博士（歯　学）　張　　桂　霞

学 位 論 文 題 名

Regulation of mRNA Expression of Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein(MEPE)/Osteoblast/Osteocyte Factor45(OF45) by Fibroblast Growth Factor 2 in Cultures of Rat Bone Marrow-Derived Osteoblastic Cells

（ラット骨髄由来骨芽細胞培養系における FGF 2 による MEPE/OF45 mRNA 発現の制御）

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨形成を担う骨芽細胞は，多分化能を持った未分化間葉系細胞から分化する．この分化の過程は，種々の細胞増殖因子やサイトカイン等によって調節を受け，さらにこれらの因子は骨芽細胞が産生する骨基質タンパク質の合成を調節している．骨基質タンパク質の主体をなすのはコラーゲンであり，コラーゲン以外に非コラーゲン性タンパク質と総称される一群のタンパク質が存在する．マウスにおいてこれら遺伝子群の欠失や変異により骨のリモデリングが支障をきたすことから，これらの骨基質タンパク質は石灰化の制御に関わっていると考えられる．

Extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)/Osteoblast/Osteocyte factor 45 (OF45)は，腫瘍性骨軟化症を発症する腫瘍で高発現する RGD 配列をもつ分泌性タンパク質として近年同定された．このタンパク質は，骨芽細胞と骨細胞いずれでも高い発現がみられ，骨基質中に存在しリン酸の恒常性維持や石灰化に関与すると考えられている．さらに，MEPE/OF45 遺伝子のノックアウトマウスでは，骨形成の増加ならびに石灰化の促進が報告されている．しかし，骨芽細胞におけるこの MEPE/OF45 の産生についての制御とその機構については明らかではない．

FGF2（basic FGF）は FGF ファミリーに属する細胞増殖因子の一つであり，骨基質中にも存在し，骨芽細胞が産生することや骨芽細胞の増殖を促進することが知られている．FGF ファミリーが結合するレセプターは，レセプター型チロシンキナーゼである FGFR1-4 が知られている．これらのレセプターのヒトにおける変異は，頭蓋骨癒合症を含む常染色体優性骨格形成異常疾患の原因となることが報告されている．さらに，FGF2 遺伝子のノックアウトマウスでは骨形成の減少が報告されており，FGF2 およびそのシグナリング系が骨形成に関わっていると考えられている．

本研究では，ラット骨髄由来骨芽細胞培養系を用い，FGF2 による MEPE/OF45 遺伝子発現の調節とその調節機構について調べ，骨形成における機能を明らかにすることを目的とした．

【材料と方法】

6 週齢 Wistar 系ラット大腿骨より骨髄間質細胞を採取し，1.5×10^6 cells/cm^2 の割合で播種し 10^{-8} M デキサメタゾン，1 mM β-グリセロリン酸および 50μg/ml のアスコルビン酸を含み 15% FBS を加えた培地で 1~3 週間培養した．この培養系に種々の濃度の FGF2 ならびに種々の阻害剤等を添加し，経時的に RNA を採取し mRNA 発現を RT-PCR 法，定量リアルタイム RT-PCR 法およびノーザンブロット法で測定を行った．生細胞数の測定は MTT 法を用い，細胞増殖は BrdU の取り込みを ELISA 法で調べた．また，アルカリホスファターゼ(ALP)活性測定，ALP 染色ならびに Von Kossa 染色を行った．MC3T3-E1 細胞は，1.5×10^5 cells/cm^2 の割合で播種し，10% FBS を加えた α-MEM 培地にて培養し，MEPE/OF45 mRNA を測定した．

【結果と考察】

ラット骨髄間質細胞をデキサメタゾン，β-グリセロリン酸およびアスコルビン酸を含む培地で培養後 2 週には ALP 活性が増大し，Von Kossa 染色で石灰化結節が見られた．この細胞に FGF2 を添加し 24 時間培養後の MEPE/OF45 mRNA 発現量は，FGF2 を加えないものと比べて減少し，48 時間後にはさらに減少した．この減少は FGF2 の濃度に依存した．このとき，α1(I) プロコラーゲン mRNA 発現量には変化がなかった．また，オステオカルシン mRNA 量は減少し，骨シアロタンパク質 (BSP) mRNA 量は増加した．さらに， FGF2 による MEPE/OF45 mRNA 量の減少は 0.3% FBS 存在下においても見られた．

