

学 位 論 文 題 名

Regulation of osteoblastic differentiation by the
proteasome inhibitor bortezomib

(プロテアソームインヒビターBortezomibによる骨芽細胞分化の制御)

学位論文内容の要旨

ユビキチン-プロテアソームシステムは、ポリユビキチン化された標的タンパク質を ATP 依存的に分解するシステムであり、細胞周期の制御、免疫応答など様々な生命活動に重要な役割を果たしている。このシステムの一連の反応には、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の3つの酵素が関与している。なかでも、ユビキチンリガーゼ (E3) はヒトでは約 1000 種類報告されており、選択的に標的タンパク質を認識すると考えられている。ポリユビキチン化された標的タンパク質は 26S プロテアソームへと運搬され、分解される。

近年、このシステムが骨代謝にも深く関わっていることを示唆する報告がある。骨量は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって調節されている。骨芽細胞の分化と機能は、調節因子である bone morphogenetic proteins (BMPs) や Wnt、シグナル伝達分子である Smad や β -catenin、転写因子である Runx2 や ATF4 によって制御されている。Wnt/ β -catenin シグナルは骨代謝に関与していることが報告されており、Wnt シグナルが存在しない時、 β -catenin は glycogen synthase kinase (GSK) - β によるリン酸化を受けてユビキチン-プロテアソームシステムにより分解される。BMP のシグナル分子である Smad のユビキチンリガーゼ (E3) である Smurf1 のノックアウトマウスでは骨量が増加し、過剰発現させたマウスでは骨量が減少したと報告されている。また、骨芽細胞分化に必須の転写因子である Runx2 のユビキチンリガーゼ (E3) である Shn3 のノックアウトマウスでも骨芽細胞の活性が増加し、骨量が増加したと報告されている。

ユビキチン-プロテアソームシステムは様々な疾患の創薬のための標的になると考えられている。現在臨床で唯一使用されているプロテアソームインヒビター Bortezomib (Bzb) は多発性骨髄腫に有効な治療薬として認可されている。多発性骨髄腫は骨欠損を特徴とする形質細胞の悪性腫瘍であり、Bzb 投与患者では血清中のオステオカルシン発現が誘導され、骨芽細胞数が増加することが報告されている。さらに、Bzb を投与した正常マウスにおいても骨量の増加が認め

られた。Bzb は、がん細胞のアポトーシスを誘導すると共に骨量を増加させることから、骨芽細胞分化を誘導する可能性が考えられるが、その詳細な機構は明らかではない。本研究では、プロテアソームインヒビターの細胞分化に対する効果及び骨芽細胞分化に関与する種々のシグナル分子に対する影響について検討を行い、これらの骨芽細胞分化誘導の機構を解明することを目的とした。

今回用いた C2C12 細胞は未分化な間葉系細胞で、BMP2 存在下では骨芽細胞に分化し、低増殖培地で培養すると筋管細胞に分化することが知られている。C2C12 細胞培養系を用いてプロテアソームインヒビターである Bortezomib、Epoxomicin、MG-132、Lactacystin をそれぞれ加え培養し、骨芽細胞及び筋分化に関連する分化マーカーの mRNA 発現を RT-PCR や real-time PCR を用いて調べた。Bzb はオステオカルシンや ALP mRNA 発現を誘導した。一方、Bzb は筋分化に関連したマーカーである myogenin や MCK mRNA 発現を抑制し、筋管細胞の形成を抑制した。近年、miRNA 発現も細胞分化に関連していることが報告されている。miR-34b は Wnt/ β -catenin シグナルや BMP シグナルにより発現が誘導されるが、Bzb はこれらと同様に miR-34b 発現を誘導した。一方、miR-206 は C2C12 細胞を含む骨格筋にのみ発現し、筋分化に伴って発現が増加することが知られているが、Bzb は miR-206 発現を抑制した。

さらに、骨代謝に重要な役割を果たしている β -catenin/Wnt シグナルや BMP/Smad シグナル、骨芽細胞分化に関わるシグナル分子である Runx2 や ATF4 への Bzb の関与についてルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。Bzb は、Smad や β -catenin 応答レポーターの転写活性は促進せず、BMP2 や Wnt の標的遺伝子である、Id、OPG や RANKL mRNA 発現も誘導しなかった。一方、Bzb はオステオカルシンプロモーターへの転写を活性化し、オステオカルシンプロモーターの Runx2 や ATF4 結合部位を変異させたコンストラクトを用いた解析から、Runx2 結合部位の変異によって Bzb による転写活性化が失われた。Bzb の Runx2 への関与について、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) 及び Western blot によりさらに検討した。Bzb で処理した細胞では Runx2 抗体によってオステオカルシン遺伝子の Runx2 結合部位が免疫沈降され、Bzb によって Runx2 のタンパクレベルの増加が認められた。しかし、Bzb により Runx2 mRNA 発現は誘導されなかった。

