

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 江口 香里
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第340号
学位授与の日付 平成28年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 IGF Binding Protein-3 Suppresses Bone Formation via BMP-2 Signaling
(IGF Binding Protein-3はBMP2シグナルを介してIGF非依存的に骨形成を抑制する)

論文審査委員 主査 教授 織田 公光
副査 教授 大峽 淳
副査 教授 魚島 勝美

博士論文の要旨

【諸言】

歯科臨床における骨増成療法の必要性は高い。骨増成では骨代謝により、多くの形成骨が失われ、骨代謝制御は骨増成の成否を決定する。成長因子は血行性、もしくは骨吸収により供給され、骨形成を促進し、増成骨量維持に寄与する。

インスリン様成長因子(IGF)は骨基質中に豊富に存在する成長因子のひとつである。骨形成において、骨芽細胞の生存、分化、骨形成に促進的な作用を持ち、骨量の維持に重要な役割を担っている。IGF-1は主に肝臓のクーパー細胞で産生され、血行性に標的臓器へと運ばれる。しかし、IGF-1は数分のうちに分解されてしまうため、血清IGF-1はIGF結合タンパク(IGFBPs)と結合することによって、安定化される。IGFBPsには6種のサブタイプが存在するが、IGF-1の75-90%がIGFBP-3と複合体を形成している。これまでIGFBP-3はIGF-1の運搬タンパクとして機能し、IGF-1を介して骨形成に関与すると考えられてきた。近年、IGFBP-3のIGF-1非依存的な機能として、ゼブラフィッシュの胚発生における、IGFBP-3のBMP-2シグナル阻害や、ヒト由来IGFBP-3のBMP-2結合能などが報告されている。しかし、骨組織に関しては、IGFBP-3のIGF-1非依存的な機能に関する報告はほとんど見られぬ。本研究の目的は、骨芽細胞分化および骨形成におけるIGFBP-3のIGF-1非依存的な機能を明らかにし、IGF-1/IGFBP-3が骨代謝制御に関わる機構の解明の一助とすることである。

【方法】

6~8週齢C57BL/6マウスの骨髄細胞を採取し、接着性細胞を骨髄由来間質細胞(BMSCs)として実験に用いた。培養条件は、BMP-2・IGFBP-3非添加のコントロール群、BMP-2添加群、IGFBP-3添加群、およびBMP-2・IGFBP-3添加群とした。分化培養2日後における骨芽細胞分化関連遺伝子(Sp7、Alp、Bglap、Runx2、Spp1)の遺伝子発現をリアルタイムPCRによって定量的に解析した。

石灰化に対する影響を検索するために分化培養2日後におけるALP活性を、また、分化培養14日後における石灰化をアリザリンレッド染色と吸光度により定量的に解析した。

さらに、BMP-2シグナルへの影響を検索するためにSmad Binding Element(SBE)下流レポーターゼンを挿入した合成遺伝子を筋芽細胞株C2C12細胞に遺伝子導入し、上記分化条件で培養し、レポーターゼンアッセイにより分化24時間後におけるSBEレポーター活性を解析した。

【結果】

定量的遺伝子発現解析において、BMP-2添加群ではコントロール群と比較しSp7、Alp、Bglap、Runx2、Spp1の発現に有意な上昇を認めた。一方、BMP-2・IGFBP-3添加群では、BMP-2添加群と比較しSp7、Alp、Bglapの発現量に有意な減少を認めた。ALP活性解析において、BMP-2添加群はコントロール群と比較し有意なALP活性の亢進を認めた。これに対し、BMP-2・IGFBP-3添加群ではIGFBP-3によるALP活性の抑制が認められた。アリザリンレッド染色による石灰化解析値はBMP-2による石灰化の亢進がIGFBP-3により抑制されること

