

Title	Domain-specific Mutations of a Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1 Latency-associated Peptide Cause Camurati-Engelmann Disease Because of the formation of a Constitutively Active Form of TGF- $\beta$ 1
Author(s)	齊藤, 貴志
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43733">https://hdl.handle.net/11094/43733</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#"></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	齊藤貴志
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16819 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究生体制御医学専攻
学位論文名	Domain-specific Mutations of a Transforming Growth factor(TGF)- $\beta$ 1 Latency-associated Peptide Cause Camurati-Engelmann Disease Because of the Formation of a Constitutively Active Form of TGF- $\beta$ 1. (TGF- $\beta$ 1 Latency-associated peptide の部位特異的変異による TGF- $\beta$ 1 の恒常的活性化が、Camurati-Engelmann 病の原因である。)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之  (副査) 教授 中村 敏一      教授 高井 義美

## 論文内容の要旨

## 【目的】

transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) は、骨組織において、骨芽細胞と破骨細胞の働きを制御することにより骨の形成と吸収を調節することが知られている。2000年に、長骨骨幹の異形成を特徴とする常染色体優性疾患 Camurati-Engelmann 病 (CED) の原因遺伝子が、9つの血縁関係のない CED 家系の連鎖解析により、TGF- $\beta$ 1 latency-associated peptide ( $\beta$ 1-LAP) であることが明らかとなった (Nature Genetics, 2000, 26, 19-20)。本研究は、CED の病態解明を目的として、CED 患者でみられた  $\beta$ 1-LAP の遺伝子変異 (CED 変異) がもたらす影響について生化学的に解析を行った。

## 【方法ならびに成績】

まず CED 患者で見られた  $\beta$ 1-LAP の各ミスセンス変異体 (R218H、R218C、C225H) の hydropathy plot を行った結果、正常なものと比較して、TGF- $\beta$ 1 との結合部位周辺の構造不安定性が示唆された。そこで、最も重篤な症状を示す R218H 家系患者と健康人の皮膚線維芽細胞を用いて pulse-chase 法による  $\beta$ 1-LAP の代謝動態について解析を行った。TGF- $\beta$ 1 は、その成熟型 (活性型) への変換機構として、 $\beta$ 1-LAP と TGF- $\beta$ 1 および latent TGF- $\beta$ 1 binding protein (LTBP) から成る潜在型 3 者複合体 (large latent form) として分泌され、LTBP が分離した後 (small latent form)、 $\beta$ 1-LAP も外れて成熟型 TGF- $\beta$ 1 へと変換され生理作用を示すようになる。CED 患者由来の皮膚線維芽細胞では健康人由来のものと比較して、large latent form の発現量、分泌量などに差がないにも関わらず、small latent form が欠失していることが明らかになった。また、それぞれの細胞の培養上清中の TGF- $\beta$ 1 量を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により定量した結果、R218H 患者由来の皮膚線維芽細胞では健康人由来のものと比較して、5 倍以上の TGF- $\beta$ 1 が検出された。さらに、昆虫細胞による再構成系を用いて R218H、R218C、C225H の  $\beta$ 1-LAP 変異タンパク質を作成した結果、変異型  $\beta$ 1-LAP と TGF- $\beta$ 1 との結合が減少し、TGF- $\beta$ 1 が潜在型 (small latent form) として保持されないことが明らかとなった。

次に、CED 変異が及ぼす細胞への影響について検討を加えた。R218H の変異をもつ患者由来の皮膚線維芽細胞の細胞増殖は、健康人由来のものと比較して減少しており、正常皮膚線維芽細胞に CED の変異遺伝子を導入した細胞においても増殖の抑制が見られた。この増殖抑制は TGF- $\beta$ 1 に対する中和抗体、もしくは皮膚線維芽細胞での TGF-

$\beta 1$ の発現を抑制する薬剤であるデキサメタゾン进行处理することで回復した。さらに、骨芽細胞株 MG-63と R218H 皮膚線維芽細胞を共培養すると、正常皮膚線維芽細胞と共培養した場合と比較して骨芽細胞の増殖の亢進が確認された。この増殖亢進は、デキサメタゾンで処理することで抑制できた。

#### 【総括】

部位特異的な CED 変異は、 $\beta 1$ -LAP と TGF- $\beta 1$ の結合部位におけるコンフォメーション変化を引き起こし、潜在型 TGF- $\beta 1$ 複合体が形成されなくなり、成熟型 TGF- $\beta 1$ が増加する結果、TGF- $\beta 1$ の恒常的活性化を引き起こすことが明らかとなった。この TGF- $\beta 1$ の活性化が、骨組織における骨芽細胞の増殖亢進を起し、過剰な骨形成に至ると考えられる。これらの知見は、CED の病態を説明するだけにとどまらず、TGF- $\beta 1$ が、骨幹のモデリング／リモデリングの調節において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

#### 論文審査の結果の要旨

Camurati-Engelmann 病 (CED) は、長骨骨幹の異形成を特徴とする常染色体優性疾患である。申請者らは、その原因遺伝子が transforming growth factor (TGF) - $\beta 1$  latency-associated peptide ( $\beta 1$ -LAP) の部位特異的なミスセンス変異であることを明らかにした。TGF- $\beta 1$ は、骨組織において骨の形成と吸収を調節することが知られており、その活性調節は  $\beta 1$ -LAP により非常に厳密に制御されている。申請者は、CED 患者でみられた遺伝子変異 (CED 変異) による TGF- $\beta 1$ の機能について生化学的に解析を行った。結果、CED 変異による  $\beta 1$ -LAP の構造不安定性が TGF- $\beta 1$ の恒常的活性化を引き起こし、その恒常的活性化が骨芽細胞の増殖および活性化を引き起こすことを明らかにした。さらに、CED 変異による TGF- $\beta 1$ の活性化が、デキサメタゾンや TGF- $\beta 1$ に対する中和抗体で抑制できることを明らかにし、CED 治療における明確な方向性を示した。これらの結果は、これまで不明であった CED の病態を説明するものであると考えられる。また、普遍的に生体内に存在する  $\beta 1$ -LAP/TGF- $\beta 1$ の部位特異的な変異によって骨特異的な疾患をおこすことは非常に興味深く、骨粗鬆症のような骨リモデリング異常に関しても TGF- $\beta 1$ およびそのシグナル系が重要な働きをもつことが予想され今後の骨疾患研究において新たな提言を示すものと考えられる。以上のように本研究は、CED のみならず他の骨疾患等にも広く貢献するものであり、博士 (医学) の学位授与に値するものと認められる。