

氏名	中村 政裕
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4529号
学位授与の日付	平成24年3月23日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	骨形成におけるオートファジーの関与
学位論文審査委員	教授 山本 敏男 教授 山城 隆 准教授 久保田 聡

学位論文内容の要旨

【緒言】

オートファジーは栄養飢餓時に細胞内で活性化される非選択的タンパク質分解機構であり、細胞内の不要物質を分解して再利用することで細胞の機能維持に役立っている。このオートファジーの機能が低下すると、神経細胞のアポトーシスや膵B細胞の機能低下を引き起こし、アルツハイマー病やパーキンソン病、II型糖尿病の病因となることが証明されている。このように、オートファジーによるタンパク質分解系は細胞の機能維持に重要な現象として知られているが、骨組織におけるオートファジーの役割については未だ報告が無い。そこで今回の研究では、特に基質タンパク質を多く産生する骨芽細胞においても、オートファジーが何らかの役割を果たしているのではないかと考え、骨芽細胞においても他の細胞と同様にオートファジーが生じているのか、またそれはいつ、どのような状況で活性化されるのかについて検討を行った。また、異常タンパク質の蓄積によって生じる小胞体ストレス(ERストレス)や、これによって誘導されるアポトーシスの関連性についても調査することとした。

【資料および方法】

1. 実験動物
GFP-LC3 トランスジェニックマウス(GFP-LC3^{tg}型マウス)および、野生型マウス(WT型マウス)を使用した。
2. 細胞培養
初代骨芽細胞を胎生19.0日齢のGFP-LC3^{tg}型マウスおよびWT型マウスの頭蓋骨から採取した。採取した細胞は10% FBS添加 α -MEMにて培養した。長期培養は35 mm培養皿にサブコンフレントとなった後、0.05 mM L-ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate, 100 nM dexamethasoneを含む10% FBS添加 α -MEMにて行った。低酸素刺激は2% O₂で24時間行った。
3. RNAの精製およびリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
細胞からtotal RNAを回収して逆転写反応を行い、cDNAライブラリを作製した。定量はRoche社LightCycler Systemを用いて行った。

4. ウェスタンブロッティング法

ウェスタンブロッティングは一次抗体に rabbit anti-LC3 monoclonal antibody を用い、二次抗体には HRP 標識した goat anti-rabbit IgG を使用した。シグナルの検出には ECL™ Western Blotting Analysis を使用した。

5. *In situ* ハイブリダイゼーション法

プローブは *Atf4* cDNA の翻訳領域の 980 塩基, *Xbp1* cDNA の 973 塩基, *CHOP* cDNA の 781 塩基, *Bax* cDNA の 741 塩基, *Bcl2* cDNA の 788 塩基を鋳型として, DIG RNA ラベリングキットを用いて作製した。ハイブリダイゼーションと検出は通法どおり行った。

6. Pimonidazole 染色

生後 0 日齢マウスの腹腔内に Hypoxyprobe-1 を注射し, 90 分後に頭部を切断し凍結切片を作製した。検出には一次抗体として mouse anti-pimonidazole monoclonal antibody(MAb1 抗体)を用い, 二次抗体には Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG を用いた。

【結果】

1. GFP-LC3^{tg} 型マウス頭蓋骨の骨芽細胞層に GFP-LC3 シグナルの集積を認めた。
2. GFP-LC3^{tg} 型マウス由来骨芽細胞の長期培養に伴い GFP-LC3 シグナルの集積が強くなること, またウェスタンブロット法にてオートファゴゾーム形成時に発現する LC3-II タンパク質が増加することを確認した。
3. WT 型マウス上顎骨の骨基質表層に *Xbp1*, *Atf4*, *CHOP* mRNA の発現を認めた。
4. WT 型マウス骨芽細胞の長期培養において, *Xbp1*, *Grp78*, *Atf4*, *Gadd34*, *CHOP* mRNA の発現量が培養 2 週目でピークに達し, 3 週目にはやや低下した。
5. WT 型マウス上顎骨の骨基質表層に MAb1 抗体陽性反応を認めた。
6. 長期培養後の低酸素刺激に伴い, *Map1lc3b* mRNA および *Xbp1*, *Grp78*, *Atf4*, *CHOP* mRNA の発現量が増加していた。
7. WT 上顎骨の骨基質表層に *Bax*, *Bcl2* mRNA の発現を認めた。
8. *Bax* mRNA の発現量は WT 型マウス由来骨芽細胞の長期培養 2 週目でピークに達し, 3 週目にはやや低下した。*Bcl2* mRNA の発現量は長期培養 2 週目で減少し, 3 週目には増加した。さらに低酸素刺激によって, *Bax* mRNA の発現量は著しく増加し, *Bcl2* mRNA の発現量は著しく低下した。

