

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 松本 卓巳

本研究は骨粗鬆症の治療の第一線で使用されている窒素含有型ビスフォスフォネートの生体内作用機序を明らかにするため、*in vitro* の系でリセドロネートが破骨細胞に及ぼすシグナル修飾の解明を試み、また遺伝子改変マウスへのリセドロネート投与を行って *in vivo* の系での作用効果の解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. *in vitro* においてマウス骨髄細胞とマウス初代骨芽細胞との共存培養によって得られた破骨細胞に対しリセドロネート投与実験を行った。リセドロネートは破骨細胞にミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導し、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスを制御する Bcl-2 family タンパクのうち、Bim の発現が増加した。Bim ノックアウト破骨細胞へのリセドロネート投与では、アポトーシス誘導は抑制されるが、骨吸収活性の低下は抑制されなかった。リセドロネートがアポトーシス誘導とは独立して骨吸収抑制効果を持つことが示唆された。
2. Bim ノックアウトマウス（以下 Bim KO マウス）へのリセドロネート生体投与実験を行った。X 線撮影、骨密度測定により野生型マウス（以下 WT マウス）および Bim KO マウスの両方でリセドロネート投与により明らかな骨量増加が認められた。骨吸収マーカーである血清中の CTx-I は WT マウスおよび Bim KO マウスの両方で有意に減少していた。組織学的な検討では、Bim KO マウスでは破骨細胞のアポトーシスが有意に抑制されていた。リセドロネート投与により破骨細胞数は WT マウスでは約 1.5 倍に増加した。Bim KO マウスではリセドロネート非投与群間において破骨細胞数は WT マウスの約 1.5 倍に増加しており、リセドロネート投与による破骨細胞数の変化はみられなかった。これらの結果より、リセドロネートは破骨細胞のアポトーシスには依存せずに骨量増加作用を持つことが示唆された。
3. *in vitro* の系にて、リセドロネートによって修飾される生存および骨吸収活性を制御するシグナル経路の同定を試みた。リセドロネート投与により Erk および Akt の活性は経時的および濃度依存的に減少した。Erk の活性は 3  $\mu\text{M}$  以上のリセドロネート濃度で有意に低下した。Akt の活性は 0.03  $\mu\text{M}$  以上のリセドロネート濃度で有意に低下した。恒常

活性型 MEK1 (CA-MEK1) および恒常活性型 Akt1 (CA-Akt1) をアデノウイルスにより導入した破骨細胞を用いて、リセドロネートの生存能および骨吸収活性への影響を評価した。リセドロネートによるアポトーシスは CA-Akt1 導入破骨細胞では部分的に、CA-MEK1 導入破骨細胞では完全にレスキューされた。この結果はリセドロネート投与によるアポトーシス誘導が主に MEK/Erk 経路を介していることを示唆した。一方で、リセドロネート投与による骨吸収抑制は CA-MEK1 導入破骨細胞ではレスキューされず、CA-Akt1 導入破骨細胞では完全にレスキューされた。骨基質上で骨吸収を行なっている破骨細胞が形成する *sealing zone* の形成を比較すると、リセドロネート投与によりその形成率は有意に低下するが、CA-MEK1 導入破骨細胞ではレスキューされず、CA-Akt1 導入群では完全にレスキューされた。これらの結果はリセドロネート投与による骨吸収抑制効果が Akt 活性阻害による *sealing zone* の破断を介していることを示唆した。

4. リセドロネートの濃度依存的なアポトーシス誘導能、骨吸収抑制効果を評価したところ、破骨細胞のアポトーシス誘導には 3  $\mu\text{M}$  以上、骨吸収抑制には 0.03  $\mu\text{M}$  以上のリセドロネート濃度を要することがわかった。これらの結果は、Erk の活性、Akt の活性の濃度依存的な低下と一致しており、低濃度リセドロネートの暴露では骨吸収抑制がアポトーシス誘導とは独立して生じることを示唆した。
5. Akt による *sealing zone* 形成制御のメカニズムの解明を行った。リセドロネート投与によってアクチン骨格の破断と同時に微小管構造も破壊された。Akt の活性低下に伴ってアセチル化チューブリンの発現が低下し、CA-Akt1 の導入によりアセチル化チューブリンが増加した。これらは Akt が微小管の安定化に関与することでアクチン骨格を制御している可能性を示唆した。CA-Akt1 導入破骨細胞では、微小管の安定化に関わる微小管のプラス末端集積因子のなかで APC および EB1 の微小管結合が増加していた。APC は GSK-3 $\beta$  によるリン酸化を受けることによって微小管結合能を失うことが知られている。GSK-3 $\beta$  の阻害剤である LiCl によって破骨細胞のアセチル化チューブリンが増加し、また Akt1&Akt2 ダブルノックアウト破骨細胞でみられる骨吸収能の低下、*sealing zone* 形成の低下が LiCl の添加によって回復した。以上の結果より Akt が GSK-3 $\beta$  を介して微小管結合蛋白の微小管への結合を制御することで微小管の安定化に寄与し、*sealing zone* の形成および骨吸収に関与する可能性が示唆された。

以上、本論文はリセドロネートによって修飾されるアポトーシス誘導経路および骨吸収抑制経路が独立して存在すること、生体内ではリセドロネートによる骨量増加作用機序は骨吸収活性の抑制であること、Akt 経路が破骨細胞の微小管骨格を制御することで骨吸収に関与すること、を明らかにした。本研究によって得られた知見は、新たなビスフォスフォネート薬の開発や、新たな機序を持つ骨吸収抑制薬の創薬に繋がると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。