



# Role of Smad3, Acting Independently of Transforming Growth Factor- $\beta$ , in the Early induction of Wnt- $\beta$ -Catenin Signaling by Parathyroid Hormone in Mouse Osteoblastic Cells

井上, 喜文

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4969

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004969>

※ 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。



氏 名	井上 喜文
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4969 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Role of Smad3, Acting Independently of Transforming Growth Factor- $\beta$ , in the Early induction of Wnt- $\beta$ -Catenin Signaling by Parathyroid Hormone in Mouse Osteoblastic Cells(マウス骨芽細胞様細胞での副甲状腺ホルモンによる Wnt- $\beta$ -カテニンシグナルの早期誘導における Transforming Growth Factor- $\beta$  に依存しない Smad

審 査 委 員

主 査	教 授	南 康博
	教 授	清野 進
	教 授	北澤 莊平

(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Role of Smad3, Acting Independently of Transforming Growth Factor- $\beta$ , in the Early induction of Wnt- $\beta$ -Catenin Signaling by Parathyroid Hormone in Mouse Osteoblastic Cells

マウス骨芽細胞様細胞での副甲状腺ホルモンによる

Wnt- $\beta$ -カテニンシグナルの早期誘導における Transforming Growth Factor- $\beta$  に依存しない Smad3 の役割

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

糖尿病・代謝・内分泌学

(指導教員： 千原 和夫客員教授)

井上 喜文

副甲状腺ホルモン(PTH)は骨形成を促進する有力な薬剤の一つである。PTH の間欠投与では骨密度が増加し骨粗鬆症患者の骨折リスクを軽減するがその機序には不明な点が多い。PTH は骨芽細胞においてインスリン様成長因子やその結合タンパク、transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 発現を促進する。また PTH は転写制御因子を介して骨形成に影響を及ぼす。私共はこれまで骨芽細胞において PTH による TGF- $\beta$ シグナル分子の Smad3、Wnt- $\beta$ -カテニン系を介する骨形成促進作用を報告してきた。

TGF- $\beta$ が細胞膜上にあるⅡ型受容体に結合すると、Ⅰ型受容体がリクルートされ、Ⅰ型受容体がリン酸化される。更に受容体複合体は Smad2 と Smad3 をリン酸化することにより活性化し、それらと Smad4 が複合体を形成して核内に移行、遺伝子の転写を制御する。これまでに私共はマウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞において Smad3 を過剰に発現した場合、骨芽細胞分化マーカーであるⅠ型コラーゲンやアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、石灰化を促進することを報告した。また Smad3 欠失マウスでは骨形成低下と骨量減少がみられると報告されている。以上より Smad3 は骨芽細胞分化以降における骨形成促進因子と考えられた。骨芽細胞において Smad3 過剰発現は ALP 活性や石灰化を促進するが、TGF- $\beta$ はこれらを抑制する。骨芽細胞で PTH は1時間以内に Smad3 を増加させるが TGF- $\beta$ 発現促進や Smad3 のリン酸化には6時間以上かかる。このことから PTH による Smad3 の1時間からの発現促進(早期作用)には TGF- $\beta$ に依存しない Smad3 分子の新規の作用が存在する可能性が考えられた。

Wnt は間葉系幹細胞において骨形成、軟骨形成の制御などに関わる重要なタンパクである。Wnt タンパクは $\beta$ -カテニンが制御する古典的なシグナルカスケードを7回膜貫通型受容体である frizzled family、LRP5、LRP6 と結合する事により反応が開始される。これは $\beta$ -カテニンのリン酸化を抑制する。非リン酸化 $\beta$ -カテニンは細胞質内に蓄積し核内に移行、Lef/Tcf family と結合する。私共はこれまで、PTH が $\beta$ -カテニンレベルを Smad3 を介して増加させることを報告した。今回の研究では、そのメカニズムを詳細に調べるために TGF- $\beta$ に依存しない Smad3 の作用を検討した。

## 【方法】

マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を用いた。Smad3 のコンストラクトとして Smad3 の MH2 部に存在する SSXS モチーフに AAVA 変異を導入した TGF- $\beta$  受容体キナーゼ (ALK5) によりリン酸化されない Smad3AAVA、Smad3 の MH2 部全体を欠失させた Smad3 $\Delta$ C を用い、内因性 TGF- $\beta$  阻害剤 (ALK5 阻害剤) として SB431542 を用いた。石灰化は Von Kossa 染色、Alizarine Red 染色により検討した。