FGF2 は骨芽細胞培養系において細胞増殖を促進することが知られているが，本研究における高密度培養のラット骨髄由来骨芽細胞培養系では，FGF2 による明らかな生細胞数および DNA 合成量は変化が認められず，細胞形態の変化も示さなかった．さらに，骨芽細胞分化に関与する転写因子である Runx2 および osterix mRNA 量は，FGF2 によって変化が見られなかった．これらの結果から，FGF2 による MEPE/OF45 mRNA 発現量の減少は，細胞増殖や転写因子に調節しない可能性があると考えられた．

また，MEPE/OF45 の mRNA 発現は，デキサメタゾン，β-グリセロリン酸およびアスコルビン酸存在下でラット骨髄間質細胞を 1~3 週培養すると，培養期間に応じて増加した．同様に 1~3 週にかけてオステオカルシン mRNA 発現量も増加した．さらに、骨芽細胞分化に関連する転写因子である Runx2 と osterix mRNA 発現も増加した．これらの結果から，骨芽細胞の分化に伴って MEPE/OF45 mRNA 発現が増加すると考えられた．この骨芽細胞の分化段階によって FGF2 による MEPE/OF45 の mRNA 発現が変化するかどうかを調べた．培養 1 週の分化段階の低い細胞でも，培養 2 週の細胞と同様に FGF2 によって MEPE/OF45 mRNA の発現は抑制された．一方，培養 3 週の成熟した骨芽細胞では MEPE/OF45 mRNA 発現は FGF2 の影響を受けなかったことから，この調節は，骨芽細胞の分化段階に依存する可能性が考えられた．さらに，マウスの MC3T3-E1 細胞においても，同様に FGF2 によって MEPE/OF45 mRNA 発現量は減少し，骨髄由来の骨芽細胞だけでなく，マウスの頭蓋骨由来の骨芽細胞にもこの調節機構が存在していることが示された．

次に，この FGF2 による MEPE/OF45 mRNA 発現の減少に関わる細胞内情報伝達の機構を調べた．RNA 転写阻害剤であるアクチノマイシン D を FGF2 とともに加えたところ，それらを加えない場合より MEPE/OF45 mRNA 量は減少した．

また、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドをFGF2とともに加えたところ，それらを加えない場合と同様にMEPE/OF45 mRNA量は減少した．しかし，MAPKの特異的阻害剤であるPD98059によって，MEPE/OF45 mRNA量の減少は阻害された，これらの結果は，FGF2は新たなタンパク質合成を必要とせず，おそらくMAPKシグナルを介してMEPE/OF45 mRNA分解を促進させることによってMEPE/OF45遺伝子発現を制御しているものと考えられた．

【結論】

ラット骨髄由来骨芽細胞系においてFGF2によりMEPE/OF45 mRNAの発現は減少した．この減少はMAPKシグナルを介し，MEPE/OF45 mRNAの分解を促進するという機序を介することが示された．本研究で明らかになったFGF2によるMEPE/OF45発現の減少は，骨組織においてFGF2によってMEPE/OF45産生が制御されることで，骨形成が調節されている可能性があると考えられた．

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　田　村　正　人

副　査　教　授　向　後　隆　男

副　査　教　授　鈴　木　邦　明

学位論文題名

Regulation of mRNA Expression of Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein(MEPE)/Osteoblast/Osteocyte Factor45(OF45) by Fibroblast Growth Factor 2 in Cultures of Rat Bone Marrow-Derived Osteoblastic Cells

（ラット骨髄由来骨芽細胞培養系における FGF 2 による MEPE/OF45 mRNA 発現の制御）

審査は，全審査委員出席のもと，学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた．学位申請者からは以下の内容の論述がなされた．

