

Title	アポトーシス抑制因子Bcl-2の骨芽細胞の分化と機能における役割に関する研究
Author(s)	大西, 秀威
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45186">https://hdl.handle.net/11094/45186</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	おおにしひでたけ 大西秀威
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第18617号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	アポトーシス抑制因子 Bcl-2 の骨芽細胞の分化と機能における役割に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 高田 健治 (副査) 教授 米田 俊之 助教授 岡橋 暢夫 講師 和田孝一郎

### 論文内容の要旨

#### [研究目的]

アポトーシスは、成体組織の恒常性の維持に重要であると同時に、胚発生や器官形成、組織形態形成において重要な役割をはたしている。Bcl-2 はミトコンドリアから細胞質へのチトクローム C の放出を抑制し、カスパーゼの活性化を阻害することにより、アポトーシスを抑制する機能を持つと考えられている。細胞動態的な解析から、50-70% の骨芽細胞は分化の過程でアポトーシスによって死滅すると考えられている。培養骨芽細胞では未熟な段階から Bcl-2 が発現しており、Bcl-2 ノックアウトマウスでは、骨芽細胞の形態的な異常が報告されている。以上のことから、Bcl-2 は骨芽細胞の分化、機能に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。そこで、本研究では、I型コラーゲンプロモーターを用いて、骨芽細胞特異的に Bcl-2 を過剰発現させたトランスジェニック (Bcl-2 Tg) マウスを作製し、骨芽細胞に対する Bcl-2 の作用を *in vivo* で検討した。

#### [方法]

##### (1)トランスジェニックマウスの作製

I型コラーゲンプロモーター下に bcl-2 cDNA を組み込んだ DNA 断片をマウス受精卵に注入し、Bcl-2 を骨芽細胞特異的に過剰発現する Bcl-2 Tg マウスを作製した。導入遺伝子の確認はサザンブロット解析で、導入遺伝子の発現はノーザンブロット解析で判定した。

##### (2)トランスジェニックマウスの解析

Bcl-2 Tg マウスにおける骨組織、骨芽細胞機能の変化を調べるために、以下の解析をおこなった。

- ・ X線解析 ・ HE 染色骨組織切片の観察 ・ pQCT 解析 ・ 骨形態計測
- ・ BrdU 取り込み実験 (増殖ステージにある細胞の同定)
- ・ TUNEL 染色 (アポトーシスを起こした細胞の同定)
- ・ *in situ* ハイブリダイゼーションとノーザンブロット (骨芽細胞分化のマーカー遺伝子の発現レベルの測定)

#### [研究成績]

- (1) 3つの系統の Bcl-2 Tg マウス (N1、N2 および N3) を作製した。導入遺伝子の発現が最も強い N2 マウスを中心に解析をおこなった。
- (2) N2 マウスは、若齢時、野性型マウスに比べ体が小さく、骨折を起こす個体もみられた。10 週齢時の X 線解析と組織学的解析において、N2 マウスの大腿骨骨幹端の骨量は著明に低下していた。この骨量の低下は加齢とともに回復した。最も導入遺伝子発現量の低い N3 マウスでは骨折を起こす個体はみられず、10 週齢時で骨量が明確に増加していた。
- (3) 組織学的解析の結果、Bcl-2 Tg マウスでは骨芽細胞が著明に増加している像が観察された。BrdU 取り込み実験の結果、Bcl-2 Tg マウスにおける骨芽細胞増殖は著明に亢進していた。正常マウスではほとんど増殖のみられない骨内膜においても、Bcl-2 Tg マウスでは、活発な増殖像が確認された。
- (4) 組織学的に最も明確な異常は骨細胞にみられた。4 週齢時の Bcl-2 Tg マウスの骨組織では骨細胞数が著明に増加しており、それらは形態的に未熟であった。8 週齢時では空洞の骨小腔が多数認められ、骨幹部では約半数の骨細胞が死滅しており、1 年齢時の骨幹部ではほとんどすべての骨細胞が死滅していた。死滅した骨細胞は TUNEL 染色に対し陽性であり、アポトーシスにより死滅したことが示された。これらの異常は 3 系統に共通した異常であった。
- (5) 10 週齢時の骨形態計測の結果、N2 マウスでは野性型マウスに比べ、骨芽細胞数が有意に増加していたが、骨形成速度、骨石灰化速度には変化がなかった。従って 1 個あたりの骨芽細胞の機能としては低下していることがわかった。
- (6) *in situ* ハイブリダイゼーションとノーザンブロット解析によって骨芽細胞分化のマーカージェノの発現を調べた結果、N2 マウスでは骨芽細胞の分化が抑制されていることが示された。N3 マウスにおいても軽度な分化抑制がみられた。

#### [結論]

Bcl-2 を過剰発現させた骨芽細胞では、細胞増殖が亢進し、細胞分化が抑制された。この結果、N2 マウスでは未熟な骨芽細胞が増え、若齢時では骨の脆弱化を起こした。骨量低下は加齢に従い回復したが、これは導入遺伝子の発現が加齢に従い低下し、分化抑制作用が減弱したためと思われる。導入遺伝子発現量の最も低い N3 マウスでは分化抑制作用は軽度であり、骨芽細胞増殖の亢進を反映して、早期から骨量が増加したと考えられる。Bcl-2 Tg マウスの骨細胞数は著明に増加し、形態的に未熟で、加齢に従いアポトーシスを起こし、死滅した。骨細胞数の増加は骨芽細胞増殖の亢進を、骨細胞の未熟な形態は骨芽細胞の分化抑制を反映した結果と思われる。アポトーシスの原因は不明であるが、骨細管を介した細胞間コミュニケーションの異常に起因していることが考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、アポトーシス抑制因子 Bcl-2 を骨芽細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、骨芽細胞に対する Bcl-2 の作用を *in vivo* で検討したものである。

その結果、Bcl-2 は、骨芽細胞の増殖を促進するとともに、骨芽細胞の後期での分化を抑制することが示された。また、Bcl-2 を過剰発現させた骨芽細胞は、骨細胞に分化したのち、アポトーシスにより死滅することが明らかとなった。

以上の研究結果は、骨芽細胞分化における Bcl-2 の機能を理解する上で、重要な知見をあたえるものであり、博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認める。