

Title	内軟骨性骨化における軟骨細胞の増殖, および分化に対するBMPシグナルの役割に関する研究
Author(s)	椋代, 義樹
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41525">https://hdl.handle.net/11094/41525</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	橘 代 義 樹
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 14539 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学基礎系専攻
学位論文名	「内軟骨性骨化における軟骨細胞の増殖、および分化に対する BMP シグナルの役割に関する研究」
論文審査委員	(主査) 教授 米田 俊之  (副査) 教授 作田 正義    講師 岩本 容泰    講師 村上 伸也

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

内軟骨性骨化において、軟骨細胞は基質産生、増殖を通じて成熟し、肥大化、石灰化の後、アポトーシスにより死滅し、骨へと置換される。この一連の内軟骨性骨化過程において、軟骨細胞の増殖、分化は様々なサイトカインによって制御されている。そのようなサイトカインの中でも、Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーに属する Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) は *in vivo* において軟骨形成を経る異所性骨形成を強力に促進し、胚発生中の肢芽の軟骨膜および軟骨細胞に強く発現されていることが示されている。さらに、*in vitro* においても、培養軟骨細胞の軟骨基質合成および、最終分化形質発現などを大きく増加させることが知られている。

BMP はその生物学的作用を発現する場合、まずセリン/スレオニンキナーゼ活性を持つ II 型の BMP 受容体 (BMPR) に結合し活性化させ、続いて I 型受容体を活性化することにより細胞内に BMP シグナルを伝達する。しかし、BMP による軟骨細胞の増殖、分化の促進と BMP シグナル伝達系の活性化との関連性についてはほとんど不明である。

本研究において、1) 培養軟骨細胞に BMP シグナル伝達に必要なセリン/スレオニンキナーゼドメインを欠失した支配的欠損型 BMPR 遺伝子を導入することにより、BMP シグナル伝達を遮断した場合、あるいは、2) I 型受容体のキナーゼドメインを点変異させた構成的活性型 BMPR を導入することにより、BMP シグナルを恒常的に活性化させた場合に、軟骨細胞の増殖、分化、およびアポトーシスに対して、どのような変化が誘導されるのかを調べることに、内軟骨性骨化の鍵を握る軟骨細胞における BMP シグナルの役割を検討した。

#### 【実験方法】

軟骨細胞は17日齢鶏胚の胸骨軟骨の上部1/3より、最終分化形質を発現している成熟軟骨細胞 (US) を、また下部1/3より、最終分化形質を発現していない未成熟軟骨細胞 (LS) をそれぞれ分離し、10%ウシ胎児血清を含むハイグルコース DMEM 中で培養した。これらの細胞における BMP あるいは BMP 受容体遺伝子の発現は RT-PCR により検索した。BMPRI 型 A タイプ (BMPRI-A)、BMPRI 型 B タイプ (BMPRI-B) および、BMPRII 型 (BMPRII) のセリン/スレオニンキナーゼを含む細胞内部位を欠失させ、*myc* エピトープを付与した支配的欠損型 BMPR (dn-BMPRI-A, -B, -II) 遺伝子、あるいは、キナーゼ部位の GS 領域を点変異させ、ヘマグルチニン (HA) エピトープ

プを付与した構成的活性型 BMPR (ca-BMPR-IA, -IB) 遺伝子を組み込んだニワトリレトロウイルス (RCAS virus) を構築し、これらのウイルスを軟骨細胞に感染させた。ウイルスの感染は、感染一週間後の軟骨細胞に抗ウイルス gag タンパク抗体による免疫染色により、また、導入した遺伝子の発現は、dn-BMPRs については抗 *myc* 抗体、ca-BMPRs については抗 HA 抗体を用いた免疫染色により確認した。細胞増殖の指標として DNA 定量、プロテオグリカン合成の指標として硫酸化グリコサミノグリカン (GAG) 定量、アルシアンブルー染色、およびアグリカン遺伝子の発現を検索した。最終分化形質発現の指標として、アルカリホスファターゼ (ALPase) 活性の測定と染色、および X 型コラーゲン遺伝子の発現を解析した。さらに他の軟骨分化の指標として、I 型および II 型コラーゲン遺伝子の発現を検討した。軟骨細胞の石灰化は、 $\beta$ -グリセロリン酸存在下で培養することにより誘導し、アリザリンレッド染色により確認した。アポトーシス検索には TUNEL 染色を用いた。

