

論文の内容の要旨

論文題目 Akt1 による軟骨代謝調節機構

指導教員 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 深井 厚

【要旨】

高齢社会の急速な進行の中、高齢者が要支援、要介護状態に陥る原因の中で、関節疾患が原因疾患の上位に位置されており、介護予防の上からも関節疾患、特に変形性関節症を始めとした加齢性軟骨変性に伴う運動器疾患の予防・治療法の開発・確立が社会的急務となっている。

ほとんどの生理的な骨格成長は軟骨内骨化により獲得され、変形性関節症などの病的軟骨代謝障害においても軟骨内骨化の関与が指摘されている。軟骨細胞が増殖して、成熟した肥大した細胞に分化したあと、細胞は周囲のマトリックスを石灰化して、血管を誘導する。そして、軟骨が骨に置き換わる。

無機ピロリン酸は、カルシウムで結晶するリン酸イオンの働きに拮抗し抑えることによって、軟骨細胞石灰化の調節機構の上で、重要な役割を演じます。細胞外ピロリン酸の蓄積は、細胞外チャネリングのための transmembrane protein progressive ankylosis (ANK)、ヌクレオシド三リン酸から生成されるヌクレオチドピロホスファターゼホスホジエステラーゼ 1 (NPP1) と加水分解のための組織非特異性のアルカリホスファターゼ (TNAP) らによって制御される。

重要な骨・軟骨代謝調節因子として知られてインスリン/IGF-I は軟骨内骨化骨化に関与しており、その下流分子であるセリントレオニンプロテインキナーゼ Akt は、シグナル伝達に重要である。Akt は細胞の生存、増殖、糖代謝などにおいて重要な役割を果たしている。3つの Akt アイソフォーム、Akt1、Akt2 と Akt3 の中で、軟骨細胞では Akt1 が最も優位に発現している。Akt1 ホモノックアウトマウスは成長障害を呈することが報告されている。当教室の研究で、以前 Akt1 ホモノックアウトマウスの骨組織を解析したところ、骨形成・骨吸収双方の抑制による低回転型の骨粗鬆症を呈し、Akt1 は、骨芽細胞において

FoxO3a/Bim 経路の抑制による生存促進、Runx2 転写誘導による分化促進、RANKL 発現による破骨細胞分化支持、そして破骨細胞において分化・生存促進に働くことにより、骨量・骨代謝回転を維持していることを示した。

今回の研究の目的は、Akt の軟骨代謝調節における生理的および病的条件下での役割を解析し、その分子メカニズムを解明することである。

まず軟骨細胞における Akt1 の発現、機能を確認、Akt1 ホモノックアウトマウス (Akt1^{-/-}) の骨格系に関する表現型、組織学的特徴を検討した。また実験的マウス変形性膝関節症モデルを作出することにより、Akt1 の変形性関節症への関与を検討した。そして、*in vitro* の実験により、軟骨内骨化過程の中での Akt1 の機能を調べるため、Akt1 ホモノックアウトマウスと同胞野生型マウスの新生仔から採取した肋軟骨由来軟骨細胞の *ex vivo* の細胞培養系と、マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 の細胞培養系を用いた解析により検討し、Akt1 による軟骨代謝調節機構の解明を試みた。その結果、Akt1^{-/-}マウスの解析を行うと同胞野生型マウスに比べて骨格の成長障害が見られた。Akt1^{-/-}の成長板では BrdU 取込みにみられる増殖層および type 10 collagen (COL10) 免疫染色にみられる肥大層は正常であったが von Kossa 染色にみられる石灰化軟骨層が減少していた。また成マウス膝関節に実験的マウス変形性膝関節症モデルを作成すると、Akt1^{-/-}マウスでは関節軟骨変性は野生型マウスと同様に起こったが、骨棘形成は抑制されていた。また関節軟骨における COL10 発現には差がなく、関節辺縁における VEGF の発現は抑制されていた。Akt1^{-/-}肋軟骨細胞培養系では細胞増殖能、Alcian blue 染色の染色性、COL10 発現は野生型マウス細胞と差がなかったが、石灰化能の指標 (von Kossa・Alizarin red 染色、VEGF、osteopontin 発現) は抑制されていた。マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 に恒常活性型 (ca-) Akt1 を導入して過剰発現させても si-Akt1 を導入して発現抑制しても、Alcian blue 染色の染色性や COL10 の発現はかわらず、また ca-Akt1 やドミナントネガティブ型 Akt1 を導入しても転写活性は変わらなかったが、上記石灰化の指標は全て ca-Akt1 導入により促進され、si-Akt1 導入により抑制された。最後に Akt1 による石灰化制御の分子背景を検討した。石灰化抑制因子であるピロリン酸調節分子の内、ピロリン酸を誘導する ANK・NPP1 の発現が、ATDC5 細胞において ca-Akt1 導入により抑制され、si-Akt1 導入および Akt1^{-/-}細胞で促進された。

以上より、Akt1 シグナルは、軟骨細胞においては細胞増殖能、基質産生、肥大分化には影響しないが、石灰化抑制因子であるピロリン酸産生分子 ANK および NPP1 の発現を抑制する働きにより軟骨石灰化を促進し、生理的な骨格成長や変形性関節症における骨棘形成に関与していることが示された。