## 【結果】

まず Smad3AAVA 一過性導入の TGF- $\beta$  が誘導する転写活性への影響を検討した (Fig. 1A)。Smad3AAVA 導入により TGF- $\beta$  刺激による転写活性の上昇は阻害された。さらに Smad3AAVA は TGF- $\beta$  による Smad3 リン酸化も抑制した (Fig. 1B)。以上より、Smad3AAVA 一過性発現は TGF- $\beta$  効果に対してドミナントネガティブに作用すると考えられた。一方、Smad3AAVA 安定発現では TGF- $\beta$  の転写活性は抑制されず (Fig. 1C)、Smad3AAVA 安定発現では Smad3 に対してドミナントネガティブに作用しないことが示唆された。

Smad3AAVA を用いて PTH により誘導される  $\beta$ -カテニン発現を検討した。Smad3AAVA 一過性発現は、PTH による 6 時間以降の  $\beta$ -カテニン発現増加を阻害した。しかし 1 時間、3 時間の PTH による  $\beta$ -カテニン発現増加には影響を及ぼさなかった (Fig. 2A)。同様に Smad3AAVA は PTH による 24 時間での  $\beta$ -カテニンリン酸化抑制は阻害したが、1 時間でのリン酸化抑制には影響を及ぼさなかった (Fig. 2B)。このことより PTH の早期の  $\beta$ -カテニン誘導作用は TGF- $\beta$  作用には依存しないことが示唆された。

これまでに Smad3 は  $\beta$ -カテニンを増加させることを示したが、Smad3AAVA 安定発現でも  $\beta$ -カテニン発現を増加させた (Fig. 3A)。一方、Smad3 $\Delta$ C 発現では  $\beta$ -カテニン発現には影響を及ぼさなかった (Fig. 3B)。次に Smad3 の ALP 活性や石灰化増加作用の機序を検討した。Smad3 は ALP 活性を促進したが Smad3AAVA 発現は ALP 活性に影響を及ぼさなかった (Fig. 4A, B)。同様に Smad3AAVA は石灰化に影響を及ぼさなかった (Fig. 5A, B)。以上より骨芽細胞での ALP 活性、石灰化に Smad3 リン酸化が必要であることが示唆された。

SB431542 は TGF- $\beta$  による Smad2/3 リン酸化を阻害し、内因性 TGF- $\beta$  効果の関与を評価するのに有用である。SB431542 は、Smad3 による  $\beta$ -カテニン発現に影響を及ぼさなかったが (Fig. 6A)、Smad3 による ALP 活性及び石灰化の促進を阻害した (Fig. 6B, Fig. 7A, B, C)。

## 【考察及び結論】

これまで私共は、骨芽細胞で PTH は 6 時間以降で TGF- $\beta$  発現と Smad3 リン酸化を促進すること、TGF- $\beta$  受容体キナーゼにより PTH の長時間での  $\beta$ -カテニン促進を阻害するものの、短時間での  $\beta$ -カテニン促進を阻害しないことを報告した。今回の Smad3 リン酸化部位に変異を導入した Smad3AAVA を用いた検討より PTH の Smad3 を介した  $\beta$ -カテニン発現促進作用は、短時間作用では TGF- $\beta$  非依存性、長時間作用では TGF- $\beta$  依存性であることが示唆された。今回の研究より骨芽細胞における PTH の早期の  $\beta$ -カテニン増加作用において Smad3 の TGF- $\beta$  シグナルとは独立した作用が示されたが、最近同様に TGF- $\beta$  に依存しない Smad の作用が Smad4 や MPS1 の作用で報告されている。また血管平滑筋を用いたアンジオテンシン II が誘導する Smad3 の役割の報告においても、TGF- $\beta$  非依存性の Smad3 作用が言及されている。今回の Smad3 $\Delta$ C を用いた検討より、Smad3AAVA の  $\beta$ -カテニン増加作用には Smad3 の MH2 部の存在が必須であることが示唆された。

これまでに骨芽細胞の ALP 活性や石灰化において、TGF- $\beta$  と Smad3 の作用の相違がみられたが、今回の検討より Smad3 による ALP 活性や石灰化の促進には一部 TGF- $\beta$  を介することが示唆される。

本研究の結論としては、骨芽細胞において PTH は  $\beta$ -カテニン発現を Smad3 を介して促進するが、その早期作用は TGF- $\beta$  から独立した作用であり長時間作用は TGF- $\beta$  に依存した作用であることが示唆された。PTH は TGF- $\beta$  による骨芽細胞の分化抑制作用が発揮される前に、早期より Smad3 や  $\beta$ -カテニンを誘導し骨形成促進作用をもたらすと考えられ、このメカニズムは PTH の間欠的投与での骨形成促進作用を部分的に説明する可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2084号	氏 名	井上 喜文
論文題目 Title of Dissertation	マウス骨芽細胞様細胞での副甲状腺ホルモンによる Wnt-β-カテニンシグナルの早期誘導における Transforming Growth Factor-β に依存しない Smad3 の役割  Role of Smad3, Acting Independently of Transforming Growth Factor-β, in the Early Induction of Wnt-β-Catenin Signaling by Parathyroid Hormone in Mouse Osteoblastic Cells		
審査委員 Examiner	主 査 南 康博 Chief Examiner 副 査 清野 進 Vice-examiner 副 査 北澤 莊平 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