#### 【結果】

- 1) 軟骨細胞は BMP 2, 4, 7 および BMPR-IA, -IB, -I の遺伝子を発現していた。
- 2) ウイルスを感染させた軟骨細胞の90%以上の細胞は抗ウイルス gag 抗体に陽性であった。dn-BMPRs 感染群の80%以上の細胞は抗 *myc* 抗体に、ca-BMPRs 感染群の細胞の80%以上は抗 HA 抗体にそれぞれ陽性を示した。
- 3) dn-BMPR-II の強制発現は軟骨細胞の形態を線維芽細胞様に変化させ、細胞増殖を促進した。一方、軟骨細胞の分化の指標である硫酸化 GAG 合成、X 型コラーゲン遺伝子の発現を強く阻害し、最終分化の指標である X 型コラーゲン遺伝子の発現および ALPase 活性をも強く抑制した。dn-BMPR-IA あるいは dn-BMPR-IB を強制発現させた場合にも、程度は弱い軟骨細胞の分化は抑制された。
- 4) ca-BMPR-IA, あるいは -IB を強制的に発現させた場合、LS においては細胞増殖が抑制され、一方、硫酸化 GAG 合成、X 型コラーゲン遺伝子の発現、ALPase 活性、石灰化は促進させた。これらの作用は ca-BMPR-IA により強く認められた。
- 5) US においては、ca-BMPR-IA 感染群の細胞はほとんど増殖せず、アポトーシスを示す細胞が多数観察された。一方、ca-BMPR-IB 感染群では細胞の増殖はほとんど影響を受けず、アポトーシスを示す軟骨細胞も少数しか観察されなかった。ca-BMPR-IA, および -IB は US の硫酸化 GAG 合成、X 型コラーゲン遺伝子の発現および ALPase の活性にはほとんど影響を及ぼさなかった。

#### 【結論および考察】

本研究の結果より、支配的欠損型 BMP 受容体の強制発現により軟骨細胞内の BMP シグナル伝達を遮断すると、軟骨細胞の分化マーカーが抑制され、これに関連して、増殖の停止の阻害、並びに最終分化形質の発現が抑えられることが示された。一方、構成的活性型 BMP 受容体の強制発現により BMP シグナル伝達を活性化すると、軟骨細胞の最終分化は亢進され、同時に、アポトーシスも誘導されることが示された。これらの結果より、BMP シグナルは軟骨細胞の分化形質の維持、細胞増殖の制御、最終分化の誘導、およびアポトーシスの誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。

軟骨組織の発生においては、軟骨前駆細胞に BMPR-IB が発現し、軟骨細胞の成熟、肥大化に伴って BMPR-IA の発現が強くなることが報告されている。本研究において、BMPR-IB を介したシグナルが軟骨細胞の分化形質発現の維持および最終分化に至るまでの過程の誘導に重要であること、および BMPR-IA を介した BMP シグナルの構成的活性化が軟骨細胞の最終分化ステップであるアポトーシスを誘導することが示された。これらの結果より、BMPR-IA と BMPR-IB は各々 BMP の異なる作用の発現に関与していることが示唆される。すなわち、内軟骨性骨化において、BMPR-IB を介する BMP シグナルは軟骨細胞の脱分化を防ぎ、特異的分化形質発現の維持に、また、BMPR-IA を介する BMP シグナルの活性化は軟骨細胞を最終分化段階に押し進めることに、各々より密接に関与すると推察される。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、内軟骨性骨化の鍵を握る軟骨細胞における骨形態形成タンパク（Bone Morphogenetic Protein, BMP）シグナルの役割を検討することを目的として、培養軟骨細胞に BMP 受容体の変異遺伝子を導入することにより、BMP シグナルを遮断あるいは恒常的に活性化させ、軟骨細胞に誘導される変化を解析したものである。

その結果、BMP シグナルは軟骨細胞の分化形質の維持、細胞増殖の制御、最終分化の誘導、及びアポトーシスの誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

本研究は BMP シグナルによる骨格の制御機構の一端を解明した、価値あるものである。

従って、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。