【考察および結論】

GFP-LC3^{tg} 型マウスを用いた *in vivo* の実験によって, マウス頭蓋骨骨芽細胞層でオートファジーが活性化されていることが明らかとなった。また, GFP-LC3^{tg} 型マウス由来骨芽細胞を用いた実験によって, オートファジーは骨芽細胞の分化後期に強く活性化されることが分かった。WT 型マウスを用いた *in vivo* の実験では, 骨形成時に骨芽細胞は低酸素環境にさらされており, その周囲には異常タンパク質の蓄積によって生じる ER ストレス関連分子の転写活性が認められた。また骨芽細胞のアポトーシスを示唆する所見が得られた。さらに WT 型マウス由来骨芽細胞を用いた実験によって, 骨芽細胞の分化に対する ER ストレス応答の関与と, 低酸素刺激によってアポトーシスが生じている可能性が示唆された。これらのことから, 骨芽細胞内で異常タンパク質の分解にオートファジーが関与すること, さらに ER ストレスやアポトーシスの制御にオートファジーが何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

学位論文審査結果の要旨

骨芽細胞は骨基質を多量に産生しており、タンパク質合成が盛んな細胞である。このような細胞に周囲の環境要因など様々な影響によって小胞体内に異常タンパク質が蓄積すると、これを回避するために小胞体 (ER) ストレス応答が誘導される。ER ストレス応答は、異常タンパク質の分解だけでなく、骨芽細胞の分化やアポトーシスに関与することが知られており、骨芽細胞内のタンパク質分解機構の重要性が注目されている。

一方、オートファジー (AP) は栄養飢餓時に細胞内の不要物質を分解してアミノ酸供給を維持する非選択的タンパク質分解機構として知られている。近年、栄養飢餓時のアミノ酸供給だけでなく、恒常的に発現している AP が注目されおり、AP の機能低下によって細胞内に異常タンパク質が蓄積し、細胞機能が低下することが明らかとなってきている。しかし、骨芽細胞内で AP がどのように関与しているかについての報告は未だない。そのため申請者は、骨芽細胞の成熟や骨基質産生に AP が関与しているのか、また ER ストレスとどのような関係があるのかを検討した。

本研究では、まず AP マーカーである LC3 を GFP にて標識し恒常的に発現させた GFP-LC3 強制発現マウスを用い、頭蓋骨骨芽細胞層においてオートファゴソームが形成されていることを明らかにした。次に、マウス頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞を用いた *in vitro* の実験によって、骨芽細胞の成熟に伴い AP が活性化していることを見出した。さらに、ER ストレスマーカーの発現量は一旦増加するも、骨芽細胞の成熟とともに減少に転じていた。これらの結果から、骨芽細胞の成熟に伴う ER ストレスを緩和するために AP が機能している可能性が示唆された。

また、マウス頭蓋骨皮質骨内は低酸素状態であることを確認した後、単離した骨芽細胞に低酸素刺激を付与することで、AP および ER ストレスマーカーの発現量が上昇することを明らかにした。さらに、同一条件下で ER ストレス誘導性アポトーシスマーカーの発現量も著しく増加していることから、*Bax*, *Bcl2* の mRNA 発現を評価したところ、*Bax mRNA* は ER ストレスマーカーと類似した発現を呈しており、アポトーシスのミトコンドリア経路が誘導されていることが示唆された。

これらの結果から、骨芽細胞の成熟および低酸素刺激に伴い ER ストレスが誘導され、これを緩和するために AP が関与しており、ER ストレス誘導性アポトーシスの制御に AP が何らかの役割を果たしている可能性が示された。

本研究は、骨芽細胞成熟に AP が機能的に関与している事を示唆したものであり、これまで他に類似した報告は存在していない。したがって非常に新規性が高く、今後の骨代謝研究野新局面の礎となる知見であり、意義のあるものである。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。
