

論文審査の要旨

報告番号	①・乙 第 2977 号	氏名	長山 和弘
論文審査担当者	主査 教授 高見 正道 副査 教授 美島 健二 副査 教授 山本 松男		
(論文審査の要旨)			
<p>学位申請論文「Formation of 8-nitro-cGMP in osteocytic cells」について、上記の主査1名、副査2名が個別に審査を行った。</p> <p>骨細胞は骨へのメカニカルストレスに応答する機能を有し、一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO)はその過程において重要な役割を担っている。NO シグナルには、可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化を経て cGMP 依存的シグナルを伝える経路と、NO が酸素や活性酸素種と反応して生じる活性窒素種がタンパク質や核酸などの生体分子をニトロ化、ニトロソ化および酸化する経路がある。最近、これらのシグナルにより 8-ニトログアノシン 3', 5'-環状一リン酸 (8-nitro-cGMP) という下流シグナル分子が作られることが発見された。そこで本研究では、骨細胞における 8-nitro-cGMP の生成とその機能について解析をおこなった。</p> <p>骨細胞様細胞株である Ocy454 細胞内と骨組織における 8-nitro-cGMP の産生を免疫染色法で検出した。8-nitro-cGMP を細胞培養系に添加すると、タンパク質のグアニル化が認められた。さらに、骨代謝調節因子である副甲状腺ホルモン (PTH)やプロスタグランジン E₂ (PGE₂)の刺激により Ocy454 細胞中で 8-nitro-cGMP の産生量が増加した。8-nitro-cGMP を細胞培養系に添加しても PTH と PGE₂ によるスクロスチンや RANKL 遺伝子の発現レベルに影響を及ぼさなかったため、スクロスチンや RANKL の遺伝子発現制御は 8-nitro-cGMP に非依存的であることが示唆された。骨細胞は骨へのメカニカルストレスを感知し破骨細胞分化を調節すると言われている。本実験で、PTH などの骨代謝調節因子が骨細胞中での 8-nitro-cGMP の産生やタンパク質のグアニル化を促進したことから、8-nitro-cGMP が何らかの形で骨代謝に関与していると推察される。</p> <p>本論文の審査において、副査の美島委員および山本委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p>美島委員の質問とそれらに対する回答:</p> <p>1. 骨で NO 産生に関与する経路は何が考えられるか述べてよ。 NOS には nNOS、eNOS、iNOS の三種類のアイソフォームが存在している。骨における NOS の発現には以前から様々な報告がある。NOS アイソフォームは全て骨にも発現していることがわかっている。eNOS ノックアウトマウスではエストロゲンの反応低下が認められ雌マウスでは軽度骨粗鬆症の様態を呈したという報告がある。また、メカニカルストレスを受けた骨芽細胞と骨細胞では eNOS による NO 産生が起きることが報告されている。</p> <p>2. 実験系として NOS を骨細胞に強制発現して NO を産生する系は考えなかったのか。 NOS の強制発現の系も考えるべきだった。あるいは NO ドナーの投与をすべきであった。nNOS、eNOS はカルシウム依存性であり、iNOS は非依存性である。今回の実験では NOS の強制発現は行っていないが、シグナル伝達の下流に Ca を持つ PTH、PGE₂ による刺激で nNOS、eNOS を、また、炎症生サイトカインの刺激で iNOS の発現を上昇させる培養系を用い、抗 8-nitro-cGMP 抗体にて免疫染色を行った。その結果 PTH、PGE₂ では 8-nitro-cGMP の生成が上昇したが、炎症生サイトカインでは変化は見られなかった。このことから、本実験で</p>			

用いた細胞においては、iNOS よりも nNOS、eNOS が影響を及ぼしやすいのではないかとということが示唆された。これは、メカニカルストレス誘導性 NO 産生が調節される機序を解明するために行った過去の実験で、ラットの長骨膜骨芽細胞および皮質骨骨細胞の異なる集団で発現される優勢な NOS アイソフォームが、内皮型 NOS (eNOS) であるとする報告があることと矛盾していない。

山本委員の質問とそれらに対する回答:

1. どうして骨細胞において、炎症生メディエーターである PGE₂ では 8-nitro-cGMP の生成は上がるが、炎症性サイトカインの TNF- α や IL-1 β ではそうならなかったと考えられるか。

NOS には nNOS、eNOS、iNOS の三種類のアイソフォームが存在している。nNOS、eNOS はカルシウムイオン依存性に NO を産生する。iNOS はカルシウム非依存性に NO を産生する。PTH、PGE₂ の下流のシグナルにはカルシウムイオンがあり、本実験では、骨細胞様細胞 Ocy454 において、炎症性サイトカインにより誘導される iNOS よりも nNOS あるいは eNOS が iNOS より優位に発現したため、相対的に 8-nitro-cGMP の生成量も多くなったと考えられる。

2. Osteocyte は一般的にメカニカルストレスを感受して、細胞機能が変わるといわれている。本研究では *Sost*, *Rankl*, *Opg* を主として観察しているが、次に行う研究として観察すべき因子は何か。

メカニカルストレスを受けた骨細胞では *Sost* (Sclerostin 遺伝子) の発現が低下することがよく知られており、本研究では *Sost* および破骨細胞誘導因子として *Rankl*, *Opg* を解析した。しかし、骨細胞で発現している因子はそれだけではなく、骨細胞は骨芽細胞からの分化の過程で様々な因子を発現している。骨細胞分化の初期の段階では E11/gp38 や MT1-MMP という分子が生成されており、これらは骨細胞の突起や細管などの形態維持に関与していることが報告されている。同じ時期には PHEX、MEPE という分子が産生されており、これは中期に産生される DMP1 と同様に骨のミネラル代謝に関与する。また、後期骨細胞では Sclerostin の他に FGF23 というタンパク質が産生されている。これは骨のリン酸恒常性に関与することが知られている。また、骨細胞と骨芽細胞のネットワークに重要な役割を示す細胞間のギャップ結合を担う Connexin43(Cx43) はメカニカルストレスとの関係性が深い。これらの因子と 8-nitro-cGMP の相関関係を解析することは骨におけるレドックス研究にとって重要であるかもしれない。

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

主査 高見委員の質問とそれらに対する回答:

1. 生体恒常性維持における 8-nitro-cGMP の役割について述べよ。

8-nitro-cGMP は cGMP 依存性タンパク質キナーゼ(PKG)を活性化し、cGMP 依存性のシグナルを伝達する。細胞内の cGMP はホスホジエステラーゼ(PDE)によって分解されるが、8-nitro-cGMP は PDE の基質にならない。

8-nitro-cGMP は細胞内のタンパク質のシステイン残基に cGMP を結合させるタンパク質 S-グアニル化というタンパク質修飾を行うことにより、様々な機能を発揮する。実際には、細胞防御、オートファジーの促進、神経伝達物質分泌促進、内軟骨骨化の促進などに関わる。

2. 免疫染色と SDS-PAGE で用いた二つの抗体とそれに対する二次抗体の特性について説明せよ。

抗 8-nitro-cGMP 抗体は、マウスの monoclonal 抗体で、cAMP やグアノシンなどの構造の類似した分子とは反応せず、抗原特異性が高い。抗 S-グアニル化抗体は、ウサギの polyclonal 抗体であり同様に抗原特異性が高いと報告されている。

主査の高見委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士(歯学)の学位授与に値するものと判断した。

(主査が記載)