

論文審査の要旨

報告番号	総研第 648 号	学位申請者	成 昌 隼
審査委員	主 査	西村 正宏	学 位
	副 査	於保 孝彦	副 査
	副 査	笹平 智則	副 査
			博 士 (歯 学)
			岸田 昭世
			比地岡 浩志

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)

Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) は強力な骨分化誘導能を有し、口腔癌などにより喪失した顎骨の再生に役立つと考えられるが、その作用機序や詳細なメカニズムについては解明されていない。そこで学位申請者は、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞およびマウス頭蓋骨由来初代骨芽細胞 (POB) を用いて、BMP9 刺激による Notch エフェクター分子 Hes1 の発現誘導機構について、その分子メカニズムの検討を行った。Recombinant mouse BMP 2, 4, 9 で刺激後、Hes1 遺伝子発現を RT-PCR 法および Western blot 法にて解析した。また、各シグナル阻害剤、Tet-on 誘導発現システムによる Smad7 (抑制型 Smad) の強発現、そして Smad6/7 の siRNA を用い、BMP9 による Hes1 の発現誘導に及ぼす影響を調べた。転写制御領域の特定には、プロモーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降 (ChIP-assay) を用いた。遺伝子ノックダウン (KD) 実験では、Hes1 の特異的な siRNA を導入し解析を行った。その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- 1) POB において、BMP 2, 4, 9 の中で、BMP9 が最も顕著に Hes1 を誘導した。
- 2) MC3T3-E1 において、BMP9 刺激により Hes1 の周期的な発現パターンが誘導された。プロテアーゼ阻害剤 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。
- 3) MC3T3-E1 において、Notch および MAP キナーゼ阻害剤による前処置は、BMP9 による Hes1 発現誘導に有意な影響を与えなかった。BMP I 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 KD 下では、BMP9 による Hes1 の発現が有意に増強された。
- 4) MC3T3-E1 において、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 ChIP-assay 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。
- 5) MC3T3-E1 において、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。

BMP9 は骨芽細胞において、直接 Hes1 遺伝子転写開始点上流の Smad 結合部位を介して Hes1 の発現を誘導し、Negative auto feedback により周期的な発現パターンを示すことがわかった。また、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。

本研究は骨芽細胞における BMP9 の Notch エフェクター分子 Hes1 を誘導する発現誘導機構を解明した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。