アポトーシス促進分子 *Bim* の片側アレルを欠損させた *Bcl-2* 遺伝子欠損マウスを作製し、同腹の *Bcl-2*, *Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスと比較検討し、成体マウスの骨組織における *Bcl-2* の役割も検討し、下記の結果を得ている。

1. X線撮影と組織学的検討により、3 週令の *Bcl-2* 遺伝子欠損マウスは同胞野生型と比較して低身長を呈し、一次海綿骨梁が増加していた。この表現型は形態計測の結果から骨形成の増加ではなく破骨細胞数の減少とその機能不全によるものと考えられた。
2. *Bcl-2* 遺伝子欠損マウスの骨組織学的異常をさらに検証するために *ex vivo* で、*Bcl-2* 遺伝子欠損破骨細胞を分化、活性化ならびに生存の面から解析した。*Bcl-2* 遺伝子欠損破骨細胞前駆細胞は、receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) で刺激すると、破骨細胞最終分化で発現する nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 の発現が野生型破骨細胞と比較して低下しており、分化が遅延していた。また、*Bcl-2* 欠損破骨細胞は野生型破骨細胞と比較して骨吸収能が低下していた。象牙切片上でのアクチンリング形成をみると *Bcl-2* 欠損破骨細胞はアクチンリング形成が障害されていた。したがって、*Bcl-2* は破骨細胞の細胞骨格に関与して骨吸収を制御している可能性が示唆された。*Bcl-2* 欠損破骨細胞は生存能が低下し、アポトーシスが亢進していた。これらのことから、*Bcl-2* は破骨細胞分化、活性化、生存能を促進させていることが示された。
3. 次に、*Bcl-2* 遺伝子欠損マウスにおける骨形成異常の機構を検討した。*Bcl-2* 遺伝子欠損マウスの *ex vivo* の解析により、*Bcl-2* 欠損骨芽細胞は後期分化、石灰化が障害されていた。また、骨芽細胞のアポトーシスについて TUNEL 染色で検討すると *in vitro*, *in vivo* の両者においてアポトーシスが亢進していた。以上の結果より、*Bcl-2* は骨芽細胞の後期分化、生存、石灰化に必須であると考えられた。
4. *Bcl-2* 遺伝子欠損マウスは腎不全症により生後 6 週以内に死亡してしまうため、成体マウスでの骨組織における生理的な *Bcl-2* の役割を解析することは困難であった。従って、我々は *Bim* 片側アレルを欠損させた *Bcl-2* 遺伝子欠損マウスを作製し、同腹の *Bcl-2*, *Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスと比較検討することとした。破骨細胞と骨芽細胞において *Bim* 片側アレルを欠損させた影響を解析すると、*Bcl-2* 欠損破骨細胞でみられた骨吸収能や生存能の低下は、*Bim* 片側アレルを欠損させることによってほとんど回復した。対照的に *Bcl-2* 欠損骨芽細胞でみられた分化、石灰化障害は、*Bim* 片側アレルを欠損させても改善しなかった。これらの結果により、*Bcl-2* は骨芽細胞機能に必須である一

方、*Bim* 以外の他のアポトーシス促進分子が骨芽細胞機能に関与している可能性が示唆された。

5. 骨芽細胞機能において *Bcl-2* が重要であることを確認した後に、野生型初代骨芽細胞において、PTH 1 回投与が *Bcl-2* の発現に影響を与えるか検討すると、*Bcl-2* の発現は上昇した。次に間欠的 PTH 投与が *Bcl-2* 遺伝子欠損 *Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスと同腹の *Bcl-2, Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスの骨形成に与える影響を検討した。4 週間の間欠的 PTH 投与によって、コントロールである *Bcl-2, Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスの骨量は著明に増加したが、*Bcl-2* 遺伝子欠損 *Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスは骨量が増加しなかった。さらに間欠的 PTH 投与により、骨吸収マーカーである血清 CTx は *Bcl-2, Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスと *Bcl-2* 遺伝子欠損 *Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスの間で有意差がなかったが、骨形成マーカーである血清オステオカルシンは *Bcl-2, Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスで増加したが、*Bcl-2* 遺伝子欠損 *Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスでは増加しなかった。これらの結果より *Bcl-2* 遺伝子欠損 *Bim* ヘテロ遺伝子欠損マウスにおいて PTH 骨形成作用がなかったのは、*Bcl-2* 遺伝子欠損 *Bim* ヘテロ遺伝子欠損した破骨細胞の異常ではなく、その骨芽細胞の分化、石灰化障害によるものと考えられ、*Bcl-2* の骨形成作用における重要性が示された。

以上より抗アポトーシス分子 *Bcl-2* は、骨芽細胞、破骨細胞の分化、活性化、生存を促進させ、骨代謝において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、破骨細胞の生存、機能に関しては *Bcl-2 / Bim* バランスが重要であること、*Bcl-2* は骨芽細胞機能に必須である一方、*Bim* 以外の他のアポトーシス促進分子が骨芽細胞機能に関与している可能性があることがわかった。さらに *Bcl-2* は成体マウスにおいて骨量を維持するのに重要であり、PTH の骨同化作用に必須であることが示された。

以上本論文は、骨代謝系における *Bcl-2* のを生理的な役割をさまざまな側面から解析し、明らかにした。これは骨代謝調節における多様な分子ネットワークの解明に貢献するものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。