

| | |
|--------------|---|
| Title | 骨形成因子BMPによる骨形成促進におけるSmad8の役割の研究 |
| Author(s) | 河合, 伸治 |
| Citation | 大阪大学, 2002, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/2369 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 かわい しんじ 河合伸治

博士の専攻分野の名称 博士(学術)

学位記番号 第 17198 号

学位授与年月日 平成 14 年 5 月 10 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文名 骨形成因子 BMP による骨形成促進における Smad8 の役割の研究

論文審査委員 (主査)

教授 米田 俊之

(副査)

教授 天野 敦雄 教授 村上 伸也 助教授 松本 憲

論文内容の要旨

[緒言]

骨格を構成する骨は常に吸収と形成を繰り返しながらその体積、強度を維持している。骨吸収は破骨細胞、そして骨形成は骨芽細胞によって行なわれるが、近年の骨粗鬆症患者の急増に伴い、骨量回復に直結する骨形成に対する関心がより高まっている。骨形成において中心的役割を演じる骨芽細胞は骨髄に存在する未分化間葉系細胞が様々なサイトカインの影響を受けながら分化することによって形成される。これらのサイトカインの中でも、骨形成因子 Bone Morphogenetic Protein (BMP) は、*in vivo*、*in vitro* を問わず未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を誘導することにより強力に骨形成を促進することが知られている。しかしながら、その作用メカニズムに関しては未だ不明な点が多く残されている。本研究においては BMP による骨形成促進作用の分子メカニズムを解明する目的で、BMP の細胞内シグナルに関与する分子の同定を行ない、その分子の生化学的機能および BMP の生物学的作用発現における役割について検討した。

[方法]

細胞内シグナル分子をコードする遺伝子は、PCR を用いたスクリーニング法により、マウス胎仔胚 cDNA ライブラリーからクローニングした。BMP 刺激によるシグナル伝達は、免疫沈降、抗リン酸化セリン抗体などを用いたウェスタンブロッティングにより検討した。細胞核への移行は免疫蛍光染色法により観察した。転写因子活性の検討には、個体発生における背腹の中胚葉形成に関与しているホメオボックス遺伝子 *Xvent2* のプロモーター領域をルシフェラーゼレポーターに連結したベクターを使用した。また、BMP-2 により誘導される遺伝子群の解析には GeneChip を用いた。未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化はアルカリホスファターゼ (ALP)、オステオカルシン、骨芽細胞特異的転写因子 *Cbfa1* などを指標として検討した。

[結果]

マウス胎仔胚 cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行なった結果、BMP によって活性化されるシグナル分子 *Smad1* および *Smad5* と高い構造類似性を有する *Smad8* をクローニングできた。*Smad8* は種々の組織に広汎に発現されていたが、前立腺で特に高く、一方、骨格筋での発現は弱かった。恒常的活性型 BMP レセプター ALK2、ALK3 および ALK6 は、*Smad8* のセリン残基をリン酸化し、リン酸化された *Smad8* は共有型 *Smad* である *Smad4*

と物理的に結合した。さらに、リン酸化により Smad8 は細胞質から核に移行することも示された。また、Smad8 の過剰発現は BMP により誘導される Xvent2 遺伝子プロモーターの転写を活性化し、この Smad8 の効果は Smad4 の存在により相加的に増強された。GeneChip を用いて、BMP-2 によって誘導されるいくつかの遺伝子を同定し、これらの遺伝子の発現に対する Smad8 の効果を調べたところ、Smad8 は Smad4 存在下で BMP-2 と同様に、これらの遺伝子の発現を誘導した。Smad8 は BMP の標的細胞である骨芽細胞系の細胞に発現されており、特に BMP によって骨芽細胞への分化が誘導される線維芽細胞 C3H10T1/2 あるいは初代培養骨芽細胞において高い発現が認められた。また骨芽細胞系細胞の特性を秘めている C2C12 細胞に Smad8 を高発現させると ALP および Cbfa1 の発現が高まり、骨芽細胞への分化が誘導された。これに対して Smad8 変異体は BMP-2 によって誘導される C2C12 細胞の骨芽細胞への分化を抑制した。

[考察]

マウス Smad8 は恒常的活性型 BMP レセプターによりリン酸化され、共有型 Smad4 と結合した後、核へ移行することから、BMP シグナル伝達分子であることが明らかとなった。レポーターアッセイの結果から Smad8 は転写因子としての機能を有し、BMP シグナルの下流に存在する遺伝子の転写活性調節にも関与することが示された。さらに、Smad8 は骨芽細胞で高レベルに発現され、ALP や Cbfa1 などの骨芽細胞分化マーカーの発現を誘導し、一方、Smad8 変異体は骨芽細胞の分化を阻害することから、骨形成に深く関与することが判明した。以上の結果より、BMP による骨形成促進過程において、Smad8 は BMP の作用発現に重要な役割を果たすシグナル伝達分子であることが示唆された。本研究の結果は複雑かつ多様な骨形成促進作用の分子メカニズムを解明するうえで有用な情報を提供するのみならず、将来において骨粗鬆症などの骨量減少をきたす代謝性骨疾患治療薬の開発にも役立つと期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は強力な骨形成促進因子である BMP の分子作用メカニズムを解明する目的で、Smad8 の役割について検討したものである。

その結果、シグナル伝達分子マウス Smad8 が新規にクローニングされ、マウス Smad8 は BMP の骨形成促進作用発現に密接に関与することが明らかとなった。

本研究により BMP の骨形成促進作用のメカニズムの一端が解明され、この知見は骨の形成様式の解明に寄与するものである。

よって本研究は博士（学術）を授与するに値するものと認める。