

論文内容の要旨

申請者氏名 中村 尚志

当グループでは、これまでの研究から、骨吸収を担う破骨細胞の分化に必須な因子として転写因子 NFAT2 を同定するとともに、NFAT2 の標的候補遺伝子として EGF ファミリーに属する増殖因子 Heparin Binding EGF-like growth factor (HB-EGF) を見出している。HB-EGF は細胞外領域に機能領域をもつ膜一回貫通型タンパク質 (膜型リガンド; proHB-EGF) として合成される。さらに、細胞外領域でメタロプロテアーゼによる切断を受け、遊離型リガンド (sHB-EGF) および細胞質内領域 (HB-EGF-C) が生成される。

本研究では、HB-EGF の骨組織における生理学的機能を明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。

1. **HB-EGF 変異マウスにおける骨形態**: HB-EGF ノックアウトマウス (HB-KO)、および非切断型 HB-EGF ノックインマウスでは野生型と比較して骨形態に有為な差は認められなかった。しかし、HB-EGF 変異マウスでは破骨細胞・骨芽細胞数が増加しており、尿中および血清中の骨吸収・骨形成マーカー値が上昇していた。このことから、HB-EGF は骨代謝を負に制御する因子として機能していることが示唆された。

2. **破骨細胞における HB-EGF の機能**: HB-EGF 強制発現細胞を樹立し破骨細胞分化に与える影響を調べたところ、HB-EGF は破骨細胞の分化を抑制し、この抑制には HB-EGF の切断が重要であることが明らかとなった。さらに、sHB-EGF は破骨細胞分化に影響を与えず、HB-EGF-C が分化抑制因子として機能することが示唆された。また、HB-EGF-C 内 S207 の非リン酸化型変異体強制発現細胞では分化抑制が回復した。以上の結果より、切断後の HB-EGF-C が破骨細胞の分化を抑制し、その抑制には S207 のリン酸化が重要な役割を持つことが示唆された。

3. **骨芽細胞における HB-EGF の機能**: 骨芽前駆細胞株 MC3T3-E1 細胞を用い、sHB-EGF が骨芽細胞分化に与える影響を調べた。その結果、sHB-EGF 存在下では骨芽細胞の分化が抑制される一方で細胞増殖が促進されることが観察された。骨芽細胞の分化に必須である転写因子 Smad-Runx2 に与える影響を調べた結果、HB-EGF は Smad の核移行の抑制および Runx2 転写抑制因子 Twist2 の発現誘導により骨芽細胞の分化を抑制していることが示唆された。

4. **破骨細胞に由来する HB-EGF が骨芽細胞の分化に与える影響**: γ 線照射により血球系細胞を破壊したマウスに野生型または HB-KO マウス由来の骨髄細胞を移植し、解析を行った。その結果、HB-KO マウスと同様、HB-KO マウス由来の骨髄細胞を移植したマウスでは骨形態に異常は認められないものの、破骨・骨芽細胞数の増加とともに、骨形成・骨吸収マーカー値の上昇が認められた。以上の結果より、破骨細胞に由来する HB-EGF が骨芽細胞に働きかけることが示唆された。

以上、本研究の結果、破骨細胞に由来する HB-EGF が破骨細胞・骨芽細胞両者の分化を負に制御する因子であることを明らかとした。このことから、HB-EGF は骨吸収から骨形成へ移行する段階でスイッチングファクターとして機能している可能性が示唆される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 中村 尚志

骨組織では、間葉系細胞に由来する骨芽細胞による骨形成および造血系細胞に由来する破骨細胞による骨吸収が繰り返され代謝が行われている。通常、両者は均衡を保っており、骨量は一定に保たれている。この均衡の破綻は骨粗鬆症を始めとする骨疾患の原因となることが知られている。このことから、骨代謝制御機構の解明は骨疾患の根本的治癒に不可欠であると考えられる。

申請者は、破骨細胞の分化に必須な因子として転写因子 NFAT2 の標的候補遺伝子として同定された HB-EGF に着目し、*in vitro* 培養系ならびにマウス個体を用いた実験により、骨代謝制御との関連でその機能を詳細に解析した。

その結果、

- ① HB-EGF 変異マウスにおける骨形態解析から、HB-EGF は骨代謝において負の制御因子として機能していること。
- ② 破骨前駆細胞株 RAW264 細胞ならびに骨髓細胞を用いて破骨細胞分化過程における HB-EGF の発現を調べたところ、HB-EGF は破骨細胞の分化を抑制し、この抑制には HB-EGF の切断が重要であること、また、HB-EGF-C 内 S207 の非リン酸化型変異体 HB-EGF-C S207A 強制発現細胞では分化抑制が回復した結果より、その抑制には S207 のリン酸化が重要な役割を持つこと。
- ③ 骨芽細胞における HB-EGF の機能として、sHB-EGF は骨芽細胞の分化に重要な転写因子の転写活性を抑制し、骨芽細胞の分化を抑制していること。
- ④ 破骨細胞に由来する HB-EGF が骨芽細胞の分化に与える影響について、 γ 線照射により血球系細胞を破壊したマウスに野生型または HB-KO マウス由来の骨髓細胞を移植することにより、疑似的破骨細胞コンディショナルノックアウトマウスを作成し、解析を行った。その結果、破骨細胞に由来する HB-EGF が骨芽細胞の分化に影響を与えていること。などを明らかにした。

骨芽細胞による破骨細胞の分化制御に関しては多くの研究が行われている一方、破骨細胞による骨芽細胞の分化制御に関しては未だ不明な点が多い。申請者は、本研究により、破骨細胞に由来する HB-EGF が破骨細胞・骨芽細胞両者の分化を負に制御する因子であることを明らかにするとともに、「HB-EGF は骨吸収から骨形成へ移行する段階でスイッチングファクターとして機能している」という興味ある仮説を提唱している。今後、骨粗鬆症時における HB-EGF の機能など、HB-EGF が生体内において骨代謝を負に抑制している意義を解明することにより、骨代謝改善薬など骨疾患治療薬としての標的因子となる可能性が十分に考えられる。

以上のように、本論文は骨代謝制御機構に関わる新しいメカニズムを明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。