

論文の内容の要旨

氏名：築 根 直 哉

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名： lamin A とその変異体 progerin の発現が骨芽細胞分化に及ぼす影響

核ラミナは、内核膜の下面を覆うタンパク性の薄膜で、その構成タンパクには lamin A, lamin B, lamin C の3つのタイプが知られている。このうちヒト lamin A と lamin C は、ともにヒト染色体 1q21 に存在する 12 個のエクソンから成る LMNA 遺伝子の産物である。Lamin A と lamin C (lamin A/C) は LMNA 遺伝子からの alternative splicing によって転写されるため、N 末端側の 566 個のアミノ酸は共通であるが、lamin A は 664 個のアミノ酸から、lamin C は 572 個のアミノ酸からつくられる。Lamin A/C は、他の核内因子と相互作用し、核の構造を維持する他に、遺伝子の複製と発現、細胞分化の決定に関して重要な役割をしている。一方、lamin A の点突然変異体の 1 つである progerin は、遺伝性早老症の Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) の原因タンパクとして知られている。HGPS 患者の特徴として、骨形成の異常による骨格系の成長障害に加えて、骨組織における骨芽細胞と骨細胞の減少があげられる。しかし、lamin A/C が骨芽細胞分化に及ぼす影響、さらに progerin の発現に起因する骨芽細胞分化の抑制メカニズムについては不明な点が多い。本研究は、lamin A と progerin を前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 に過剰発現させることで、lamin A と progerin が MC3T3-E1 の骨芽細胞分化にどのような影響を与えるかを検討した。

第 1 章では、MC3T3-E1 の成熟骨芽細胞への分化過程における lamin A/C の発現パターンの解析および lamin A を過剰発現させたときの影響についての検討を行った。分化培地に 20 ng/ml のリコンビナント bone morphogenetic protein (BMP)-2 を添加し、MC3T3-E1 を 7, 14, 21 日間培養した後、lamin A/C の発現について real time PCR と Western blotting によって調べた。その結果、石灰化が誘導された培養 21 日目に lamin A/C の顕著な発現増加が認められた。また、estrogen 受容体アンタゴニストの fulvestrant を添加することで、BMP-2 存在下で促進した lamin A/C の発現と骨芽細胞分化の抑制が示された。次に lamin A cDNA を組込んだ発現ベクターを MC3T3-E1 に遺伝子導入し、lamin A が過剰発現する lamin A 導入細胞を樹立した。分化培地に BMP-2 を添加して 21 日間培養した結果、骨タンパクの alkaline phosphatase (ALP), type I collagen (Col1), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OC), dentine matrix protein 1 (DMP1) および骨芽細胞分化関連転写因子 Fra-1 の発現が増加し、基質の石灰化が確認された。BMP-2 存在下、lamin A 導入細胞に fulvestrant を添加して培養した結果、BSP, OC, DMP1, Fra-1 の遺伝子発現と石灰化レベルが減少した。しかし、これらの遺伝子発現と石灰化のレベルは、BMP-2 存在下に fulvestrant を添加した対照群（ベクターのみ導入）よりも高かった。すなわち、fulvestrant 存在下でも MC3T3-E1 の骨芽細胞分化を促進するには、lamin A の過剰発現が必要なことが示された。

第 2 章では、マウス lamin A の C 末端側 50 アミノ酸を欠如した progerin をコードする lamin A dC50 cDNA を MC3T3-E1 に導入し、lamin A dC50 導入細胞における骨芽細胞分化について検討した。分化培地で lamin A dC50 導入細胞を 7, 14, 21 日間培養した結果、ベクターのみを導入した対照群と比較して ALP, Col1, BSP, DMP1 と骨芽細胞分化関連転写因子 Runx2 の遺伝子発現が有意に減少した。OC と骨芽細胞分化関連転写因子 osterix (Osx) の遺伝子発現は変化しなかった。分化培地に BMP-2 を添加して lamin A dC50 導入細胞を培養したところ、Runx2 と Osx の発現減少と基質の石灰化の抑制が示された。MC3T3-E1 への lamin A dC50 の導入は、BMP-2 非存在下における β -catenin の核内移行と細胞内における active β -catenin とリン酸化 GSK-3 β の発現レベルを減少させたが、リン酸化 GSK-3 β 阻害薬 SB216763 と β -catenin 活性化剤 DCA は、lamin A dC50 の導入によって減少した ALP と Col1 の発現レベルを回復させた。

以上のことから、lamin A は MC3T3-E1 の骨芽細胞分化と石灰化を促進するために重要な役割をもつことが明らかになった。また、lamin A dC50 は初期の骨芽細胞分化と成熟骨芽細胞への最終分化を抑制することが示され、このうち初期の骨芽細胞分化では active β -catenin の発現と GSK-3 β のリン酸化レベルの抑制が関係していることが示唆された。