



Title	骨細胞由来の骨吸収抑制蛋白質に関する研究
Author(s)	池田, 明子
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40481">https://hdl.handle.net/11094/40481</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	いけだ あきこ
博士の専攻分野の名称	博士(学術)
学位記番号	第 12834 号
学位授与年月日	平成 9 年 2 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	骨細胞由来の骨吸収抑制蛋白質に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 栗栖浩二郎 (副査) 教授 松矢 篤三 助教授 開 祐司 助教授 小川 裕三

### 論文内容の要旨

骨組織中に数多く存在する骨細胞は、細胞突起を介して、隣接する骨細胞同士互いに、または骨表面に存在する破骨細胞や骨芽細胞とコンタクトし、細胞間ネットワークを形成していることが知られている。しかしながら、骨代謝回転における骨細胞の役割についてはまだ殆ど明らかにされていない。一方、骨のリモデリングの過程で、破骨細胞はある程度の深さまで骨を吸収すると活動を停止することが知られているが、破骨細胞が生理的に骨吸収を停止する機序については不明である。骨吸収相の破骨細胞は、多数の骨細胞を骨基質から骨表面に掘り出し、これらとコンタクトし、その一部を貧食により細胞内に取り込むことが報告されていることから、破骨細胞の機能の停止に骨細胞が関与する可能性が考えられる。そこで、*in vitro* の骨吸収モデルであるピット形成系を用いて、破骨細胞の骨吸収機能における骨細胞の関与について検討を行った。

まず、鶏胚から単離した骨細胞の抽出物および培養上清が破骨細胞の骨吸収活性にどのような影響を及ぼすのかを検討した。マウス大腿骨由来の未分画全骨細胞を用いたピット形成系において、骨細胞抽出物はピット形成を顕著に抑制した。このとき MTT 法で測定した生細胞数には影響が認められなかったことから、この抑制活性は細胞毒性によるものではないと考えられる。同様に調製した骨芽細胞抽出物にはピット形成抑制活性は認められなかった。また、骨細胞の培養上清にも活性は認められなかった。これらの結果から、骨芽細胞が骨細胞へ分化した段階で発現が高まる骨吸収抑制物質が骨細胞内に存在することが示唆された。コラゲナーゼ処理により骨表面の細胞を除去して骨細胞をエンリッチした鶏胚頭頂骨骨片の抽出物にも、骨細胞抽出物と同様のピット形成抑制活性が認められた。この骨吸収抑制活性は、100°C、30 分の熱処理または37°C、1 時間のトリプシン処理により消失した。

骨細胞由来の骨吸収抑制蛋白質の一つを、コラゲナーゼ処理した鶏胚頭頂骨の抽出物から精製した。最終精製に用いた Superose 12 の活性画分について SDS-PAGE による分析を行ったところ、活性の強さと相応する一本のバンドが認められた。このバンドの分子量は還元条件下で 18.5 kDa であった。この蛋白質の N 末端アミノ酸配列を解析した結果、低分子量 G 蛋白質の一種である Rho を不活性型にする Rho-GDI の一部の領域と 68% の相同性を示すことが明らかとなった。

18.5-kDa 蛋白質は、マウス、ウサギの未分画全骨細胞およびヒト骨巨細胞腫細胞を用いたピット形成系において、いずれも濃度依存的な抑制活性を示した。また、ウサギ単離破骨細胞を用いたピット形成系においても顕著な抑制活性を示したことから、本蛋白質が破骨細胞に直接作用することが示唆された。さらに、本蛋白質をウサギ単離破骨細胞に微量注入したところ、活性型破骨細胞において認められるポドゾームが、注入30分後には消失することが明らかとなった。この結果から、本蛋白質も Rho-GDI と同様に細胞骨格蛋白質の機能を制御する作用があることが示唆された。

本研究の結果、(1)骨細胞内には破骨細胞の骨吸収を抑制する非分泌型の因子が存在すること、(2)その一つは Rho-GDI と一部相同性を持つ分子量18.5 kDa の蛋白質であること、(3)その蛋白質は破骨細胞に直接作用すること、さらに、(4)破骨細胞内に微量注入するとポドゾーム構造を破壊することが明らかになった。これらの結果から、破骨細胞は、骨基質から掘り出された骨細胞とコンタクトすると、骨細胞中に存在する骨吸収抑制蛋白質からのシグナルを受けて骨吸収を停止するという可能性が考えられる。その詳細な作用機序はまだ明らかではないが、本研究において、骨のリモデリングに際し、破骨細胞が生理的に骨吸収を停止するメカニズムに骨細胞が関与する可能性を示すことができた。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、破骨細胞の生理的な骨吸収停止機構を解明するため、骨細胞由来の成分の性質を主として *in vitro* の骨吸収モデルであるピット形成系を用いて追究し、以下の結果を得ている。

(1)骨細胞中には破骨細胞の骨吸収を抑制する非分泌型の因子が存在する。(2)その因子の一つは、Rho-GDI の一部と相同性を持つ分子量18.5 KDa の蛋白質である。(3)18.5 KDa の蛋白質は、破骨細胞に直接作用し、骨吸収を抑制する。(4)18.5 KDa の蛋白質を破骨細胞に微量注入すると、破骨細胞のポドゾーム構造は消失する。これらの結果から著者は、破骨細胞が生理的に骨吸収を停止するメカニズムには、骨細胞中の Rho-GDI ファミリーの蛋白質が関与するという、骨のリモデリングにおける新しいモデルを提唱している。

本研究で得られた結果は、骨代謝の研究分野に新たな知見を加える意義あるものである。よって本論文は、博士(学術)の学位請求に十分値するものと認められる。