



Title	破骨細胞分化におけるJNK/c-Junシグナルの役割に関する研究
Author(s)	池田, 史代
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43987
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	いけだ 史代
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 17719 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 歯学研究科歯学基礎系専攻
学位論文名	破骨細胞分化における JNK/c-Jun シグナルの役割に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 米田 俊之 (副査) 教授 伊集院直邦 助教授 杉村 光隆 講師 木ノ本喜史

論文内容の要旨

<目的>

破骨細胞は、生体において骨吸収能を有する唯一の細胞であり、骨リモデリングの制御に深く関与している。破骨細胞は血液幹細胞を由来とし、CFU-M、前駆破骨細胞、成熟破骨細胞へと順次分化し、骨吸収を終えた後、アポトーシスにより死滅する。近年、このような破骨細胞の一連の分化過程において、腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF) ファミリーに属する膜結合型サイトカイン RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) が重要な役割を演じていることが明らかにされた。RANKL は破骨細胞系細胞が発現する受容体 RANK と結合し、さまざまな細胞内シグナル経路を活性化することによりその作用を示すことが示唆されているが、各々のシグナルが RANKL のどのような機能に関与するかは不明である。本研究においては、これらのシグナル経路のうち、c-Fos と共に AP-1 を構成する転写因子 c-Jun の JNK (c-Jun N-terminal Kinase) を介したシグナル経路が破骨細胞の分化に対して果たす役割について検討した。

<実験方法>

1. 破骨細胞系細胞の分化誘導

マウス骨髄細胞を M-CSF (100 ng/ml) 存在下にて 3 日間培養し、前駆破骨細胞 (M-BMMΦ) に分化誘導させた。また、マウス単球性白血病細胞株 RAW264 も前駆破骨細胞として用いた。次いで、M-BMMΦあるいは、RAW264 細胞に可溶型 RANKL (sRANKL、100 あるいは 20 ng/ml) を 4 日間添加することにより破骨細胞に分化誘導させた。破骨細胞の分化は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性多核巨細胞数の算定により評価した。

2. 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色

TRAP 染色は 10% ホルマリン-PBS による固定後、白血球酸ホスファターゼ染色用キットを用いて行った。

3. JNK/c-Jun シグナルの活性化

sRANKL によって刺激した M-BMMΦ および RAW264 の細胞融解液を、JNK あるいは、c-Jun に対する特異的抗リン酸化抗体を用いたウェスタンプロット法を用いて解析した。

4. JNK/c-Jun シグナルの機能的役割の検討

JNK の特異的阻害剤である SP600125 (5 μ M) を前駆破骨細胞、あるいは成熟破骨細胞に作用させ、その分化、あるいはアポトーシスおよび生存に対する効果を検討した。さらに、ドミナントネガティブ(DN-)JNK1 および、

DN-c-Jun のコンストラクトを組み込んだアデノウィルスを、前駆破骨細胞あるいは、成熟破骨細胞に感染させ、その効果を検討した。

5. DN-c-Jun トランスジェニックマウスの作製と解析

TRAP プロモーターを用いて破骨細胞特異的に DN-c-Jun を発現させたトランスジェニックマウス (DN-c-Jun TG マウス) を作成し、その phenotype を野生型マウスと比較しながら、X 線学的および HE 染色、TRAP 染色を用いた病理組織学的検索により解析した。

<結果>

1. 破骨細胞分化に対する JNK/c-Jun シグナルの役割

M·BMMΦ および RAW264 細胞を sRANKL で処理すると、TRAP 陽性の多核巨細胞、すなわち破骨細胞様細胞が形成された。また sRANKL は JNK1、JNK2 および、c-Jun の顕著な活性化を認めた。一方、SP600125 処理、あるいは DN-JNK1、DN-c-Jun の過剰発現により、JNK/c-Jun シグナルの活性化を抑制すると、破骨細胞様細胞の形成が阻害された。

2. DN-c-Jun TG マウスの解析

DN-c-Jun TG マウスは、歯牙萌出不全、骨組織の X 線不透過性増加、長管骨の骨管端の膨大化および、長管骨骨髓腔の狭窄を呈し、明らかな骨大理石病の特徴を示した。また、病理組織学的には、野生型マウスにおいて見られる TRAP 陽性破骨細胞が全く観察されなかった。

<結論・考察>

本研究の結果、RANKL 刺激により活性化される JNK/c-Jun シグナルは、破骨細胞分化に必須のシグナル伝達経路であることが示された。さらに、DN-c-Jun TG マウスが破骨細胞形成不全による骨大理石病の病態を示したことから、In Vivo における破骨細胞分化に対する JNK/c-Jun シグナルの関与が初めて明らかとなった。これらの研究結果より、JNK により活性化される c-Jun はもうひとつの AP-1 構成因子である c-Fos と協調的に標的遺伝子の発現を制御することにより、破骨細胞の分化を調節していると推測される。

論文審査の結果の要旨

本研究は骨吸収において中心的役割を演じる、破骨細胞の分化に関わる細胞内シグナル経路の解析を目的として行われたものである。

本研究により、骨吸収促進性サイトカイン RANKL による破骨細胞分化促進において JNK-c-Jun/Fos-NFAT シグナル経路が重要な役割を演じていることが明らかとなった。本研究の結果は骨吸収の亢進を伴う骨疾患の分子メカニズムの解明に寄与するものであり、博士（歯学）の授与に値するものと認める。