本研究により、プロテアソームインヒビター Bzb は筋分化を抑制し、Runx2 のユビキチン-プロテアソームシステムによる分解を抑制することにより、骨芽細胞分化を誘導する機構が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 浪 雅 光
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Regulation of osteoblastic differentiation by the proteasome inhibitor bortezomib

(プロテアソームインヒビターBortezomibによる骨芽細胞分化の制御)

審査は、主査および副査が一堂に会し、論文提出者が論文内容の要旨を説明しながら、その内容について審査担当者が口頭試問を行った。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

ユビキチン-プロテアソームシステムは、ポリユビキチン化された標的タンパク質を ATP 依存的に分解するシステムであり、様々な生命活動に重要な役割を果たしている。このシステムの一連の反応には、ユビキチン化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の3つの酵素が関与しており、ポリユビキチン化された標的タンパク質は 26S プロテアソームと運搬されて分解される。近年、このシステムが骨代謝にも深く関わっていることを示唆する報告がある。現在、臨床で唯一使用されているプロテアソームインヒビターBortezomib (Bzb) は多発性骨髄腫に有効な治療薬として認可されている。Bzb は、がん細胞のアポトーシスを誘導すると共に骨量を増加させる報告があり、骨芽細胞分化を誘導する可能性が考えられるが、その詳細な機構は明らかではない。本研究では、プロテアソームインヒビターの細胞分化に対する効果及び骨芽細胞分化に関与する種々のシグナル分子に対する影響について検討を行い、これらの骨芽細胞分化誘導の機構を解明することを目的とした。

C2C12 細胞培養系を用いてプロテアソームインヒビターである Bortezomib、Epoxomicin、MG-132 もしくは Lactacystin をそれぞれ加え培養し、骨芽細胞及び筋分化に関連する分化マーカーの mRNA 発現を RT-PCR や real-time PCR を用いて調べた。Bzb はオステオカルシンや ALP mRNA 発現を誘導した。一方、Bzb は筋分化に関連したマーカーである myogenin や MCK mRNA 発現を抑制し、筋管細胞の形成を抑制した。また、近年、miRNA 発現も細胞分化に関連している

ことが報告されている。Bzb は筋分化に関連する miR-206 発現を抑制し、骨芽細胞分化に関連する miR-34b 発現を誘導した。さらに骨芽細胞分化に関わるシグナル分子である Runx2、Smad、 β -catenin や ATF4 への関与についてルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。Bzb は、Smad や β -catenin 応答レポーターの転写活性は促進せず、BMP2 や Wnt の標的遺伝子の mRNA 発現も誘導しなかった。一方、Bzb はオステオカルシンプロモーターへの転写を活性化した。オステオカルシンプロモーターの Runx2 や ATF4 結合部位を変異させたコンストラクトを用いた解析から、Runx2 結合部位の変異によって Bzb による転写活性化が失われた。Bzb の Runx2 への関与について、クロマチン免疫沈降法及び Western blot によりさらに検討した。Bzb で処理した細胞では Runx2 抗体によってオステオカルシン遺伝子の Runx2 結合部位が免疫沈降され、Runx2 のタンパクレベルの増加が認められた。

本研究により、プロテアソームインヒビターBzb は筋分化を抑制し、Runx2 のユビキチン-プロテアソームシステムによる分解を抑制することにより、骨芽細胞分化を誘導する機構が考えられた。

各審査委員からの主な質疑項目は、以下である。

1. ユビキチン-プロテアソームシステムにおける創薬のターゲットについて
2. Bzb による筋分化抑制について
3. 20S プロテアソームの $\beta 5$ サブユニットと各種プロテアソームインヒビターの関連性について
4. ユビキチンリガーゼ (E3) の多様性と選択性について
5. Bzb の多発性骨髄腫に対する作用について
6. miRNA について
7. Id の役割について
8. オステオカルシンの機能について
9. クロマチン免疫沈降法の原理について

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、研究の立案と進行、結果の解析について十分な能力を有していると考えられた。

本論文は、Bzb が Runx2 のユビキチン-プロテアソームシステムによる分解を抑制することにより、骨芽細胞分化を誘導する機構を明らかにした点が評価され、この業績は今後の生命科学の研究の発展や創薬に大きく寄与するものと考えられた。また、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。