

## 論 文 要 旨

**BMP9 Directly Induces Rapid GSK3 $\beta$  Phosphorylation in a Wnt-independent Manner through Class I PI3 Kinase-Akt Axis in Osteoblasts.**

BMP9 は骨芽細胞においてクラス I PI3 キナーゼ-Akt 経路を介して  
Wnt 非依存的に急速な GSK3 $\beta$  のリン酸化を誘導する

榮樂 菜保子

**【序論及び目的】**

慢性炎症疾患である歯周病によって破壊された歯周組織の再生あるいはインプラント埋入のため骨増生を目的として、自家骨、guided tissue regeneration (GTR 法)、エナメルマトリックスデリバティブ (enamel matrix derivative: EMD) 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF), Bone Morphogenetic Protein (BMP) -2 などが使用されている。これらの方法は一定の成果を挙げているものの、さらなる適応症の拡大と予知性の向上が求められている。

BMP-2 は *in vitro* 実験や動物実験において十分な骨増生能が認められているが、骨の増生にかかる時間や、臨床的に十分な骨量が得られない、高濃度使用による費用や副作用など、多くの問題点が指摘されている。そこで我々は、歯槽骨再生のための新規サイトカインとして、BMP-9 に着目した。

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) は現在 20 種以上が報告され、胚発生、造血・神経・骨組織形成に関与することが知られている。BMP-2/6/7/9 は骨誘導能を持つが、中でも BMP-9 は現在臨床応用されている BMP-2 よりも強い骨誘導能を持つことが報告されている (Cheng, H. et al. J bone Joint Surg Am. 2004)。BMP-9 は胎児の脊髄・体節間膜、成体では肝臓で主に発現しており、血液中 2~12ng/ml の濃度で存在する血中循環因子であることから、BMP-2 よりも臨床的な有害作用が低いことが期待される。

BMP 受容体には I 型受容体 (ALK1、ALK2、BMPR-1B、BMPR-1A など) と II 型受容体 (BMPR-2) が存在しヘテロ四量体を形成している。BMP によるシグナル経路は、Smad1/5/8 のリン酸化による古典経路と、MAPK ファミリーの活性化による非古典経路が知られているが、骨分化に関わる両経路の詳細な経路は不明な点が多い。更に近年、骨芽細胞分化における Wnt 経路の重要性が指摘されているが、BMP-9 の Wnt シグナルへの影響は未だ不明な点も多くある。

そこで本研究では、BMP-9 刺激時のシグナル伝達分子の活性化を BMP-2 刺激時と定量的 (シグナル強度の大きさ) 且つ、定性的 (シグナル強度の持続時間、活性化のタイムコース) に比較解析し、骨芽細胞分化における BMP-9 の特異的シグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。

**【材料及び方法】**

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞をリコンビナントヒト BMP-9 および BMP-2, BMP-4 で刺激後、石灰化を Alizarin-Red-staining、遺伝子発現パターンを定量的 RT-PCR 法にて解析した。また、タンパク質を回収し、Western blotting 法にて ERK1/2、p38、JNK1/2、Smad1/5、 $\beta$ -catenin、GSK3 $\beta$  の活性化シグナルを強度、開始時間、持続時間の点から解析した。次に、BMP-9 活性化シグナルの上流経路の関与を明らかにするために、骨芽細胞に U0126 (ERK 阻害剤)、SB203580 (p38 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤)、LY294002 (PI3K の阻害剤)、MK2206 (Akt 阻害剤)、LY294002 (PI3K 阻害剤)、A66 (クラス I PI3K 阻害剤) を施した上で、BMP-9 で刺激し、Smad1/5、GSK3 $\beta$  の活性化を評価した。遺伝子ノックダウン実験には、Endoglin および GIPC1 の遺伝子特異的な siRNA をリポフェクションにて導入し、BMP-9 刺激後に定量的 RT-PCR 法および Western blotting 法にて解析した。

## 【結果】

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞及びマウス頭蓋骨由来骨芽細胞において、BMP-2, -4, -9 の骨誘導能を比較したところ、BMP9 刺激によって石灰化沈着は 12 日以内に顕著に誘導されたのに対し、BMP2, 4 刺激では明らかに遅く誘導された。また、MC3T3-E1 において BMP 応答性遺伝子発現 (ALP, Runx2, Smad7, Hey1) に対する 3 つの BMP の効果を、定量的 PCR によって解析したところ、それぞれの刺激による遺伝子発現パターンは明らかに異なるものだった。