骨形成を担う骨芽細胞は，多分化能を持った未分化間葉系細胞から分化する．この分化の過程は，種々の細胞増殖因子やサイトカイン等によって調節を受け，さらにこれらの因子は骨芽細胞が産生する骨基質タンパク質の合成を調節している．Extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)/Osteoblast/Osteocyte factor 45 (OF45)は，腫瘍性骨軟化症を発症する腫瘍で高発現する RGD 配列をもつ分泌性タンパク質として近年同定された．このタンパク質は，骨芽細胞と骨細胞いずれも産生し，骨基質中においてリン酸の恒常性維持や石灰化等に機能すると考えられている．しかし，骨芽細胞におけるこの MEPE/OF45 の産生の制御とその機構については明らかではない．そこで本研究では，ラット骨髄由来骨芽細胞培養系を用い，FGF2 による MEPE/OF45 遺伝子発現の調節とその調節機構について調べ，骨形成における機能を明らかにすることを目的とした．

6 週齢 Wistar 系ラット大腿骨より骨髄間質細胞を採取しデキサメタゾン，β-グリセロリン酸およびアスコルビン酸を含み 15% FBS を加えた培地で 1~3 週間培養した．この培養系に種々の濃度の FGF2 ならびに種々の阻害剤等を添加し，経時的に RNA を採取し mRNA 発現を RT-PCR 法，定量リアルタイム RT-PCR 法およびノーザンブロット法で測定を行った．生細胞数の測定は MTT 法を用い，細胞増殖は BrdU の取り込みを ELISA 法で調べた．また，アルカリホスファターゼ(ALP)活性測定，ALP 染色ならびに Von Kossa 染色を行った．

ラット骨髄間質細胞を培養後 2 週には ALP 活性が増大し，Von Kossa 染色で石

灰化結節が見られた．この細胞にFGF2を添加し24時間後のMEPE/OF45 mRNA発現量はFGF2無添加と比べて減少した．この減少はFGF2の濃度に依存し，0.3% FBS存在下においても見られた．本研究における培養系では，FGF2による明らかな生細胞数およびDNA合成量は変化が認められず，細胞形態の変化も示さなかった．さらに，Runx2およびosterix mRNA量は，FGF2によって変化が見られなかった．また，MEPE/OF45のmRNA発現は培養期間に応じて増加し，培養1週の分化段階の低い細胞でも，FGF2によってMEPE/OF45 mRNAの発現は減少した．一方，培養3週の成熟した骨芽細胞ではFGF2の影響を受けなかった．RNA転写阻害剤もしくはタンパク質合成阻害剤を添加してもFGF2によりMEPE/OF45 mRNA量は減少した．一方，MAPKの特異的阻害剤であるPD98059によって，MEPE/OF45 mRNA量の減少は阻害された，またMC3T3-E1細胞においても，FGF2によってMEPE/OF45 mRNA発現量は減少した．

これらの結果から，MEPE/OF45 mRNA発現量は，骨芽細胞の分化に伴って増加すること，FGF2によるMEPE/OF45 mRNA発現の調節は骨芽細胞の分化段階に依存する可能性があること，FGF2はMAPKシグナルを介してMEPE/OF45 mRNA分解を促進させることでMEPE/OF45遺伝子発現を制御していることが考えられた．また，骨髄由来の骨芽細胞だけでなく，頭蓋骨由来の骨芽細胞にもこの調節機構が存在していることが考えられた．

以上の論述に引き続き，各審査委員より提出論文の内容について口頭により質疑が行われた．主な質疑項目は，糖タンパク質の糖鎖の機能，骨髄細胞培養系について，骨髄中の骨芽細胞前駆細胞の割合，使用したウシ血清濃度の理由，高密度細胞培養における増殖停止とFGF2受容体の関連，MEPE/OF45の発現組織，フォスファトニンについて，骨形成と骨芽細胞の基質産生と石灰化の関係について等であった。また，本研究の背景となる骨形成や骨吸収の機構についてなど多岐にわたる関連事項の試問も行った．学位申請者からは，いずれの質問に対しても適切かつ明快な回答が得られた．更に，今後の研究の方向性についても明確な将来の展望が示された．

本論文は，FGF2によってMEPE/OF45発現が減少することならびに骨組織においてFGF2がMEPE/OF45産生を制御し骨形成を調節する可能性を明らかにした点が評価され，この業績は，今後の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた．加えて，試問の結果より学位申請者は十分な学識を有していることが認められた．従って，学位申請者は，博士（歯学）の学位を授与されるにふさわしいと認められた．