

論文名 : IGF Binding Protein-3 Suppresses Bone Formation via BMP-2 Signaling

(IGF binding protein-3 は BMP-2 シグナルを介して IGF 非依存的に骨形成を抑制する) (要約)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 江口 香里

---

### 【目的】

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 は主に肝臓のクッ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 種のアイソ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 非依存的機能に関する報告はほとんど見られない。

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 非依存的機能を明らかにし、IGF-1/IGFBP-3 が骨代謝制御に関わる機構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検索のために分化培養 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) 下流にルシフェラーゼ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、ルシフェラーゼ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に伴う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 シグナルを阻害したモデルは使用しておらず、分化骨芽細胞自身が産生する IGF-1 の、オートクライン・パラクライン的影響の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はなく、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。