副甲状腺ホルモン(PTH)の間歇投与では骨密度が増加し骨粗鬆症患者の骨折リスクを軽減するが、その機序には不明な点が多い。PTH は骨芽細胞において transforming growth factor(TGF)-β の発現を促進する。TGF-β がⅡ型受容体に結合すると、Ⅰ型受容体がリクルート、リン酸化され、その受容体複合体は Smad2 と Smad3 をリン酸化・活性化し、それらと Smad4 が複合体を形成し核内に移行後、遺伝子の転写を制御する。Smad3 は骨芽細胞分化以降における骨形成促進因子と考えられ、骨芽細胞において Smad3 過剰発現は ALP 活性や石灰化を促進するが、TGF-β はこれらを抑制する。骨芽細胞で PTH は1時間以内に Smad3 を増加させるが TGF-β 発現促進や Smad3 のリン酸化には6時間以上かかることから、PTH による Smad3 の早期作用には TGF-β に依存しない Smad3 分子の新規の作用が存在する可能性が考えられた。一方、Wnt タンパクは骨形成、軟骨形成の制御などに関わる重要なタンパクであり、β-カテニン依存的古典的なシグナルカスケードを活性化する。本研究では、PTH がβ-カテニンレベルを Smad3 を介して増加させるメカニズムを詳細に調べるために TGF-β に依存しない Smad3 の作用を検討した。
本研究ではマウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を用いた。Smad3 変異体として Smad3 の MH2 部に存在する SSXS モチーフに AAVA 変異を導入した TGF-β 受容体キナーゼ(ALK5)によりリン酸化されない Smad3AAVA、及び MH2 部全体を欠失させた Smad3ΔC を用い、内因性 TGF-β 阻害剤(ALK5 阻害剤)として SB431542 を用いた。石灰化は Von Kossa 染色、Alizarine Red 染色により検討した。
Smad3AAVA 一過性導入の TGF-β が誘導する転写活性への影響を検討したところ、Smad3AAVA 導入により TGF-β による転写活性上昇及び Smad3 リン酸化は阻害されたことから、Smad3AAVA 一過性発現は TGF-β 効果に対して優性阻害性効果を示すと考えられた。一方、Smad3AAVA 安定発現では TGF-β の転写活性は抑制されず、Smad3 に対しても優性阻害性効果は認められなかった。Smad3AAVA を用いて PTH により誘導されるβ-カテニン発現を検討したところ、Smad3AAVA 一過性発現は、PTH による6時間以降のβ-カテニン発現増加を阻害したが、1時間、3時間の PTH によるβ-カテニン発現増加には影響を及ぼさなかった。同様に24時間でのβ-カテニンリン酸化抑制は阻害したが、1時間でのリン酸化抑制には影響を及ぼさず、PTH の早期のβ-カテニン誘導作用は TGF-β 作用には依存しないと考えられる。Smad3AAVA 安定発現でもβ-カテニン発現を増加させたが、Smad3ΔC 発現ではβ-カテニン発現には影響を及ぼさなかった。次に Smad3 の ALP 活性や石灰化増加作用の機序を検討

したところ、Smad3 は ALP 活性を促進したが Smad3A<sub>AVA</sub> 発現は ALP 活性に影響を及ぼさなかった。

同様に Smad3AVA は石灰化に影響を及ぼさないことより、骨芽細胞での ALP 活性、石灰化に Smad3

リン酸化が必要であることが示唆された。また、SB431542 は TGF- $\beta$  による Smad2/3 リン酸化を阻害

し、内因性 TGF- $\beta$  効果の関与を評価するのに有用であるが、SB431542 は Smad3 による  $\beta$ -カテニン

発現に影響を及ぼさないが、Smad3 による ALP 活性及び石灰化の促進を阻害した。

本研究は、Smad3 リン酸化部位に変異を導入した Smad3AAVA を用いることにより骨芽細胞におけ

る PTH の早期の  $\beta$ -カテニン増加作用について研究したものであるが、従来解明されていなかった

Smad3 の TGF- $\beta$  シグナル非依存的作用について、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると

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ものと認める。

\_\_\_\_\_