The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Intracellular signal cascade involved in the NELL1-induced osteoblastic differentiation
Author(s)	朴井, 伸行
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48807
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【59】

氏　　名	朴　井　伸　行（ぼく　い　のぶ　ゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２１７７４　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Intracellular signal cascade involved in the NELL1-induced osteoblastic differentiation （NELL1 による骨分化誘導に含まれる細胞内シグナルカスケード）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　谷澤　克行 （副査） 教　授　岡田　雅人　　教　授　関口　清俊　　准教授　黒田　俊一

論 文 内 容 の 要 旨

散発性頭蓋骨癒合症（Craniosynostosis, CS）患者の癒合部位で発現上昇している遺伝子として単離されたヒト *NELL1* 遺伝子は、全長 810 アミノ酸残基の Laminin G ドメイン、vWF C ドメイン、EGF 様ドメインを有する細胞外タンパク質をコードしていた。*NELL1*-TG マウスは CS 様の症状を呈し、*NELL1*-KO マウスは頭蓋骨と脊柱の骨形成が阻害され、さらに NELL1 発現アデノウイルスにより頭蓋骨、脊柱、骨盤欠損部位での骨再生効果が確認されたことから、NELL1 が強力な骨誘導分子であることが強く示唆されていた。しかしながら、骨芽細胞における NELL1 受容体並びに NELL1 の関与するシグナルカスケードに関しては明らかになっていなかった。本研究では、ヒト *NELL1* 遺伝子を安定発現する高分泌発現用昆虫細胞を樹立し、アフィニティクロマトグラフィーを用いてヒト NELL1 タンパク質を高度に精製し、各種骨芽細胞に作用させ、惹起するシグナルカスケードを検討した。NELL1 は骨分化マーカーである Alkaline Phosphatase、Osteopontin、Osteocalcin の発現を誘導した。さらに、コラーゲンシートに浸潤させた NELL1 タンパク質は、頭蓋骨欠損及び大腿骨欠損モデルマウスにおいて、投与４～６週間後に、顕著な骨再生を誘導した。以上から、NELL1 タンパク質は強力な骨誘導能を有することが確認された。また、各種骨芽細胞において、ERK、JNK、p38 を短時間で活性化した。特に、NELL1 による Osteopontin の誘導には ERK と JNK の活性化は必須であった。一方、NELL1 は、BMP により活性化される Smad 群に対して全く影響を与えなかった。さらに、NELL1 により活性化された ERK は、骨誘導関連遺伝子群の発現に深く関与する転写因子 Cbfa1 をリン酸化することも判明した。以上から、NELL1 タンパク質は骨誘導活性を有する細胞外因子であり、BMP とは異なり Smad カスケードを介さず、MAPK カスケードの活性化を通して骨誘導能を発現することが明らかになった。NELL1 タンパク質は骨形成因子であり細胞外で作用すること、並びに MAPK カスケードを活性化することから、NELL1 が含まれるシグナルカスケードには、細胞膜近傍のチロシンキナーゼが含まれると推測された。そこで、RFC 細胞を NELL1 で刺激し、直ちに NELL1 を免疫沈降して、リン酸化チロシン抗体で検出を試みた。その結果、刺激後５分間でリン酸化チロシン残基を含む複数のタンパク質（45、55、200 kDa）が誘導されていた。一方、NELL1 は ErbB1-4 レセプターと相互作用しないことも判明している。以上から NELL1 レセプターは未同定であるが、受容体型チロシンキナーゼ、もしくは共役タンパク質がチロシンキナーゼであると推察される。そして、Ras-MAPK カス

ケードを経て Runx2/Cbfa1 等の骨関連転写因子群を活性化し、Osteopontin 等の骨分化関連遺伝子発現を誘導するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

朴井伸行君は、昆虫細胞を用いて NELL1 タンパク質の分泌発現系を構築するとともに、均一に精製した同タンパク質が各種骨芽細胞及び骨欠損モデル動物において強力な骨誘導活性を示すことを明らかにした。また、骨芽細胞内において、NELL1 は Smad カスケードではなく、MAPK カスケードを活性化し、骨分化誘導の中心的役割を担う転写因子 Runx2 のリン酸化や各種骨分化マーカー遺伝子の発現を誘導することを示した。さらに、骨芽細胞を NELL1 で刺激すると、数分以内に NELL1 を含むシグナル分子複合体中のタンパク質のチロシン残基がリン酸化されることも見出し、NELL1 レセプターは、それ自身が受容体型チロシンキナーゼか、共役タンパク質としてチロシンキナーゼを含む可能性を示した。本研究の成果は、NELL1 タンパク質の調製法を確立し、新しい骨形成因子としての生理機能を明確に示しただけでなく、同因子が関与する細胞内シグナル伝達機構の概略を解明した点で高く評価できる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。