



Title	平滑筋特異的遺伝子に関する分子遺伝学的研究：平滑筋カルポニン遺伝子の骨形成過程における新機能の発見
Author(s)	山村，倫子
Citation	大阪大学，1999，博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155601
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	山 村 倫 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 4 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 2 月 3 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	平滑筋特異的遺伝子に関する分子遺伝学的研究 —平滑筋カルボニン遺伝子の骨形成過程における新機能の発見—
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西 原 力 (副査) 教 授 溝 口 正 教 授 前 田 正 知 教 授 淡 田 修 久

論 文 内 容 の 要 旨

血管内皮細胞が傷害剥離されたり高脂血症の病態が続くと、血管の中膜平滑筋が脱分化して合成型平滑筋となり、内膜に向かって遊走・増殖する。増殖した合成型平滑筋と線維化組織よりなる動脈硬化巣（プラーク）は古くなると石灰化を来し、不安定となる。プラークの破裂は心筋梗塞の引きがねになる。Virchow はこの石灰化病変は骨化であると指摘しているが、最近、脱分化した平滑筋細胞に、骨細胞に発現する遺伝子である osteopontin, osteonectin, matrix Gla protein や骨形成因子（Bone Morphogenetic Protein; BMP）が発現することが報告された。

平滑筋の収縮型から合成型へのフェノタイプ変換のメカニズムを解明する方法として、収縮型および合成型平滑筋のそれぞれの細胞で発現している遺伝子の中から、フェノタイプ変換に伴って発現が変化する遺伝子をスクリーニングする differential hybridization 法がある。1993年 Shanahan らは培養細胞系でこの方法を用いて、合成型平滑筋細胞で発現が低下する遺伝子群に、カルボニンと SM22 α があることを明らかにした。カルボニンは、平滑筋細胞のアクチン、カルモデュリン結合蛋白として、1986年に高橋らがニワトリ砂囊平滑筋からはじめて単離精製した。SM22 α はカルボニンのN末端側 2/3 と60%の相同性をもつカルボニンホモログである。

本研究では、ヒトカルボニンと SM22 α 遺伝子をクローニングし、両遺伝子の発現とその制御機構を検討した。また、カルボニン遺伝子の発現変化が、細胞機能にどのような影響を与えるかを検討するために同遺伝子のノックアウトマウスを作製した。

ヒト動脈硬化病変におけるカルボニン蛋白と SM22 α 蛋白の発現を免疫組織学的に検討すると、脱分化した平滑筋細胞で両蛋白の発現低下が認められた。この結果は、Shanahan らが in situ hybridization 法を用いてヒト動脈硬化病変を解析し、両遺伝子の mRNA レベルでの発現低下を示した結果とよく一致している。

次に、フェノタイプ変換に伴う、両遺伝子の発現低下のメカニズムを明らかにするために、カルボニンと SM22 α 遺伝子をヒトゲノムライブラリーからクローニングし、プロモーター領域を解析した。カルボニン遺伝子の-559～+154の領域は、5' プロモーター領域と 5' 非翻訳領域および蛋白翻訳領域を含むが、この塩基配列は、Bird らによって1994年に同定されたメチル化 CpG 結合蛋白 (MeCP2) アフィニティーカラムに結合する DNA フラグメントの配列と完全

に一致した。プロモーター領域の DNA メチル化は、その遺伝子の転写効率を低下させる。また、DNA のメチル化によるプロモーター活性の抑制は、メチル化された CpG 配列に直接結合する MeCP2 を介して行なわれることが報告されている。カルポニン遺伝子のプロモーター領域に MeCP2 結合配列が存在することと、SM22 α 遺伝子の転写に重要な CARG/SRF-box の周囲に CpG 配列が集中して存在することから、カルポニンと SM22 α 遺伝子のプロモーター活性が DNA のメチル化により調節されている可能性が考えられた。*in vitro* メチル化アッセイ法を用いて、両遺伝子プロモーターの転写活性がプロモーター領域の CpG 配列のメチル化によって抑制されることを明らかにした。

