



Activations of ERK1/2 and JNK by Transforming growth factor β negatively regulate smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells

宗和, 秀明

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2680

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002680>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 74 】

氏 名 ・(本 籍) 宗和 秀明 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1469号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当

学位授与の 日 付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

Activation of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor β negatively regulates
Smad3-induced alkaline phosphatase activity and
mineralization in mouse osteoblastic cells.

(マウス骨芽細胞におけるTGF β 依存性 ERK1/2 MAPキナーゼ及び
JNK は Smad3 による ALP 活性及び石灰化促進へ negative signal を送る)

審 査 委 員

主 査 教 授 千原 和夫

 教 授 前田 盛

 教 授 春日 雅人

Transforming growth factor (TGF) β は臓器の中でも骨組織に最も豊富に貯蔵され、in vivoで局所投与すると骨形成を刺激する等骨形成促進作用を有すが、その機序は不明である。近年SmadはTGF β の細胞内情報伝達を媒介する因子として発見された。Smadは現在までに8種類同定されており、TGF β 系ではSmad2、3、TGF β スーパーファミリーに属すBMPの情報伝達にはSmad1,5,8が特異的とされる。TGF β が、アクチビンと共有する受容体、TGF β 受容体2型に結合すると、2型受容体は1型受容体のGS領域をリン酸化し活性化する。次に活性化された1型受容体は受容体特異的SmadであるSmad2及び3のc端に位置するMH2領域内のモチーフSSXS部をそのセリンスレオニンキナーゼ活性によりリン酸化する。なおこれらのSmadの1型受容体へのリクルートは膜直下に存在するSARAによって行われる。活性化された受容体特異的Smad2、3は共通型SmadであるSmad4と複合体を形成し、核移行の後に標的遺伝子の転写調節に預かる。すなわち、Smadは細胞質においては細胞内情報伝達分子として機能し、核内においては転写調節因子として機能する。またこれらの情報伝達に対して、抑制型Smad6、7は負の調節をかけることや、TGF β 受容体の下流でSmad以外の経路も存在することが報告されている。ところで骨芽細胞においてSmad2は骨肉腫細胞株の分化を抑制するという報告は既になされているが、Smad3の骨芽細胞における役割の詳細は未だ不明であり、これを解明する目的でSmad3を過剰発現させた骨芽細胞様細胞においてその増殖、骨基質蛋白発現並びに石灰化の変化を検討した。

マウス骨芽細胞様MC3T3-E1細胞にベクターのみ、Smad3、MH2部を欠くSmad3 Δ Cをtransfectionし、G418により選択、恒常的発現株を作製した。細胞増殖は 3 H-thymidine (TdR)法及びMTT法により検討した。I型collagen(COL I)及びosteopontin(OPN)の発現はNorthern Blot法を用いて検討した。ALP活性は免疫組織化学及び生化学的に評価した。石灰化能は β グリセロリン酸及びアスコルビン酸存在下に3週間培養し、Alizarin法とvon Kossa法により評価した。Western Blot法によりSmad3及びSmad3 Δ C過剰発現株を確認した。

Smad3過剰発現株は対照に比し、細胞増殖が有意に抑制された。Smad3発現はCOL I及びOPNmRNA発現を促進した。このことより、Smad3は骨基質蛋白発現を促進することが示唆された。一方、Smad3過剰発現はALP活性及び石灰化能を著明に促進し、これらはCOL I産生阻害剤により有意に阻害された。以上よりSmad3はCOL I産生を介したALP活性上昇及び石灰化促進作用を有することが示唆された。Smad3 Δ C株では、Smad3のこれらの作用を認めなかった。

以上のことからSmad3は骨芽細胞様細胞において、石灰化を促進し、その機序としてCOL I及びALPが関与することが示唆された。またSmad3遺伝子欠損マウスは骨量減少を来すという近年の報告からもSmad3が骨形成において重要な因子であり、骨芽細胞における骨形成機構を解明する手がかりとなる可能性が考えられた。

