

論文審査の要旨

報告番号	総研第 607 号	学位申請者	八尋 雄平
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学)
	副査	谷本 昭英	副査 橋口 照人
	副査	宮田 篤郎	副査 柴田 昌宏

BMP-induced Atoh8 attenuates osteoclastogenesis by suppressing Runx2 transcriptional activity and reducing the Rankl/Opg expression ratio in osteoblasts

(BMP 標的遺伝子の Atoh8 は骨芽細胞内での Runx2 転写活性や Rankl/Opg 発現を減弱させることで破骨細胞分化を抑制する)

BMP は Adult の骨モデリング期においては骨細胞で Sost の発現を誘導し骨吸収に促進的に働くが、幼弱な骨芽細胞や骨髄間質細胞での働きには不明な点が多い。そこで学位申請者らは BMP の骨形成と分化に関わる遺伝子の働きについて解析した。BMP による骨髄間質細胞 ST-2 の遺伝子の発現変化をマイクロアレイで、Atoh8 の発現制御については ChIP、qPCR とルシフェラーゼアッセイを、Atoh8 の骨形成の作用について Atoh8 ノックアウト (KO) マウスと野生型マウスでの骨の形態と数量的評価、関連する遺伝子の発現を比較した。これらのマウス由来の初代骨芽細胞に対する BMP による骨分化関連遺伝子発現変化を調べた。ST-2 細胞と骨芽細胞用細胞 MC3T3-E1 細胞を用いて Atoh8 のノックダウンと過剰発現による骨形成と Runx2 の発現変化を調べた。Runx2 と Atoh8 のタンパク質相互作用は Cos7 細胞を用いて免疫沈降後のウェスタンブロットで調べた。

その結果、以下の知見が得られた。① ST-2 細胞への BMP-2 の添加後 48 時間で Atoh8 遺伝子の発現は上昇し、その発現は BMP-Smad 経路の直接的な制御を受けていた。② Atoh8 KO マウスでは 8 週齢で大腿骨の海綿骨では骨密度、骨量が減少した。しかし、骨形成能の低下はなく、骨吸収が増加していたが、初代骨髄細胞のみ抽出した破骨細胞分化では差が認められず、骨髄間質細胞や骨芽細胞が発現する Rankl/Opg 比が上昇した。③ ストローマ細胞と骨髄細胞の共培養の系では Atoh8 KO マウスのストローマ細胞の Rankl/Opg 比が上昇し、破骨細胞分化は亢進していた。④ Atoh8 KO マウス由来の初代骨芽細胞では野生型に比べて RUNX2 の発現が高まっており、骨分化は劇的な亢進が観察された。⑤ Atoh8 KO マウス由来の未分化初代骨芽細胞では野生型に比べて Rankl/Opg 比が増加していた。⑥ ST-2 細胞の BMP-6 添加後に Atoh8 と Runx2 を共にノックダウンすると si-Atoh8 のみでは上昇した Rankl/Opg 比が低下し、Runx2 の発現が Rankl/Opg 比に関与した。⑦ Runx2 の結合配列である osteoblast specific element に対する転写活性はヒト ATOH8 で導入量依存的に低下し、免疫沈降の結果から Runx2 は ATOH8 の HLH 部分と結合していた。

正常な骨のリモデリングにおいて、Runx2 は骨芽細胞の分化を促進するが、同時に Rankl/Opg 比を促進し結果的に破骨細胞の分化誘導も進め骨吸収にも作用する。BMP シグナルは Atoh8 を直接誘導して、Atoh8 と Runx2 は結合し、その転写因子活性を抑制する。その結果 Rankl/Opg 比は適度に抑制され、骨吸収が行き過ぎないように制御していると考えられる。一方、Runx2 の発現量は Runx2 自体による制御によって促進されるが、Atoh8 はこれを抑制する。Atoh8 の欠失は Runx2 の発現が暴走し、Runx2 トランスジェニックマウスで見られるような Rankl/Opg 比の上昇を招き骨吸収が亢進する。BMP シグナルの主な働きは骨細胞において Sost の誘導を介して Rankl/Opg 比の増加と骨吸収促進だが、学位申請者らの研究から同時に幼弱な骨芽細胞において Atoh8 の誘導を介して Rankl/Opg 比と骨吸収を抑制していることが明らかになった。この結果は骨形成と維持における Atoh8 の機能の重要性を明らかにしたもので大変興味深い。本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。