The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	破骨細胞による骨吸収の分子制御機構の解明に関する研究
Author(s)	松原, 琢磨
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45578
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	松（まつ）　原（ばら）　琢（たく）　磨（ま）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　１９４０２　号
学位授与年月日	平成 17 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	**破骨細胞による骨吸収の分子制御機構の解明に関する研究**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　米田　俊之 （副査） 教　授　村上　伸也　　助教授　岡橋　暢夫　　助教授　小川　裕三

論　文　内　容　の　要　旨

骨組織は、吸収と形成を繰り返し、ダイナミックにリモデリングを行いながら、骨およびカルシウム代謝を調節している。骨リモデリングは、骨吸収を行う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞の機能のバランスの上に成り立っている。しかし加齢、閉経、ストレスなどさまざまな要因により破骨細胞性骨吸収が亢進すると、このバランスが崩れ、骨粗鬆症などの代謝性骨疾患が発症する。近年増加している骨破壊亢進性骨疾患に対応するためには、破骨細胞による骨吸収の分子メカニズムを明らかにし、破骨細胞性骨吸収を阻害する有効な手段の確立が望まれる。

破骨細胞は、骨吸収に必要不可欠かつ特徴的な細胞骨格構造、明帯および波状縁を形成する。チロシンキナーゼ c-Src 遺伝子欠損マウスの解析の結果、明帯および波状縁の形成および骨吸収活性には c-Src が必須であることが示されている。多くの組織では、c-Src の制御キナーゼ Csk が、c-Src を不活性化されているのに対し、破骨細胞においては c-Src 活性が高く維持されている。したがって、破骨細胞は c-Src 活性を高く維持するユニークな調節機構を有し、その結果、強い骨吸収機能を発揮すると推察される。本研究では、c-Src の制御機構ならびに c-Src による破骨細胞の明帯および波状縁形成に関与する分子を検討し、破骨細胞による骨吸収の分子メカニズムの解明を試みた。

〈方法〉

1．　破骨細胞系細胞の分化誘導

マウス脾臓細胞に、可溶型 RANKL および M-CSF を６日間作用させ、破骨細胞への分化を誘導した。破骨細胞の分化は酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ（TRAP）染色によって評価した。

2．破骨細胞のアクチン細胞骨格の検索

破骨細胞を固定後、ロダミン標識されたファロイジンにてアクチンを染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。

3．　破骨細胞の骨吸収活性の測定

象牙質切片上で破骨細胞を分化誘導し、ブラシにより破骨細胞を象牙質切片上より除去した後、トルイジンブルー液により吸収窩を染色し、その面積を測定した。

4．　破骨細胞への遺伝子導入

Csk、Chk、Cbp、あるいは Cortactin 変異体の cDNA を組み込んだアデノウイルスを作成し、破骨細胞に感染させた。導入された遺伝子の発現は、ウェスタンブロッティング法により確認した。

〈結果〉

1．c-Srcによる破骨細胞の明帯および波状縁形成の分子メカニズム

c-Srcは F-アクチンの凝集を促進することによって破骨細胞の明帯および波状縁形成を誘導する。そこで、c-Srcの基質でありアクチン結合タンパク質である Cortactin の破骨細胞における役割を検討した。破骨細胞前駆細胞株RAW264.7への Cortactin の過剰発現により、明帯に相当するアクチンリングの形成が誘導された。さらに、アクチン結合部位を欠失した Cortactin 変異体の過剰発現により、破骨細胞のアクチンリング形成および骨吸収活性が著明に阻害された。

2．c-Srcの活性制御機構

(1) Cskファミリーキナーゼ Chkによる c-Srcと破骨細胞性骨吸収の制御

破骨細胞に発現する Csk ファミリーキナーゼとして当研究室でクローニングされた Chk の、破骨細胞の機能発現過程における役割を検討するために破骨細胞に Chk を過剰発現させた。Chk の過剰発現は、c-Src 活性、アクチンリング形成、および骨吸収活性を著しく抑制した。

(2) 破骨細胞における Csk の活性制御機構

破骨細胞における Csk の細胞内局在を検索した結果、Csk は c-Src が存在する細胞膜脂質 Raft にはほとんど存在していなかった。そこで破骨細胞における Csk の制御機構を検討するために、Csk を Raft にリクルートする Csk 結合タンパク質、Cbp について検討を行なった。その結果、破骨細胞における Cbp の発現量は、他の組織と比べ、非常に少なかった。また、破骨細胞に Cbp 遺伝子を導入すると、Cbp の発現量に依存して、Csk の Raft への局在量が増加する一方で、c-Src のキナーゼ活性が低下した。さらに、Cbp の遺伝子導入により破骨細胞のアクチンリング形成および骨吸収活性が抑制された。

また、Cbp の発現制御機構を検討した結果、Cbp の発現量は破骨細胞分化のマスター遺伝子である NFAT により抑制された。

〈結論・考察〉

本研究の結果、c-Srcによる破骨細胞の明帯および波状縁形成に Cortactin が深く関与していることが明らかとなった。また、破骨細胞では Csk に加えて Chk が c-Src 活性を調節し、細胞骨格および骨吸収の制御に深く関与することが示された。さらに、破骨細胞においては分化過程で Cbp の発現量が抑制されるため、Csk ファミリーの脂質 Raft への移行が誘導されず、その結果として c-Src 活性が高く維持されていることが明らかとなった。以上の結果より、破骨細胞性骨吸収の分子メカニズムの一端が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、破骨細胞による骨吸収のメカニズムを明らかにする目的で、破骨細胞のアクチンリング形成における c-Src の役割およびその制御機構について検討を行ったものである。

その結果、破骨細胞においては、c-Src は Cortactin の活性化を介してアクチンリング形成および骨吸収をコントロールすること、c-Src 活性はチロシンキナーゼ Csk および Chk により負に制御されていること、そして Csk、Chk の細胞膜脂質ラフトへの移行に密接に関与する Cbp の発現が低下しているため c-Src 活性が高く維持されていること、が明らかとなった。

以上の結果は、破骨細胞による骨吸収の分子メカニズムに関する新たな知見を提供し、骨吸収が亢進するさまざまな骨疾患の病態の解明、ならびに新規の治療法開発の指針となるものであり、博士（歯学）を授与するに値すると認める。