



Title	骨形成担当細胞における parathyroid hormone の dual functionality誘導メカニズムに関する研究
Author(s)	藤田, 隆司
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44621">https://hdl.handle.net/11094/44621</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	藤 田 隆 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 18059 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 7 月 3 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	骨形成担当細胞における parathyroid hormone の dual functionality 誘導メカニズムに関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 馬場 明道 (副査) 教 授 八木 清仁 教 授 前田 正知 教 授 山元 弘

### 論 文 内 容 の 要 旨

PTH\*はカルシトニンと協調的に生体内カルシウムを調節する重要なホルモンであり、PTH を連続に投与すると骨代謝が catabolic に、間歇的に投与すると anabolic になるという 2 面性を持つ (dual functionality)。PTH は積極的に骨形成を促進することが可能な治療手段となることから、臨床的有用性に期待が寄せられている。しかしながら、この PTH の dual functionality の分子メカニズムはほとんど理解されておらず、その要因として *in vitro* でのホルモン作用の再現が困難であるためであることが挙げられる。成体レベルでの PTH の骨形成促進作用には、1) 骨芽細胞の細胞増殖を促進する 2) 骨芽細胞の機能を亢進させるという 2 つの要素が必要であり、いずれかが恒常的に抑制されると骨形成は抑制され、骨量が減少すると仮説できる。そこで骨格系を担う細胞要素の中で骨形成を担当する軟骨細胞・骨芽細胞、更に最近クローン化された骨細胞を用いて、これらの細胞の機能的変化を遺伝子発現、情報伝達機構や転写因子の変化として追い、「骨の形づくり」を培養細胞から捉えることを目的に本研究を行った。

PTH による骨芽細胞の細胞増殖の調節作用には、PPR が細胞内で共役する cAMP をセカンドメッセンジャーとする機構が重要である。上昇した cAMP は古典的な PKA を活性化することが知られるが、近年新規な cAMP の GEF として Epac が同定された。Epac は Rap1 を特異的に活性化し、Raf-1 の活性を抑制する一方、B-Raf を活性化することから、cAMP による MAPK カスケードに対する正負の両制御機構が存在し、PKA と独立した細胞内シグナルを調節すると考えられる。本研究ではまず、骨形成担当細胞クローンにおける Epac1、Epac2、Rap1、B-Raf の発現を調べ、また Epac を介する cAMP シグナルと骨芽細胞の細胞増殖との連関について cDNA 導入による多面的解析を試みた。検討の結果、Epacs、Rap1 の発現はほぼ普遍的にどの細胞でも観察されたが、B-Raf の発現は細胞種特異的であった。cAMP による ERK 活性化および細胞増殖促進作用は、B-Raf の発現と相関し、Rap1 依存的であった。一方、B-Raf 欠失細胞では cAMP によって ERK 活性の抑制効果が観察され、細胞増殖抑制作用が見られた。本細胞の 1 つ MG63 に B-Raf cDNA 導入によるレスキュー解析から、cAMP による ERK 活性化および細胞増殖促進作用が見られた。以上のことから、PTH は B-Raf の発現を分岐点として、細胞増殖を促進的・抑制的に調節し、PTH の dual

\* PTH, parathyroid hormone ; PTHrP, PTH/PTH related protein ; PPR, PTH/PTHrP receptor ; cAMP, cyclic adenosine monophosphate ; PKA, protein kinase A ; ERK, extracellular regulated kinase ; GEF, guanine nucleotide exchange factor ; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction, IBMX, 1-methyl-3-isobutylxanthine, Db-cAMP, dibutyryl-cAMP ; FK, forskolin ; OCN, osteocalcin ; BSP, bone sialoprotein ; ALP, alkaline phosphatase ; OSE2, osteoblastspecific cis element 2 ; BMP, bone morphogenetic protein

