OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Continuous Inhibition of MAPK Signaling Promotes the Early Osteoblastic Differentiation and Mineralization of the Extracellular Matrix
Author(s)	樋口, 周久
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43927
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	樋口周久（ひぐちちかひさ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 17672 号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Continuous Inhibition of MAPK Signaling Promotes the Early Osteoblastic Differentiation and Mineralization of the Extracellular Matrix （MAPKシグナルの持続的抑制は早期骨芽細胞分化と細胞外基質の石灰化を促進する）
論文審査委員	（主査） 教授 吉川 秀樹 （副査） 教授 大薗 恵一　教授 北村 幸彦

論文内容の要旨

［目的］

骨形成と骨芽細胞分化のメカニズムの解明、およびそれに基づく臨床応用への基礎研究

［方法］

マウス筋芽細胞株C2C12および骨芽細胞株MC3T3-E1を用いて、筋芽細胞株C2C12においてはリコンビナントヒトbone morphogenetic protein-2（rhBMP-2）存在下に、骨芽細胞株MC3T3-E1株はrhBMP-2存在および非存在下にて、MAPKシグナルの阻害剤であるPD98059の骨芽細胞分化への効果を検討した。検討項目は、骨芽細胞の早期分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、後期分化マーカーであるオステオカルシン(OCN)、および細胞外基質への石灰化の変化である。また、阻害剤のターゲットとされるMAPK/ERK kinase-1（MEK-1）のconstitutively activeおよびdominant negative cDNAをC2C12にトランスフェクションし、安定発現株を得て、ALPおよびOCNの変化を確認した。

［成績］

筋芽細胞株C2C12においては、rhBMP-2存在下でALP活性上昇および細胞外基質の石灰化が認められたが、PD98059の持続的投与によりALPのmRNA発現と活性上昇、石灰化が促進された。逆に、OCNのmRNA分泌は阻害剤投与により減少した。一方、骨芽細胞株MC3T3-E1においては、rhBMP-2存在および非存在にかかわらず、PD98059によりALPのmRNA発現と活性上昇、OCNのmRNA発現と分泌上昇および細胞外基質石灰化促進が認められた。

C2C12にdominant negative MEK-1 cDNAを安定発現した細胞株ではrhBMP-2によるALP活性上昇の促進とOCN分泌の低下を認め、C2C12にPD98059を作用させた結果に一致した。また、constitutively active MEK-1を安定発現した細胞株では、rhBMP-2によるALP活性上昇、OCN分泌が全く認められなかった。

［ 総 括 ］

我々は、rhBMP-2 と C2C12 および MC3T3-E1 細胞株を用いて、骨芽細胞分化を促進する低分子化合物をスクリーニングしているが、その１つとして MEK 阻害剤 PD98059 を見出した。今回、２つの細胞株において、この阻害剤による ALP 活性促進を確認した。さらに遺伝子導入を用いて、この結果を確認した。しかし、OCN 分泌に関しては２つの細胞株の間で異なる結果が得られた。OCN は、そのノックアウトマウスで骨量増加が認められており、骨芽細胞分化マーカーであるが、骨形成促進のマーカーとは言いがたい。OCN 分泌の違いにかかわらず、２つの細胞株において細胞外基質の石灰化は促進しており、PD98059 は in vitro においては早期骨芽細胞分化の促進と骨形成促進の可能性が示唆された。また、他の MEK 阻害剤である U0126 による早期骨芽細胞分化の促進と細胞外基質石灰化の促進を確認しており、rhBMP-2 とコラーゲンコンポジットを用い、U0126 を腹腔内投与した予備実験において、形成された骨が阻害剤投与群で大きくなる傾向も確認している。

これらの結果より、MEK 阻害剤は骨形成促進する化合物として使用できる可能性があると考える。

論文審査の結果の要旨

本研究は MAPK シグナルの持続的抑制が間葉系細胞の骨形成因子（Bone Morphogenetic Protein : BMP）による早期骨芽細胞分化と細胞外基質の石灰化を促進することを見出したものである。MAPK シグナル阻害剤である PD98059 を、持続的に、多分化能を有する間葉系細胞あるいは前骨芽細胞に処理し続けると、早期骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性の上昇と細胞外基質の石灰化の促進を認めた。アルカリフォスファターゼ活性と細胞外基質石灰化は、生体内で骨形成が行われるプロセスにおいて必要条件であり、これらが促進していることは MAPK シグナル阻害剤が骨形成促進に有効である可能性を示すものである。一方、細胞種により骨芽細胞の後期分化マーカーであるオステオカルシンの分泌は異なった。オステオカルシンの存在は骨形成に抑制的に働く報告もあり、その分泌量の変化は直接的に骨形成の程度を表すものではないことが示唆された。これまで、MAPK シグナルの活性が骨芽細胞分化に重要であるという報告は多数あるが、その持続的な抑制が骨芽細胞分化に重要だという逆説的な結果を示したことは新しい知見である。したがって、本研究は学位論文に値するものと認める。