を示した。ルシフェラーゼアッセイでは、BMP-2 濃度依存的に SBE レポーター活性が有意に上昇すること、BMP-2・IGFBP-3 添加群では BMP-2 添加群と比べ SBE レポーター活性は有意に減少することが示された。

【考察及び結論】

本研究より、IGFBP-3 は BMP-2 刺激による骨芽細胞分化、および石灰化に対し抑制的な作用を持つことが示された。また、IGFBP-3 は BMP-2 シグナル下流で生じる Smad 標的遺伝子の発現に対し、抑制的な影響を及ぼすことが示された。先行文献において IGFBP-3 と BMP-2 の結合能が報告されていることから、本研究においても IGFBP-3 が BMP-2 に結合し、BMP-2 下流のシグナル伝達を阻害することで骨芽細胞分化に抑制的な制御を行っている可能性が示唆された。今回の実験では IGF-1 産生、IGF-1 シグナルを阻害したモデルは使用しておらず、BMP-2 刺激による分化骨芽細胞自身が産生する IGF-1 の、オートクライン・パラクライン的作用が IGFBP-3 により阻害されている可能性は残されているが、今後、IGF-1 の SiRNA やコンディショナルノックアウトを使用して IGFBP-3 の IGF-1 非依存的機能についてより詳細な検討を進める予定である。本研究結果より、骨代謝において IGFBP-3 は IGF の運搬タンパクとしての機能だけでなく、BMP-2 シグナルを介して骨芽細胞分化に対し抑制的に機能する可能性が示唆された。

審査結果の要旨

歯科における骨増成療法は外科領域における区域切除、歯周領域における歯槽骨再生、補綴領域におけるインプラント前の骨増成法等、その必要性は議論を待たない。増成骨は宿主細胞による吸収、添加によるリモデリングを受けることによって骨組織としての生着を得ることになるが、増成骨の多くは生着の過程において吸収され、目的とする十分な増成骨量を得られない症例が多く見られる。造成骨量の維持、長期残存には骨造成におけるリモデリングのバランス維持による骨量の維持が重要である。成長因子 (Growth Factor : GF) は骨添加を担う骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞、双方の分化、成熟に重要な因子であり、骨代謝では骨リモデリングで吸収された骨基質からの放出や、血行性に重み付け、標的部位で機能すると言われている。インスリン様成長因子-1 (Insulin like Growth Factor-1 : IGF-1) は骨基質中に豊富に取り込まれている GF であり、骨吸収によって放出される。更に肝細胞で産生され血行性に標的臓器へと運ばれる。しかし、IGF-1 単体では、生体内での半減期は 10 分ほどと言われており、産生、放出後、速やかに非特異的な酵素学的分解を受け代謝される。IGF-1 は、IGF 結合タンパク (IGF Binding Protein : IGFBP) と結合し半減期が 30-90 分へ、さらに Acid-Labile Subunit(ALS)(酸不安定サブユニット、酸反応活性錯体)と結合することで半減期は 12 時間以上となり、安定化し、血行性に標的臓器へと運ばれ、また骨基質中に取り込まれる。IGFBP には 6 種類のサブタイプの存在が知られており、IGF-1 の 75~90% が IGFBP-3 と結合し血行性に体内を循環している。更に IGFBP-3 はコラーゲンとの親和性を有しており、IGF-1 の骨基質への取り込みにも関与すると考えられている。これらの知見は IGFBP-3 が IGF-1 との結合と遊離、血行性の運搬と骨基質への取り込みを以て IGF-1 の運搬蛋白質として骨代謝への寄与を示唆するものである。しかし近年、IGFBP-3 自体の持つ IGF-1 非依存的な機能が報告されている。ゼブラフィッシュの胚発生において、IGFBP-3 は BMP2 と結合し BMP2 下流のシグナル伝達を抑制することで胚発生を攪乱する事や、ヒト由来 IGFBP-3 が BMP2 との結合能を有する事が報告されている。しかし、骨における IGF-1 非依存的な IGFBP-3 の BMP-2 への結合機能およびその効果に関する報告はない。本研究は IGFBP-3 自身が持つ IGF-1 非依存的な作用として、BMP2 下流シグナル阻害作用を介した骨形成抑制作用について検討することを目的に実施された。BMP2 による骨芽細胞分化刺激を受けた骨髄由来細胞に IGFBP-3 を添加し、遺伝子発現解析及び ALP 活性解析、石灰化解析を指標に IGFBP-3 の作用を評価し、更にルシフェラーゼアッセイによる BMP2 下流のシグナル伝達の阻害の可能性について解析を行っている。

