

Title	Ihhにより誘導される骨芽細胞分化過程における転写因子Gh2の機能および発現の制御メカニズムの解明
Author(s)	和田, 誠大
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47616
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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 **和 田 誠 大**

博士の専攻分野の名称 **博 士 (歯 学)**

学 位 記 番 号 **第 2 1 0 6 0 号**

学 位 授 与 年 月 日 **平成 19 年 3 月 23 日**

学 位 授 与 の 要 件 **学位規則第 4 条第 1 項該当**

歯学研究科統合機能口腔科学専攻

学 位 論 文 名 **Ihh により誘導される骨芽細胞分化過程における転写因子 Gli2 の機能および発現の制御メカニズムの解明**

論 文 審 査 委 員 **(主査)**

教 授 米 田 俊 之

(副査)

教 授 恵 比 須 繁 之 助 教 授 小 野 高 裕 講 師 前 田 隆 史

論 文 内 容 の 要 旨

<目的>

骨芽細胞は、未分化間葉系細胞を起源として、その分化、成熟および機能は BMP、TGF β 、IGF、ヘッジホッグ、Wnt などの様々なサイトカイン、ならびにこれらのサイトカインにより制御される細胞内シグナル伝達分子や Runx2 などの転写因子により調節されている。これらサイトカインの中でも、近年ヘッジホッグファミリーに属するインディアンヘッジホッグ (Ihh) の骨芽細胞分化における役割の重要性が注目されている。しかしながら、その分子作用メカニズムは明らかにされていない。本研究では、Ihh シグナルにおいて中心的役割を果たす、細胞内シグナル伝達分子 Gli2 の骨芽細胞分化に対する役割を検討し、Ihh による骨形成制御の分子メカニズムの解明を試みた。

<実験方法>

1. 細胞

サイトカイン処理、あるいは遺伝子導入により骨芽細胞に分化誘導できる未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞を主に用いた。

2. Gli2 の発現動態および Gli1 の発現誘導の検討

C3H10T1/2 細胞を、リコンビナント Ihh で処理、あるいはアデノウイルスベクターを用いて、Gli2 およびドミナントネガティブ型 Gli2 (DN-Gli2) を発現させ、RNA を抽出後、RT-PCR により検討した。

3. 骨芽細胞分化における Gli1 および Gli2 の役割の検討

C3H10T1/2 細胞にアデノウイルスベクターを用いて Gli1、Gli2、DN-Gli2 および DN-Gli1 を過剰発現させた後、骨芽細胞への分化はアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性およびオステオカルシン、ALP、骨シアロ蛋白質 (BSP) の発現により評価した。また生後 3 日齢 DDY マウス頭蓋骨より採取した初代培養骨芽細胞を用いて、アリザリンレッド染色により石灰化を評価した。

4. Gli2 誘導性骨芽細胞分化におけるユビキチン化の役割の検討

Myc 標識した Gli2 と、Flag 標識した β Trcp1、あるいは Fbox 欠失型 BTrcp1 (DN- β Trcp1) を細胞に遺伝子導入し、免疫共沈降法により評価した。また C3H10T1/2 細胞にアデノウイルスベクターを用いて DN- β Trcp1 を過剰発現させた後、ALP 活性により評価した。

5. β Trcp1 ユビキチン化システムに対する Ihh の役割の検討

C3H10T1/2 細胞に Ihh を添加したのち、抗セリンリン酸化 GSK-3 β 抗体を用い、ウエスタンブロット法により検討した。

<結果>

1. Gli1、Gli2 の発現

C3H10T1/2 細胞は Gli2 を恒常的に発現していたが、Gli1 の発現は見られなかった。しかし、Ihh 添加、あるいは Gli2 の過剰発現により発現が誘導された。DN-Gli2 の過剰発現により Ihh シグナルの活性化を遮断すると、Gli1 の発現誘導は抑制された。

2. 骨芽細胞分化における Gli1 および Gli2 の作用

Gli1 および Gli2 の過剰発現は ALP 活性を誘導した。さらに、初代培養骨芽細胞に Gli1 を過剰発現させると、石灰化が促進された。また Gli1 の過剰発現はオステオカルシン、ALP および BSP の発現を誘導した。

3. Gli2 のユビキチン化と骨芽細胞分化

ユビキチン化によるタンパクの分解は様々な生物学的反応の制御に関与することが知られている。ユビキチンリガーゼ β Trcp1、あるいは DN- β Trcp1 は Gli2 と物理的に結合することが示された。また DN- β Trcp1 の過剰発現により Gli2 の分解を抑えると、Gli2 の骨芽細胞分化促進作用が著明に増強された。

4. ユビキチン化に対する Ihh の作用

Ihh はユビキチン化に関与する細胞内シグナル分子 GSK3 β のセリンリン酸化を促進した。

<結論・考察>

本研究結果より、Gli2 が未分化間葉系細胞の骨芽細胞分化を促進すること、Gli2 が Gli1 の発現を誘導すること、ならびに Gli1 が骨芽細胞分化誘導作用を有することが明らかとなった。また Ihh が β Trcp1 の上流で機能する GSK-3 β の活性を阻害することにより、ユビキチン化による Gli2 の分解を抑制し、骨芽細胞分化を増強することが初めて見出された。以上の結果より、Ihh による未分化間葉系細胞の骨芽細胞分化誘導には細胞内シグナル分子 Gli2 の発現と分解が密接に関与することが示唆された。本研究結果は骨量減少を来す骨疾患に対し有効な治療法を確立するための有用な科学的指針になると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究においては、強力に骨形成を促進するサイトカインであるインディアンヘッジホッグ (Ihh) の分子作用メカニズムについて検討を行った。

その結果、Ihh は転写因子 Gli2 の活性化促進、ならびに Gli2 を介する転写因子 Gli1 の発現誘導、またユビキチン化による Gli2 の分解を抑制することにより、骨芽細胞分化を促進することが示された。

本研究は、Ihh による骨形成促進における新規の分子細胞生物学的メカニズムを明らかにしたものであり、博士(歯学)の学位授与に値すると認める。