functionality 発現が細胞内の分子の発現に起因する可能性が示唆された。

また、骨芽細胞が増殖ステージを終え、分化のステージにスイッチしたときもまた、PPR シグナルは正または負の分化シグナルとなる可能性がある。間歇的な投与スケジュールによって再現される PTH の骨形成促進作用の *in vivo* 条件模索のため、骨芽細胞に対し PTH の暴露時期・期間を調節・設定してモデルを構築し、本ホルモンの dual functionality 誘導メカニズムについて、分化調節の視点から調べた。その結果、恒常的な PTH の暴露は分化を抑制し (C-phase)、分化の後期のステージへの時期特異的暴露は分化を亢進させた (A-phase)。また、この PTH の暴露期間に依存した dual functionality 誘導の各条件下で遺伝子発現マップを作成した結果、骨芽細胞分化に必須の転写因子 Cbfa1 の発現に際だった影響はなく、Cbfa1 の標的遺伝子として知られる骨芽細胞分化の後期分化マーカー遺伝子の発現が特異的に調節されていた。PTH によって Cbfa1 が機能レベルで翻訳後に調節されていることが予想されたため、ゲルシフト解析により Cbfa1 の DNA 結合能を調べた。C-phase の条件下では、PTH は Cbfa1 の DNA 結合を阻害し、逆に A-phase の条件下では亢進させた。従って、PPR シグナルは、骨芽細胞分化に対して Cbfa1 の機能を正・負に制御することで dual functionality を誘導することが示唆された。

次に、骨芽細胞分化に対する Epac-Rap1 シグナルの役割を調べた。PTH あるいは forskolin は単独で ALP を誘導しないが、BMP2 による ALP 誘導を更に促進させた。本作用は、Rap1 の dominant negative form 導入細胞である N17Rap1 細胞で消失した。また、2つの constitutively active form 導入細胞 V12Rap1 細胞・Epac ΔcAMP 細胞では、BMP2 によって ALP が強く誘導された。BMP2 は、Cbfa1 発現を誘導し、Cbfa1 依存的な OCN 遺伝子プロモーターを活性化した。PTH は本プロモーター活性誘導作用を持たないものの、BMP2 によるレポーター誘導活性を更に促進させた。また、PTH は単独および BMP2 共存下のいずれにおいても、Cbfa1 タンパク発現に対し影響を及ぼさなかったことから、Cbfa1 の翻訳後調節に寄与していることが考えられた。PTH による BMP2 依存的なプロモーター誘導活性亢進作用は、N17Rap1 細胞では観察されなかった。一方、V12Rap1 細胞や Epac ΔcAMP 細胞では BMP2 により強いレポーター活性が誘導された。以上のことから Epac-Rap1 シグナルは、骨芽細胞に対し BMP2 依存的に分化シグナルとして機能することが考えられた。

以上の成績から、骨形成担当細胞の増殖期において、PTH は cAMP を介した Epac-Rap1 シグナルを活性化し、B-Raf を分子スイッチとして ERK の活性を制御することで細胞増殖を調節し、また分化期においても、BMP2 依存的に Cbfa1 の機能を調節することによって分化を促進させる働きがあることがわかった。Epac を介した分子機構は、胎児期のみならず成体での骨組織の再生過程で機能していることが考えられ、本研究は骨格形成過程の理解にとどまらず、臨床的にも治療および病態の理解に寄与すると考える。

## 論文審査の結果の要旨

PTH (副甲状腺ホルモン) は生体内カルシウムを調節する重要なホルモンであり、PTH を連続に投与すると骨代謝が catabolic に、間歇的に投与すると anabolic になるという 2 面性を持つ (dual functionality)。この分子機構を明らかにするために *in vitro* でこの現象の再現と解析を目的に本研究では種々の骨系細胞を用い PTH の作用のシグナル解析を行った。

その結果、PTH がその受容体を介して Epac-Rap1-B-Raf-MEK-ERK の情報伝達機構にリンクすること、更にその作用の多面性はこれら細胞内情報伝達系のスイッチ、特に B-Raf の存在の有無、に依存することを明らかにした。また、骨芽細胞がその分化ステージにおいて PTH がその増殖を dual に調節すること、これらの作用は転写因子 Cbfa1 の翻訳後調節にあることを見出した。これらの成果は PTH シグナルの異常により発症する疾患を含めた多様な骨代謝性疾患の病態解明に多大の貢献をするものであり、博士 (薬学) の授与に値するものである。