TGF β はMC3T3-E1細胞において、COL Iの産生を促進するが、ALP活性及び石灰化を抑制することが知られている。すなわちMC3T3-E1細胞でSmad3がTGF β とは逆にALP活性及び石灰化を促進することが明らかとなった。この差異を生じる原因として、(1) TGF β 受容体の下流でSmad以外の経路が、Smad経路に負の調節シグナルを送る可能性、(2) TGF β はCOL Iの産生を促進し、COL I- α 2 β 1インテグリン相互作用がALP活性を亢進させることが報告されているが、Smad3はCOL Iの産生を促進するのみならずCOL I- α 2 β 1インテグリン相互作用をも促進する可能性、並びに(3) 骨肉腫細胞株ではTGF β はALP活性を亢進させ、私共が使用したMC3T3-E1細胞は正常な骨芽細胞に近い性質を有しているのでSmad3が細胞のtransformされた状態によって機能が変化する可能性などが考えられた。今回は、TGF β とSmad3によるALP活性及び石灰化に及ぼす影響の差異について、(1)の観点からアプローチした。すなわち、骨芽細胞においてTGF β により活性化されるMAPキナーゼ(MAPK)の役割を検討した。

TGF β はP42/44、P38 MAPK (P42/44、P38)及びJNKを活性化した。なお、TGF β による

P42/44、P38及びJNKの活性化は、dominant negative型のSmad3 Δ Cを一過性に過剰発現させた細胞でも生じた。このことより、TGF β によるP42/44、P38及びJNKの活性化は、Smad3細胞内情報伝達系非依存的に生じることが示唆された。TGF β によるALP活性及び石灰化に対する抑制作用はP42/44特異的阻害剤(PD98059 (PD)、U0126)及びJNK阻害剤(curcumin (Cur)、dicumarol (DC))により完全に阻害されたが、P38特異的阻害剤(SB203580)は影響を及ぼさなかった。一方Smad3安定過剰発現により促進されたALP活性及び石灰化はP42/44及びJNK阻害剤により更に促進され、SB203580により阻害された。更にSmad3特異的response elementを含む3TP-luxを用いたLuciferase assayにおいてP42/44及びJNK阻害剤はTGF β 及びSmad3による転写活性促進を増強した。依ってTGF β はP42/44及びJNKを介してSmad3 pathwayにnegative signalを送ることによりALP活性及び石灰化を抑制することが示唆された。TGF β のI型コラーゲン発現促進作用に対し、CurはTGF β の作用を阻害したがPDは阻害しなかった。このことからTGF β により活性化されるP42/44及びJNKについて、TGF β の有す骨形成促進作用をより強く引き出すのはJNK阻害剤よりはむしろP42/44阻害剤であると考えられた。以上の結果より、骨芽細胞においてTGF β の細胞内情報伝達系には、二つの互いに非依存的に活性化される経路が存在すること、すなわち骨形成を促進するSmad3経路及びこれに負の調節シグナルを送ることにより骨形成を負に調節するP42/44及びJNK経路である。なお、P38経路はTGF β によりSmad3非依存的に活性化されるもののSmad3によるALP活性や石灰化促進の機序には促進的に機能する可能性がある。しかしながら、今回のTGF β とSmad3によるALP活性や石灰化に対する異なる調節の機構を説明する経路ではないと考えられた。まとめるとTGF β 受容体の下流に存在する同化シグナルと異化シグナルのバランスにより適切な骨芽細胞分化や増殖が調節され、骨のモデリング並びにリモデリングの一部の機構を構成することが示唆された。また、骨形成促進機構においてSmad3が重要な分子であることが重ねて強く示唆され、臨床的な観点からもP42/44阻害剤の利用は局所においてTGF β の骨形成促進作用を増強する治療戦略となる可能性がある。(以上)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1466 号	氏名	宗和秀明
論文題目	<p>Activation of ERK1/2 and JNK by transforming growth factor β negatively regulates Smad3-induced alkaline phosphatase activity and mineralization in mouse osteoblastic cells.</p> <p>マウス骨芽細胞における TGFβ 依存性 ERK1/2 MAP キナーゼ及び JNK は Smad3 による ALP 活性及び石灰化促進へ negative signal を送る</p>		
審査委員	<p>主 査 千原和夫</p> <p>副 査 前田 盛</p> <p>副 査 春日 雅人</p>		
審査終了日	平成 15 年 2 月 3 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