細胞は 6~8 週齢の C57BL/6 マウスの骨髄細胞を、大腿骨、脛骨、上腕骨より採取し、プラスチック製培養皿上に播種、培養し、浮遊細胞を除去した後の接着性細胞を骨髄由来間質細胞 (Bone Marrow Stromal Cells : BMSCs) として実験に用いた。培養条件として、骨分化刺激にヒトリコンビナント BMP2 を使用、IGFBP-3 の分化刺激に対する効果を検証するために BMP2 非添加 IGFBP-3 非添加の対照群、IGFBP-3 添加群、BMP2 添加群、BMP2・IGFBP-3 添加群の 4 群を準備した。分化培養 2 日後に細胞を回収し RNA を抽出、Real-time-PCR により定量的遺伝子発現解析を骨芽細胞分化マーカーである Sp7、Alp、Bglap、Runx2、Spp1 に対して実施した。骨芽細胞分化刺激後 2 日目の細胞に対して、石灰化解析を目的に ALP 活性解析を実施し、分化刺激 14 日後の細胞に対しアリザリンレット染色を行うことで石灰角を検索、吸光度測定により定量的に評価した。更に IGFBP-3 の BMP2 の下流シグナルに対する影響を検索することを目的に SMAD 結合領域

(SMAD Binding Element : SBE) 下流コルシフェラーゼを遺伝子導入し、SBE レポーター活性を測定するルシフェラーゼアッセイを行った。細胞は筋芽細胞由来 C2C12 を使用し SBE にルシフェラーゼを組み込んだコンストラクトを遺伝子導入し、上記の4条件で刺激、24時間後にSBE レポーター活性を測定した。

遺伝子発現解析において BMP2 による分化刺激は照射と比較して有意に Sp7、Alp、Bglap、Runx2、Spp1 の発現上昇を示した。これに対し、BMP2・IGFBP3 添加群においては BMP2 で発現上昇の見られた Sp7、Alp、Bglap の遺伝子発現が有意に抑制されていた。一方で Runx2、Spp1 の遺伝子発現には影響を与えなかった。ALP 活性解析において、BMP2 による ALP 活性亢進は IGFBP-3 によって抑制され、石灰化解析においても BMP2 による石灰化亢進は IGFBP-3 によって抑制された。IGFBP3 に BMP2 による分化作用の抑制作用が確認されたので、BMP2 の下流シグナルへの影響を確認するために SBE 下流コルシフェラーゼを導入したコンストラクトによるルシフェラーゼアッセイを行ったところ、IGFBP-3 により BMP2 下流のシグナル伝達が抑制された。

以上の結果から IGFBP-3 が BMP2 シグナルを抑制することによって骨芽細胞分化を抑制し、石灰化、骨形成を抑制する可能性が示唆された。本研究の目的である IGFBP-3 の IGF 非依存的な機能を検証するためには本研究に使用した細胞による内因性の IGF-1 の関与について排除する必要があるがこの点についても申請者は考察を加えている。これまでに IGFBP は IGF の運搬蛋白質としての機能が主に研究されており、IGFBP3 の IGF 非依存的な機能についての研究は非常に少ない。IGFBP-3 の機能探索は骨代謝の機構を理解する上で重要な知見であり本研究は学位論文としての価値を認めるものである。