

論文の内容の要旨

氏名：秋山 祐子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The p75 neurotrophin receptor regulates proliferation of the MG63 osteoblastic cell line

(p75 ニューロトロフィン受容体は MG63 骨芽細胞様細胞の増殖を制御する)

p75^{NTR} は、神経成長因子受容体、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー16 および CD271 としても知られている 75 kDa の膜透過型タンパク質である。p75^{NTR} は、シュワン細胞の遊走、シナプス伝達、感覚ニューロンのカルシウムフラックス制御などに関与するとともに、細胞の死や生存あるいは軸索の伸長と抑制などといった相反する機能を調節する。これは、p75^{NTR} がチロシンキナーゼ受容体(Trks)や Nogo 受容体(NgR)など複数の共受容体と二量体を形成するためと考えられている。一方、p75^{NTR} は、骨髄、脂肪組織、臍帯における間葉系幹細胞(MSCs)を分取するための細胞表面マーカーとしても有用であり、p75^{NTR} 発現細胞は骨芽細胞への分化能が高いことも示されている。したがって、p75^{NTR} は間葉系細胞から骨芽細胞への分化に関与していると推測される。

そこで本研究では、骨芽細胞分化における p75^{NTR} の機能を明らかにするために、p75^{NTR} 共受容体の Trks と NgR をともに発現しているヒト由来の骨芽細胞様細胞(MG63 細胞)と、Trks のみを発現しているマウス由来の前骨芽細胞(MC3T3-E1 細胞)とにそれぞれ外因性 p75^{NTR} を遺伝子導入し、細胞増殖能および骨芽細胞分化能についての解析を行った。また、GDI 結合領域を欠失させた p75^{NTR} の mutant 遺伝子を作製し、NgR を発現している MG63 細胞に導入し、p75^{NTR} を介した Rho-RhoA シグナル伝達経路の解析も行った。

具体的には、ヒト p75^{NTR} およびその GDI 結合領域を欠失させた mutant p75^{NTR} をそれぞれ pIRES-Hyg にクローニングし、また、マウス p75^{NTR} を pEGFP-N1 にクローニングした。これらを用いて、ヒト p75^{NTR} を導入した MG63 細胞(p75-MG63)、mutant p75^{NTR} を導入した MG63 細胞(p75Del-MG63)およびマウス p75^{NTR} と GFP 遺伝子を導入した MC3T3-E1 細胞(p75GFP-E1)を作製した。p75^{NTR} を含まないベクターを導入したヒトあるいはマウス細胞である Mock-MG63、GFP-E1 も作製した。遺伝子導入細胞での p75^{NTR} の発現は、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) と免疫組織化学的染色によって確認し、細胞形態は鏡検で確認した。細胞増殖は血球計算板によって計測し、細胞周期については fluorescence-activated cell sorting (FACS)を用いて解析した。骨芽細胞分化能の検討、評価は、骨芽細胞分化誘導培地で最大 12 日間培養した細胞のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、alizarin red 染色性および real-time RT-PCR による mRNA 発現検索で行った。検索対象の遺伝子は、骨芽細胞転写因子(Runx2, OSX)、骨芽細胞分化マーカーである bone sialoprotein (BSP)および osteocalcin (OC)とした。

以上の実験、解析によって次のような結果が得られた。

1. p75-MG63 と p75GFP-E1 では、RT-PCR 解析の結果、明らかな p75^{NTR} mRNA の発現が検出され、免疫組織化学的には p75-MG63 と p75GFP-E1 のいずれの細胞表面にも p75^{NTR} 陽性反応の局在が認められた。遺伝子導入にともなう細胞形態の変化は観察されなかった。
2. 細胞増殖に関しては、培養 3 日目における p75-MG63 と Mock-MG63 の細胞数に有意差は認められなかったが、p75GFP-E1 の細胞数は GFP-E1 よりも有意に高値であった。FACS による細胞周期解析では、p75-MG63 と Mock-MG63 の S 期細胞の割合には明らかな差異は認められなかったが、p75GFP-E1 における S 期細胞の割合は GFP-E1 における S 期細胞の割合よりも高かった。
3. 骨芽細胞への分化誘導後 3 日目以降では、p75-MG63 と p75GFP-E1 はいずれも、p75^{NTR} を導入していない細胞よりも明らかに高い ALP 活性を認め、また、p75GFP-E1 における BSP 遺伝子発現量は、GFP-E1 よりも有意に高かった。誘導後 12 日目においては、p75-MG63 および p75GFP-E1 は、p75^{NTR} を導入していない細胞と比べて顕著な alizarin red 陽性を示す石灰化 nodule 形成が観察され、OSX および BSP の遺伝

子発現量も有意に高かった。また、p75GFP-E1におけるOC遺伝子発現量は、GFP-E1よりも有意に高かった。

4. p75Del-MG63の培養3日目における細胞数は、Mock-MG63よりも有意に高値であった。また、細胞周期の解析でも、p75Del-MG63のS期細胞の割合は、Mock-MG63におけるS期細胞の割合よりも高かった。骨芽細胞への分化誘導後では、p75Del-MG63におけるOSXおよびBSPの遺伝子発現量は、Mock-MG63よりも有意に高かった。

以上の結果は、p75^{NTR}とTrksとの共受容体を介するシグナル伝達は、細胞増殖と骨芽細胞分化を促進するが、この系を介する細胞増殖活性は、p75^{NTR}とNgRとの共受容体からのRho-RhoAシグナリング系によって抑制的に制御されていることを示唆している。