さらに MC3T3-E1 及びマウス頭蓋骨由来骨芽細胞において、細胞内シグナル伝達経路解析のため Western blotting 法を行ったところ、BMP-9 と BMP-2 による刺激は両者とも非常に速い経過で ERK, JNK のリン酸化を誘導した。p38 については、顕著なリン酸化の誘導は確認できなかった。また、少し遅れた時間経過で、Smad1/5 のリン酸化が誘導された。MAP キナーゼ、Smad1/5 のリン酸化については、BMP-2 と BMP-9 の間で、著明な差異は認められなかった。両者間で、顕著な差が認められたものとして、GSK3 $\beta$  のリン酸化に注目した。BMP-9 刺激は、BMP-2 に比べ 5 分程度の速い経過で GSK3 $\beta$  のリン酸化 (不活化) を強く誘導した。骨芽細胞の BMP 刺激による Wnt の分泌誘導が知られており、GSK3 $\beta$  のリン酸化の誘導が Wnt 発現を介した間接的なものではないことを示すために、MC3T3-E1 においてタンパク合成阻害剤である CHX 等による前処理を行ったが、GSK3 $\beta$  におけるリン酸化に著明な変化は見られなかった。また、Canonical Wnt として知られる数種について解析した結果、特に強く誘導されたものはすべて 60 分以降をピークとする遅い時間経過で作用を示した。

また MC3T3-E1 において BMP-9 による Gsk3 $\beta$  のリン酸化は ERK, p38, JNK の阻害薬では抑制されず、Akt の特異的阻害剤である MK2206、PI3K の阻害剤である LY294002、クラス 1 PI3K の阻害剤である A66 の前処理によって顕著に抑制された。さらに、MK2206 による前処理により BMP-9 によって誘導された ALP, Runx2 の mRNA の発現は顕著に抑制された。

さらに AKT のリン酸化の上流のシグナル伝達のメカニズム解明のため、MC3T3-E1 細胞において Endoglin および GIPC1 の siRNA によるノックダウン下で BMP-9 刺激後、Akt 及び ALP の mRNA 発現を解析した。Endoglin と GIPC1 のノックダウン下では、BMP-9 による Akt および GSK3 $\beta$  のリン酸化は抑制され、同時に ALP の発現誘導も著明に抑制された。

## 【結論及び考察】

本研究において、BMP-2, -4, -9 はそれぞれ異なる遺伝子発現パターンが認められた。また、BMP-9 刺激は BMP-2 と比べ速い段階で Akt および GSK3 $\beta$  のリン酸化を誘導することがわかった。

また、タンパク合成阻害剤である CHX 等による前処理を行ったが、GSK3 $\beta$  におけるリン酸化に著明な変化は見られなかった。Canonical Wnt の発現について解析した結果、特に強く誘導されたものはすべて 60 分以降をピークとする遅い時間経過で作用を示した。このことより BMP-9 は Wnt 非依存的に Gsk3 $\beta$  を早期にリン酸化することがわかった。

さらに BMP-9 刺激による早期の Gsk3 $\beta$  のリン酸化および ALP, Runx2 の mRNA 発現は Akt, Class1-PI3K, PI3K の特異的阻害剤の前処理により顕著に抑制されたことより、Akt-GSK3 $\beta$  経路は BMP-9 の早い段階での骨芽細胞分化に関与することがわかった。

さらなる上流のシグナルについて、BMP-9 による PI3K-Akt 経路の活性において classIPI3K と複合体を形成することで知られている、G $\alpha$ -interacting protein C-terminus-interacting protein 1 (GIPC1) と TGF $\beta$  ファミリーの co-receptor である Endoglin に注目した。BMP-9 刺激による早期の GSK3 $\beta$ -Akt のリン酸化は、Endoglin と GIPC1 のノックダウン下で顕著に抑制され、同時に ALP の発現誘導も抑制された。このことより、BMP-9 刺激による早期の GSK3 $\beta$ -Akt のリン酸化は、GIPC1 と Endoglin に関与している可能性が考えられる。

以上より、BMP-9 刺激による早期の Gsk3 $\beta$  のリン酸化は PI3K-Akt 経路および GIPC1 と Endoglin に密接に関係し、この経路が BMP-9 の強力な骨芽細胞分化誘導に関与している可能性が示唆された。今後、さらなる BMP-9 活性化シグナルの上流経路を明らかにすることにより、BMP-9 の臨床応用に役立つと考える。