

Title	PKC α suppresses osteoblastic differentiation
Author(s)	名倉, 温雄
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58213
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	名倉 温 雄
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 24425 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	PKC α suppresses osteoblastic differentiation (PKC α は骨芽細胞分化に抑制的に作用する)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀樹 (副査) 教授 仲野 徹 教授 大藪 恵一

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

Protein Kinase C (PKC) は、構造や性質から 11 種の類型 (α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 η 、 θ 、 μ 、 ζ 、 λ) に分類され、それぞれが個々の役割を果たし、または相互作用を及ぼしながら、様々な生体内反応に寄与している。特に PKC α は、ubiquitous に発現しており、臨床においては循環器系や腫瘍分野などで細胞分化や細胞増殖の活性化シグナルの一端を担い病態に深く関与しているとの報告がある。骨代謝における PKC α の役割は、骨芽細胞増殖に促進的に働くという報告があるが、骨芽細胞分化における役割は解明されていない。我々は、PKC α の骨芽細胞分化における役割を解析した。

〔 方 法 〕

マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて、PKC の阻害剤 G6976、PKC β inhibitor と、PKC の促進作用のある TPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate) を投与し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色、ALP 活性の定量、mRNA における骨芽細胞分化マーカー、転写因子の変化と、Alizarin red 染色による骨芽細胞分化への影響を解析した。さらに、siRNA を用いて選択的に PKC α を knockdown し、逆に、adenovirus vector を用いて PKC α の overexpression を行い、同様の評価を行った。また、これらの inhibitor や activator、adenovirus vector を用いることによる骨芽細胞増殖の変化を WST-1 assay で評価した。

〔 成 績 〕

MC3T3-E1 細胞に PKC α と PKC β I を阻害する G6976 を投与すると、濃度依存性に ALP 活性は亢進し、mRNA でも骨芽細胞分化マーカーの発現増強、そして、Alizarin red 染色での濃染を示した。一方、PKC β I と PKC β II の阻害剤である PKC β inhibitor は、骨芽細胞分化に影響を認めなかった。また、PKC の促進作用のある TPA では、濃度依存性に骨芽細胞分化の抑制を認めた。siRNA を用いた PKC α の knockdown では、骨芽細胞分化の亢進を認めた。また、PKC α の knockdown の状況下で TPA 5nM を加えると、コントロール群と比べて ALP 活性の抑制は減弱しており、PKC α が骨芽細胞分化の抑制に寄与していることが確認された。逆に、PKC α の overexpression の状況下では、骨芽細胞分化の抑制が確認された。

G6976 で骨芽細胞分化が亢進し、PKC β inhibitor で影響を認めなかったことから、PKC α が骨芽細胞分化に抑制的な役割を果たしていると推測された。これは、PKC α の knockdown や overexpression によってもそれが確認された。また、マウス骨髄間葉系細胞の ST2 にも PKC の阻害剤を用いて同様の解析を行い、同じような結果が得られている。

加えて我々は、PKC α の下流のシグナル伝達の解析を行った。一般的に PKC α の下流では、p44/42 MAPK のリン酸化に影響が及び、さらに、その変化が転写因子に伝達されるといった報告が多い。しかしながら、我々の解析では、PKC の阻害剤や PKC α の knockdown、overexpression の状況下で p44/42 MAPK のリン酸化の有意な変化を認めることはできなかった。

骨芽細胞分化に関しては、これまでに PKC α は促進的に働くことが報告されており、我々の結果でも MC3T3-E1 細胞の G6976 投与下では増殖能の低下を認め、adenovirus による PKC α の overexpression の状況下では増殖能の亢進を認めた。

〔 総 括 〕

PKC α は骨芽細胞分化に抑制的に作用していることが示された。一方、骨芽細胞増殖には、促進的に作用している。PKC α は、骨芽細胞の分化と増殖という相反する細胞活動に極めて重要な働きを持っている可能性がある。

論文審査の結果の要旨

Protein Kinase C (PKC) の特に PKC α は、多様なシグナル伝達物質の一つとして様々な病態に深く関与している。しかし、骨代謝において PKC α の骨芽細胞分化における役割は解明されていない。そこで PKC α の骨芽細胞分化における役割を解析した。マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて、G6976、PKC β inhibitor、TPA (12-*O*-Tetradecanoylphorbol 13-acetate) を投与し、骨芽細胞分化への影響を解析した。さらに、PKC α の knockdown や overexpression の状況下で同様の評価を行った。PKC α と PKC β I を阻害する G6976 を投与すると、濃度依存性に ALP 活性は亢進し、mRNA でも骨芽細胞分化マーカーの増強、Alizarin red 染色での濃染を認めた。一方、PKC β I と PKC β II の阻害剤である PKC β inhibitor は、骨芽細胞分化に影響を認めなかった。また、PKC の促進作用のある TPA は、濃度依存性に骨芽細胞分化の抑制を認めた。siRNA を用いた PKC α の knockdown では、骨芽細胞分化の亢進を認めた。さらに、PKC α の overexpression の状況下でも骨芽細胞分化の抑制が確認された。PKC α は骨芽細胞分化に抑制的に作用していることが示された。一方、骨芽細胞増殖には促進的に作用することが報告されており、我々も確認できた。以上より PKC α は骨芽細胞分化に抑制的に働き、骨芽細胞の「分化」と「増殖」という相反する細胞活動に極めて重要な働きを持っている可能性がある。

今後は、PKC α の上流と下流のシグナル伝達に関して、さらなる検討が必要である。また、ubiquitous に存在する PKC α がどのような形で骨代謝の臨床応用に拡張されるか、他の臓器、組織における PKC α の役割も考慮して検討していく。

以上の研究報告に対して、学位の授与に値すると考えられる。