

Title	Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia
Author(s)	堀木, 充
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45490">https://hdl.handle.net/11094/45490</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"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	堀 木 充 <sup>ほり き みつる</sup>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 9 4 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 6 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科先端応用医学専攻
学 位 論 文 名	Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia (内軟骨性骨化における Smad6/Smurf1 の役割の解明)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 秀樹  (副査) 教 授 大藁 恵一 教 授 平野 俊夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目的]

骨形成因子 (BMPs) は内軟骨性骨化に重要な役割を果たしており、BMPs のアンタゴニストである noggin をトランスジェニックマウスにおいて軟骨特異的に発現させると、軟骨の形成、分化が抑制される。BMPs の細胞内シグナルは主に Smad 蛋白によって伝達されることが明らかにされてきた。即ち、BMP レセプターは BMP リガンドが結合することで活性化し、特異型 R-Smad (Smad1/5/8) をリン酸化する。リン酸化された特異型 Smad は核内に移行し、種々の遺伝子の転写を活性化させる。一方、抑制型 Smad である Smad6 は BMP レセプターとの相互作用において特異型 Smad と競合し、特異型 Smad のリン酸化を阻害して Smad 蛋白による BMP シグナルを阻害する。また Smad ubiquitin regulatory factor-1 (Smurf1) は Smad6 と相互作用を行うことで BMP レセプターをユビキチン化して分解し、結果として BMP シグナルを阻害する。これらのことは主に生化学的解析によって明らかにされてきたが、生体内軟骨性骨化における Smad や Smurf 蛋白の役割については未だよくわかっていない。そこで我々は軟骨特異的に Smad6 と Smurf1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスをそれぞれ作製・解析したので報告する。

#### [方法ならびに成績]

軟骨特異的発現を得るために XI 型コラーゲン  $\alpha 2$  鎖遺伝子の promoter/enhancer 配列を用いた。この配列に Smad6 あるいは Smurf1 cDNA を結合して transgene を用意し、Smad6 transgenic mice と Smurf1 transgenic mice を作製した。

##### ・ Smad6 transgenic mice の表現型

生後 3 週で体重は Normal mice に比べ 30% 小さく小人症様変化を呈した。上腕骨近位部を Micro CT で解析したところ、骨量が著しく減少していた。

##### ・ Smad6 transgene の発現

免疫組織化学的解析において transgene は軟骨特異的に発現しており、骨には発現を認めなかった。また軟骨において BMP で誘導される Smad1/5/8 のリン酸化が低下しており、Smad pathway が抑制されていると考えた。

##### ・ Smad6 transgenic mice における骨量減少の検討

テトラサイクリン/カルセインラベリングによる骨形態計測を行った。Smad6 transgenic mice では Normal mice に比べて骨形成能は低下し、骨吸収能は亢進していた。しかしながら大腿骨骨髓からの破骨細胞培養では、Normal mice と Smad6 transgenic mice との間で破骨細胞の数および機能に差を認めなかった。よって Smad6 transgenic mice における骨形成/吸収機能の異常の原因は骨髓に無く、transgene の発現パターンを併せると軟骨にあると考えた。

#### ・ Smad6 transgenic mice における軟骨細胞分化の検討

BrdU ラベリングによる検討で、胎生期、生後ともに Smad6 transgenic mice と Normal mice との間で増殖軟骨細胞層における BrdU 陽性細胞数に差を認めなかった。よって Smad6 の過剰発現は軟骨増殖に影響しないと結論した。一方、胎生期における軟骨細胞の分化/肥大化は Smad6 transgenic mice で数日遅延していた。そして生後は Smad6 transgenic mice で肥大軟骨細胞数が減少していた。Smad6 transgenic mice 軟骨原基の器官培養では、BMP2 によって誘導される軟骨の増殖は正常であったが、肥大軟骨細胞層の形成は著明に抑制されていた。これらの結果から Smad6 は BMP によって誘導される軟骨細胞の肥大化を抑制し、肥大軟骨細胞数を減じると考えた。Smad6 transgenic mice における骨形成/吸収能の異常は、肥大軟骨細胞層の低形成に伴う血管形成因子などの産生低下によって引き起こされるのではないかと推測した。

#### ・ Smurf1 transgenic mice の表現型

Smurf1 transgenic mice は正常であった。しかし、Smad6 transgenic mice とかけ合わせると、軟骨増殖は影響されないが、内軟骨性骨化は Smad6 transgenic mice に比べても更に遅延した。このことから Smurf1 は生体において Smad6 の機能を増強すると考えた。

#### [総括]

Smad6 transgenic mice とその metatarsal explants を使った器官培養から、Smad pathway は Smurf1 と協調して生体内において軟骨細胞の肥大化を調節していることが明らかとなった。肥大化の抑制は引き続き骨形成を障害することが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

内軟骨性骨化において骨形成因子は重要な働きをしているが、生体内においてその細胞内シグナルである Smad や Smurf の働きは明らかになっていない。そこで Smad シグナルをブロックする働きをもつ Smad6, Smurf1 を軟骨特異的に発現させたトランスジェニックマウスを作成し軟骨への影響を検討した。Smad6 transgenic mice は生後 3 週で体重は Normal mice に比べ 30% 小さく小人症様変化を呈した。上腕骨近位部を Micro CT で解析したところ、骨量が著しく減少していた。骨量減少をさらに詳しく解析するため、テトラサイクリン/カルセインラベリングによる骨形態計測を行った。Smad6 transgenic mice では Normal mice に比べて骨形成能は低下し、骨吸収能は亢進していた。しかし大腿骨骨髓からの骨髄細胞培養では、骨芽細胞、破骨細胞の機能は正常であった。よって Smad6 transgenic mice における骨形成/吸収機能の異常の原因は骨髓に無く、transgene の発現パターンを併せると軟骨にあると考えた。軟骨増殖については BrdU ラベリングによる検討で、Smad6 transgenic mice と Normal mice との間で軟骨の増殖には差を認めなかった。よって Smad6 の過剰発現は軟骨増殖に影響しないと結論した。一方、軟骨細胞の分化/肥大化は Smad6 transgenic mice でその出現が遅延していた。また生後は Smad6 transgenic mice で肥大軟骨細胞数が減少していた。

Smad6 transgenic mice の軟骨原基の器官培養では、BMP2 によって誘導される軟骨の増殖は正常であったが、肥大軟骨細胞層の形成は著明に抑制されていた。これらの結果から Smad6 は BMP によって誘導される軟骨細胞の肥大化を抑制し、肥大軟骨細胞数を減じると考えた。Smad6 transgenic mice における骨形成/吸収能の異常は、肥大軟骨細胞層の低形成に伴う血管形成因子などの産生低下によって引き起こされるのではないかと推測した。

Smurf1 transgenic mice は正常であったが、Smad6 transgenic mice とかけ合わせると、軟骨増殖は影響されないが、内軟骨性骨化は Smad6 transgenic mice に比べても更に遅延した。このことから Smurf1 は生体において Smad6 の機能を増強すると考えた。

以上のことから、Smad6 transgenic mice とその軟骨原基を使った器官培養から、Smad pathway は Smurf1 と協調して生体内において軟骨細胞の肥大化を調節していることが明らかとなった。肥大化の抑制は引き続き骨形成を障害することが示唆された。

以上の論文に対して博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。