

## 審査結果の要旨

増田 裕也

本研究は Bcl-2 ファミリー蛋白の一つである Mcl-1 の、破骨細胞内での働きを明らかにするため、wild type マウスより作成した破骨細胞内の Mcl-1 の動態の解析、遺伝子導入法を利用した Mcl-1 over-expression, knockdown 破骨細胞の解析、Mcl-1 flox マウスをより作成した Mcl-1 knockout 破骨細胞の解析を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1 破骨細胞分化段階において Mcl-1 の mRNA 発現量を定量したところ、各分化段階においての Mcl-1 mRNA 発現量に明らかな変化は見られず、分化段階を通してほぼ一定であった。

2 成熟破骨細胞内の蛋白発現量を経時的に採取し、western blotting にて評価したところ、Mcl-1 は他の Bcl-2 ファミリー蛋白と比較して圧倒的に早い代謝を受けていることが明らかとなった。RNA 合成阻害薬であるアクチノマイシン D を添加し同様に評価を行ったところ、アポトーシスが起きていることを示す cleaved caspase 3 の発現のタイミングと相関を示しているのは Mcl-1 の発現低下のみであった。これは破骨細胞のアポトーシスにおいて Mcl-1 が非常に重要な働きを担っていることを強く示唆するものである。

3 破骨細胞の生存シグナルである M-CSF 刺激は PI3K/Akt 経路と Ras/Raf/MEK/Erk 経路の 2 つの経路より制御されていることが明らかとなっている。アデノウイルスを用いたそれぞれの経路活性化による Mcl-1 発現量を評価したところ、Ras/Raf/MEK/Erk 経路の活性化に相関して Mcl-1 発現量は増加していたが、PI3K/Akt 経路の活性化では Mcl-1 発現量に変化は見られず、破骨細胞 Mcl-1 制御には Ras/Raf/MEK/Erk 経路が主に働いていることが明らかとなった。

4 成熟破骨細胞に様々なサイトカイン刺激を加えた際の Mcl-1 発現を評価したところ RANKL, M-CSF の刺激下だけでなく、TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  といったいわゆる炎症性サイトカインの刺激下においても Mcl-1 の発現は亢進していた。これは炎症性疾患の骨病変における Mcl-1 の関与を示唆するものであった。

5 成熟破骨細胞にプロテアソーム阻害剤である MG132 を添加し Mcl-1 の代謝を評価したところ、MG132 を添加した破骨細胞では Mcl-1 の代謝は抑制されていた。また、このようにプロテアソーム阻害剤を添加した破骨細胞内の蛋白を用いて Mcl-1 との免疫沈降法を行ったところ、Mcl-1 のユビキチン修飾が観察された。このことで破骨細胞内の Mcl-1 はユビキチン・プロテアソーム系によって早い代謝が行われていることが示された。

6 遺伝子導入法を用いて破骨細胞にて Mcl-1 over-expression, Mcl-1 knockdown を行い、細胞分化能・細胞骨格形成・細胞生存能・骨吸収能について評価を行った。Mcl-1

over-expression を行った破骨細胞は、細胞分化能・細胞骨格形成には明らかな変化は見られなかったものの、細胞生存能は亢進し、骨吸収能に関しては低下していた。Mcl-1 knockdown された破骨細胞では、やはり細胞分化能・細胞骨格形成には明らかな変化は見られなかったが、細胞生存能の低下が見られた。

7 Mcl-1 flox/flox マウスから作製した破骨細胞に遺伝子導入法を用いて Cre を発現させることで ex vivo の系で lox-P system を発動させることで Mcl-1 knockout 破骨細胞を作製し、細胞分化能・細胞生存能・骨吸収能を評価した。Mcl-1 knockout 破骨細胞の細胞分化能には明らかな変化は見られなかった。Mcl-1 knockout 破骨細胞の生存能は著明に低下を見せる一方、骨吸収能は亢進していた。破骨細胞の Mcl-1 は細胞生存能を正に、骨吸収能を負に制御することが示された。

以上、本論文は破骨細胞内の Bcl-2 ファミリー蛋白 Mcl-1 の動態、およびその働きについて明らかとした。これらの知見はこれまでに未知なものであり、炎症性疾患と骨代謝を結ぶ分子として Mcl-1 が重要な働きを担っていると示唆するものである。今後の炎症性疾患の骨病変治療法の解明に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。