

## 論 文 要 旨

**Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) directly induces Notch effector molecule Hes1 through the SMAD signaling pathway in osteoblasts.**

**〔 BMP9 は骨芽細胞において SMAD シグナル経路を介して Notch エフェクター分子である Hes1 を誘導する 〕**

成 昌奂 (Chang-Hwan Seong)

**【序論及び目的】**

近年の高齢化社会では、癌、外傷、骨粗鬆症、あるいは関節リウマチや歯周病などの慢性炎症性疾患による骨量減少が深刻な社会的脅威となっている。骨形成タンパク質 (Bone morphogenetic proteins: BMPs) は、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する骨形成サイトカインの一種であり、哺乳動物の骨格形成に重要な役割を果たしている。BMP9 は BMP ファミリーの中でも特に強い骨芽細胞分化促進能を有することが報告されているが、その特殊な作用メカニズムの詳細については不明な点が多い。

Hes ファミリータンパク質 (Hes1-7) は、bHLH (basic helix-loop-helix) ドメインを持つ転写制御因子であり、Notch シグナルのエフェクターとしてよく知られている。Hes 遺伝子の中でも特に Hes1 は、胚発生の初期段階において、神経細胞の未分化な状態を維持するのに必須であることが知られるが、骨芽細胞分化における生理的役割はよく分かっていない。Notch シグナルは、ほとんどの動物で広く保存されており、胚の発生や細胞運命の決定に関与している。さらに、Notch シグナルは、骨形成において重要な調節因子として機能していることが報告されている。

そこで本研究では、骨芽細胞の BMP9 刺激による Hes1 の発現誘導について、その分子メカニズムを明らかにすることを目的にした。

**【材料及び方法】**

① 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マウス BMP9 および BMP2、BMP4 で刺激後、Hes1 遺伝子発現パターンを定量的 RT-PCR 法にて解析した。また Western blotting 法にて、Hes1 タンパク発現レベル、Smad1/5、ERK1/2、p38、JNK1/2 の活性化シグナルを解析した。

② BMP9 刺激による Hes1 発現調節機構を解析するために、MG132 (プロテアソーム阻害剤)、U0126 (ERK 阻害剤)、SB203580 (p38 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤)、LDN193189 (BMPI型受容体阻害剤)、LY3039478 (Notch シグナル阻害剤)、DMH1 (BMP 阻害剤)の前処理を施した上で、BMP9 で刺激し、Hes1 発現への影響を評価した。また、Tet-on 誘導発現システムによる Smad7 (抑制型 Smad) の強発現が、BMP9 刺激による Hes1 の発現誘導に及ぼす影響を調べた。

③ BMP9 による Hes1 の転写制御領域を特定するために、Hes1 遺伝子プロモーターの異なった領域を含んだ Luciferase reporter plasmid を作製し、ルシフェラーゼ活性を測定した後、クロマチン免疫沈

降を用い確認を行った。

④ 遺伝子ノックダウン実験としては、Hes1、SMAD6、SMAD7の遺伝子特異的な siRNA をリポフェクションにて導入し、MC3T3-E1 細胞の BMP-9 刺激後に、定量的 RT-PCR 法および Western blotting 法による解析を行った。

### 【結果】

マウス頭蓋骨由来骨芽細胞において、BMP 2、4、9 刺激 1 時間後の Hes1 の発現を比較したところ、mRNA およびタンパクレベル共に BMP9 が最も顕著に Hes1 を誘導した。骨芽細胞の BMP9 刺激によって、Hes1 の mRNA、タンパクの周期的な発現パターンが誘導された。MG132 は BMP9 刺激により誘導される Hes1 の mRNA 発現パターンを抑制した。

Notch および MAP キナーゼ阻害剤による前処置は、骨芽細胞の BMP9 による Hes1 発現誘導に有意な影響を与えなかった。BMP1型受容体阻害剤、BMP 特異的阻害剤による前処置および Tet-on システムを用いた Smad7 発現誘導は、BMP9 による Hes1 発現を顕著に抑制した。SMAD6 と SMAD7 のノックダウン下では、BMP9 による Hes1 の発現が有意に増強された。

遺伝子プロモーター解析の結果、Hes1 遺伝子の転写開始点上流の 1000-1500bp 領域に BMP9 反応性の転写調節活性が認められた。さらに、Smad 抗体を用いたクロマチン免疫沈降の結果、特定した 2ヶ所の Smad 結合部位を含む転写調節領域で DNA 増幅が確認された。

さらに Hes1 の siRNA によるノックダウン下で BMP9 刺激し OCN の mRNA の発現を調べた結果、Hes1 ノックダウンは OCN の発現を有意に増加させていた。

### 【結論及び考察】

BMP9 刺激により発現誘導された Hes1 タンパクは、Negative auto feedback による Hes1 mRNA の転写抑制およびプロテアソームによる Hes1 タンパクの分解の機構により、周期的な発現レベルの変動 (Oscillation) を示すことが分かった。また、BMP9 は、Notch や MAPK のシグナル経路を介さずに、直接 Hes1 遺伝子転写開始点上流 1000-1500bp 領域の二つの Smad 結合部位を介して、Hes1 の発現を誘導していることを見いだした。また、Hes1 ノックダウンにより後期分化マーカーである OCN の発現が増加したことから、BMP9 により上昇する Hes1 の発現は、骨芽細胞分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後、BMP9 のシグナル伝達経路および Hes1 の機能的役割をより詳しく解析することで、効率的な BMP による骨再生療法の開発に繋がることが期待される。