申請者の所属する Ca 骨代謝グループは以前より骨のリモデリングにおいて主役を成す骨芽細胞、破骨細胞、間質細胞など関与する細胞間の連絡を取り持つ液性因子について研究を続けている。今回、申請者はそれらの中で、骨組織に豊富に貯蔵され局所投与によって骨形成促進作用を示す Transforming Growth Factor- β (TGF- β) に焦点を当て、TGF- β およびその細胞内情報伝達媒介因子の Smad の骨芽細胞に対する作用機序を明らかにすることを試みた。

まず、マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に、ベクターのみ、Smad3、Smad3 の C 端に位置し活性に必須である MH2 部を欠く Smad3 Δ C をそれぞれ transfection し G418 により選択、恒常的発現株を作製したところ、Smad3 過剰発現株では対照に比し細胞増殖が有意に抑制されていたが、I 型 collagen(COL1) 及び osteopontin(OPN) mRNA の発現は促進され、またアルカリフォスファターゼ(ALP)活性及び石灰化能が著明に促進していた。これらの効果が COL1 産生阻害剤により有意に阻害されたことより、Smad3 は COL1 産生を介して ALP 活性上昇及び石灰化促進作用を示すことが示唆された。Smad3 Δ C 株では Smad3 によるこれらの作用を全く認めなかった。一方、TGF- β は MC3T3-E1 細胞において COL1 の産生を促進するが、ALP 活性及び石灰化に対しては逆に抑制をかけることが知られている。MC3T3-E1 細胞で Smad3 が TGF- β とは逆に ALP 活性及び石灰化を促進する今回の成績を説明しうる機序の可能性として TGF- β 受容体の下流で Smad 以外の経路が、Smad 経路に負の調節シグナルを送る可能性を考え、次に骨芽細胞において TGF- β により活性化される MAP キナーゼ (MAPK) の役割を検討した。TGF- β は MC3T3-E1 細胞において P42/44, P38MAPK(P42/44, P38) 及び JNK を活性化した。一方、TGF- β による P42/44, P38MAPK(P42/44, P38) 及び JNK の活性化は dominant negative 型の Smad3 Δ C 過剰発現株でも見られた。これは TGF- β による P42/44, P38MAPK(P42/44, P38) 及び JNK の活性化が Smad3 の関与する系とは独立して起こることを示唆している。TGF- β の ALP 活性及び石灰化抑制作用は P42/44 特異的阻害剤(PD98059 (PD), U0126) 及び JNK 阻害剤(curcumin(Cur), dicumarol(DC)) により完全に阻害されたが、P38 特異的阻害剤(SB203580)は影響を及ぼさなかった。一方 Smad3 安定過剰発現により促進された ALP 活性及び石灰化は P42/44 及び JNK 阻害剤により更に促進され SB203580 により阻害された。更に Smad3 特異的 response element を含

む 3TP-lux を用いた luciferase assay 系において P42/44 及び JNK 阻害剤は TGF- β 及び Smad3 による転写活性促進を増強した。これらの成績より TGF- β は P42/44 及び JNK を介して Smad3 pathway に抑制のシグナルを送ることにより ALP 活性及び石灰化を抑制することか示唆された。また TGF- β の I 型コラーゲン発現促進作用に対し、Cur は TGF- β の作用を阻害したが PD は阻害しなかった。以上の成績より、骨芽細胞において TGF- β の細胞内情報伝達系には、二つの互いに非依存的に活性化される経路、すなわち骨形成を促進する Smad3 経路及びこれに負の調節シグナルを送ることにより骨形成を負に調節する P42/44 及び JNK 経路があり、これらの同化シグナルと異化シグナルのバランスにより適切な骨芽細胞分化や増殖が調節され骨のモデリング並びにリモデリングの一部の機構を構成されることが示唆された。さらに P38 経路は TGF- β により Smad3 非依存的に活性化されるが、Smad3 による ALP 活性や石灰化促進の機構には促進的に作用する可能性が考えられた。

以上、本研究は、骨芽細胞で重要な働きをする TGF- β について、TGF- β の細胞内情報伝達系を研究したものであるが、TGF- β の下流には互いに独立した二つの経路、すなわち骨形成を促進する Smad3 経路、及びこれに負の調節シグナルを送ることにより骨形成を負に調節する p42/44 及び JNK 経路があり、これらの同化シグナルと異化シグナルのバランスにより適切な骨芽細胞分化や増殖が調節されることを初めて明らかにした価値ある知見の集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。