動脈硬化で骨芽細胞のマーカーを発現する細胞があること、また、骨肉腫で平滑筋のマーカーである平滑筋 α アクチンが発現していることなどから、平滑筋と骨芽細胞が細胞系列の上で関係していることが推測される。そこで、骨芽細胞におけるカルポニンと SM22 α 遺伝子の発現を検討したところ、両遺伝子が骨肉腫細胞株と骨肉腫組織で発現していることを見出した。さらに、17例の骨肉腫症例を最長6年半経過観察し、両遺伝子の骨肉腫での発現と骨肉腫患者の予後との相関を検討した。カルポニン陽性例10例と陰性例7例に分けて Kaplan-Meier 法で解析すると、カルポニン陽性例は、陰性例に比し有意に生存率が高かった。一方、SM22 α の発現と予後との相関は認められなかった。また、骨肉腫培養細胞株である HOS 細胞から MNNG-HOS 細胞への悪性化に伴ってカルポニンの発現が消失することから、カルポニン遺伝子に腫瘍細胞の転移や腫瘍形性能を抑制する作用があることが推測された。最近、Jiang らはアデノウイルスベクターを用いてニワトリ砂囊カルポニンの cDNA をウシの線維芽細胞と平滑筋細胞にトランスフェクションし、遊走と増殖を抑制し得ることを報告している。

次に、カルポニン遺伝子の発現低下が *in vivo* での細胞機能にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、同遺伝子のホモ型欠失マウスを作製し、その表現型を解析した。ホモ型欠失マウスには致死性はなく外観は野性型と変らなかったが、骨膜骨芽細胞の増殖を伴う骨の横径成長の亢進が認められ、骨芽細胞機能のマーカーである血清アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が上昇していた。骨組織および骨芽細胞におけるカルポニン遺伝子の発現を検討すると、胎児期の幼若な骨芽細胞に最も強く発現していた。ホモ型欠失マウスでは、受精後12.5~14.5日の胎児で軟骨および骨形成の促進が認められた。

BMP は未分化な間葉系細胞に作用し、骨形成を誘導することが知られている。ヒト組換え体 BMP-2 (rhBMP-2) のアテロコラーゲンペレットを作製し、ホモ型欠失マウスと野性型マウスの背部筋膜下へ移植したところ、ホモ型欠失マウスで骨形成の亢進が認められた。また、胎児大腿筋より未分化な間葉系細胞を分離し rhBMP-2 を添加すると、ホモ型欠失マウスでは骨芽細胞への分化が亢進し、カルポニン遺伝子が BMP による間葉系細胞から骨芽細胞への分化を抑制することが明らかになった。

動脈硬化における骨形成のメカニズムや、BMP の細胞内シグナル伝達経路については、未だ不明な点が多い。今回の筆者の実験結果は、動脈硬化における血管病変の病態解明や、BMP の細胞内シグナル伝達機構の解明に役立つものと思われる。また、カルポニン遺伝子の発現抑制は、内在性 BMP や組み換え体 BMP に対する骨芽細胞の応答性を高めることが予想されるので、骨折治癒など、骨形成を促進する新しい治療法の開発に寄与するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

山村君は、動脈硬化などの血管の老化に着目して、平滑筋特異遺伝子、ヒト塩基性カルポニン遺伝子とヒト SM22 α 遺伝子に関して分子遺伝学的研究を行った。その結果、先ず両遺伝子をクローニングし、その転写がメチル化によって制御されており、さらに平滑筋細胞だけではなく未分化な骨芽細胞や骨肉腫細胞でも発現されていることを示した。カルポニン遺伝子のホモ型欠失マウスを作成したところ、骨の横径成長や胚発生過程での軟骨および骨形成の促進がみられ、インビボで骨芽細胞の増殖や分化が抑制されていることがわかった。これは培養細胞の系(インビトロ)でも確認された。

以上の成果は、細胞内シグナル伝達機構の一端を明らかにしたものであり、学術的にも高く評価されるだけではなく、臨床的にも遺伝子治療による骨折の予防や治癒促進への応用をも期待させるものであり、博士(薬学)学位論文として充分価値あるものと認められる。