

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 磯 川 桂太郎

（副査） 教授 佐 藤 秀 一

教授 高 橋 富 久

教授 米 原 啓 之

核ラミナは内核膜下面を覆うタンパク性薄膜で、その構成タンパクの 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。そのため 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 個のアミノ酸から成る。Lamin A/C は核の構造維持に加え、遺伝子の複製や発現、さらに細胞分化の決定にも重要な役割を有するとされる。一方、lamin A 遺伝子変異体の 1 つである progerin は、重度の骨粗鬆症や骨変形症を伴う遺伝性早老症の Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) を発症させる。しかし、lamin A/C が骨芽細胞分化に及ぼす影響、さらに progerin の骨芽細胞分化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 をそれぞれ前骨芽細胞様株化細胞 MC3T3-E1 に過剰発現させることで、骨芽細胞分化に与える影響について検討を行っている。

第 1 章では、dexamethasone と FCS を含む α -MEM (分化培地) に bone morphogenetic protein (BMP)-2 を加えた石灰化培地で MC3T3-E1 を 7, 14, 21 日間培養し、lamin A/C の発現量を real time PCR と Western blotting によって確認している。次に lamin A を過剰発現させ、石灰化培地で 21 日間培養後、骨タンパクの alkaline phosphatase (ALP), type I collagen (Col1), bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OC), dentin matrix protein 1 (DMP1) と転写因子の Fra-1 の発現を指標にした real time PCR によって骨芽細胞分化について検討を行い、基質の石灰化は alizarin red 染色で確認している。さらに、estrogen 受容体アンタゴニストである fulvestrant を培養系に添加し、骨芽細胞分化に与える影響についても検討を加えている。第 2 章では、C 末端側 50 アミノ酸が欠損した progerin をコードする lamin A dC50 cDNA を MC3T3-E1 に遺伝子導入し、lamin A dC50 が過剰発現する細胞を作製している。この細胞を分化培地と石灰化培地を用いて 7, 14, 21 日間培養し、ALP, Col1, BSP, OC と転写因子の Runx2, osterix (Osx) の発現を指標にした real time PCR によって骨芽細胞分化について検討している。さらに lamin A dC50 が β -catenin シグナルに与える影響を調べるため、TOP/GFP 配列を利用したレポーターアッセイと Western blotting を実施し、 β -catenin の DNA 結合能、 β -catenin と GSK-3 β の発現とリン酸化とについて検討している。

その結果、以下の結論を得ている。

1. BMP-2 誘導性の骨芽細胞分化と石灰化の促進に伴って lamin A/C の発現レベルの増加が認められた。Estrogen 受容体アンタゴニストの fulvestrant はこの BMP-2 誘導性の骨芽細胞分化と石灰化を抑制した。
2. Lamin A の過剰発現は、BMP-2 存在下での ALP, Col1, BSP, OC, DMP1 および Fra-1 の発現レベルを増加させ、骨芽細胞分化を促進し、石灰化を誘導した。しかし、BMP-2 非存在下では骨芽細胞分化と石灰化を誘導することはできなかった。一方、lamin A の過剰発現下では fulvestrant 存在下においても BMP-2 誘導性の骨芽細胞分化と石灰化が認められた。
3. Lamin A dC50 の過剰発現は、BMP-2 非存在下での ALP, Col1, BSP, DMP1 と Runx2 の発現レベルを減少させた。また、BMP-2 存在下で増加した Runx2 と Osx の発現レベルを低下させ、石灰化を阻害した。

4. Lamin A dC50 の過剰発現は、 β -catenin の核内移行を抑制し、active β -catenin とリン酸化 GSK-3 β の発現レベルを低下させた。リン酸化 GSK-3 β 阻害薬 SB216763 と β -catenin 活性化剤 DCA は、lamin A dC50 の過剰発現によって減少した 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ことが明らかになった。また、lamin A dC50 が初期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。

本研究は lamin A が骨芽細胞分化を促進するメカニズムと HGPS における骨芽細胞分化抑制メカニズムの一端を明らかにしたものであり、骨代謝の研究のみならず歯周病学ならびに関連歯科領域分野の基礎研究に貢献することが大であると考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 31 年 3 月 12 日