

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890027  
 研究課題名（和文） BMP依存性骨芽細胞分化のTNF/JNKシグナル経路による調節機構  
 研究課題名（英文） Regulatory mechanism of BMP-dependent osteoblast differentiation through TNF/JNK signaling pathway  
 研究代表者  
 工藤 忠明（KUDO TADA-AKI）  
 東北大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号：50431606

研究成果の概要：BMP受容体の一つ、BMPRIIは、C末端領域のThr977がリン酸化酵素JNKによりリン酸化され、一方では脱リン酸化酵素Dullardにより分解の促進を受ける。本研究では、Dullardの機能とBMPRII部分欠失変異体との関係等や、Thr977がリン酸化を受けないBMPRII[T977A]変異体安定発現細胞が示す、野生型BMPRII安定発現細胞と異なる表現型についての新たな知見が得られた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：細胞生物学・分子生理学

科研費の分科・細目：医歯薬学・機能系基礎歯科学

キーワード：BMP, TNF, MAPK, JNK, Dullard

## 1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞は間葉系幹細胞に由来するが、その分化過程で最も重要な作用をもつものが、骨誘導因子として1980年代後半に同定されたBMPである。BMPは、筋芽細胞への分化を抑制する一方、骨芽細胞への分化を促進する。BMP作用は、BMPの受容体との結合によりリン酸化を受け活性化されるSmad1/5/8がSmad4と複合体を形成し、核内に移行して標的遺伝子の反応領域と結合し転写活性を調節することにより発現する。骨芽細胞の分化は初期から終末分化にいた

るまでBMPにより促進される。

骨吸収性サイトカインの代表にはIL-1があるが、これに類似した骨吸収性サイトカインとしてTNF- $\alpha$ が知られている。TNF- $\alpha$ は主に単球やTリンパ球が産生し、その受容体であるTNF受容体は、骨芽細胞を含む種々の細胞に認められる。TNFはIL-1と同様、強力な骨吸収活性を示す。TNFを含む骨吸収性因子は、骨芽細胞に作用し破骨細胞分化因子(RANKL)の誘導を促し破骨細胞分化を促すこと等により、骨吸収を促進させる。TNFシグナルは一方で、間葉系幹細胞からの骨芽

細胞や象牙芽細胞への分化誘導シグナルに対し抑制的に働くことが近年報告されていた。しかしそのシグナルクロストーク機構の解明は未だ不十分である。

ストレス等により活性化されるストレス依存性 MAPK シグナル伝達路、JNK/SAPK 経路は、TNF、IL-1、TGF- $\beta$  や BMP を含む種々のサイトカインにより活性化される。BMP/Smad 経路と ERK 経路とのクロストークはこれまで数多く報告されていたが、JNK 経路と BMP/Smad 経路とのクロストークについて、殊にその作用点については報告が乏しかった。私はこれまで JNK の新規細胞核外標的として BMPRII を同定し、さらに TNF 依存性又は MAP3K である ASK1 依存性に活性化された JNK による新たなリン酸化部位として BMPRII の C 末端領域に存在する第 977 番目スレオニン残基(以下、Thr977 とする)を同定した。このリン酸化は、JNK 阻害剤により完全に抑制される。又、キナーゼ活性がないドミナントネガティブ型 JNK の過剰発現により、細胞内で BMPRII タンパク質安定性が向上する可能性を示唆した。

BMPRII は BMP の主要なセリン・スレオニンキナーゼ型受容体の一つであり、下流 Smad シグナルを調節し歯や骨等の組織形成のみならず、初期発生や形態形成の調節に関わる分子である。BMPRII 遺伝子欠損マウスは胎生致死であり、中胚葉形成不全が認められる。また、原発性肺高血圧症の原因遺伝子であることが示唆されている。BMPRII の C 末端領域(CT 領域)は他の BMP 受容体を含む TGF- $\beta$  スーパーファミリーの受容体には存在せず、かつ脊椎動物に高度に保存される約 500 アミノ酸の配列領域であり、アクチン骨格制御に関与する LIMK1 がこの C 末端領域と会合する分子として初めて報告され、non-Smad シグナルの形成の場として注目されるが、C 末端領域の機能は多くが不明であった。

## 2. 研究の目的

歯周疾患等の炎症性疾患で歯槽骨は著明に吸収される。これは破骨細胞による骨吸収の促進又は骨芽細胞の骨形成能低下によるものと考えられる。事実、骨吸収性サイトカインの一つである TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子)は、骨細胞の分化・成熟を促す一方、前骨芽細胞の骨芽細胞への分化を阻害する。しかし、TNF による骨芽細胞分化阻害の分子機構に関しては未だ不明の点が多かった。

これまでの情報生物学的手法を用いた網羅的アプローチにより、ストレス依存性 MAP キナーゼ JNK が II 型 BMP(骨形成因子)受容体の一つである BMPRII の C 末端領域と特異的に会合すること、さらに TNF や MAP3K の一つである ASK1 依存性に活性化された JNK

により BMPRII の Thr977 がリン酸化を受けることを見出してきた。本研究では、細胞分化の促進に主要な役割を果たす BMP/Smad シグナル経路の、TNF シグナルによる BMP 受容体レベルでの機能調節機構に焦点を当て、TNF をはじめとする JNK 活性化因子による骨芽細胞分化調節の分子生理的機序の一部を解明することをもって、歯槽骨をはじめとする骨の再生療法の開発に寄与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) JNK による BMPRII のリン酸化と Dullard との関係の検討

①近年、BMPRII のユビキチン-プロテアソーム系依存性タンパク質分解を促進する因子として、Dullard と呼ばれる脱リン酸化酵素が、アフリカツメガエルを用いた研究において報告された。BMPRII の JNK によるリン酸化は BMPRII の半減期調節に関与する可能性もあることから、ヒト Dullard オルソログを HEK293 細胞株からクローニングし、ヒト Dullard と JNK による BMPRII の C 末端領域のリン酸化との関係を、各種 BMPRII 変異体を用いて、哺乳動物細胞培養系とウェスタンブロット法により検討した。

②Dullard は BMP シグナル経路を負に調節することによりアフリカツメガエルにおいて脳の発生を抑制することが示唆されていることから、マウス P19 胚性腫瘍細胞におけるレチノイン酸依存性神経系細胞分化モデル(この細胞分化系において、JNK は持続的な活性上昇を示す)における Dullard の発現制御をリアルタイム PCR 法により検討した。

(2) 野生型 BMPRII および Thr977 リン酸化不能型 BMPRII[T977A]安定発現細胞株を用いた解析

①Flp-In/T-REx システムを採用することにより、テトラサイクリンにより発現調節が可能な野生型もしくは変異型 [T977A] の BMPRII 発現 HEK293 細胞株を樹立し、BMPRII のテトラサイクリン処理時間もしくは用量依存的な BMPRII mRNA 発現量変動およびタンパク質量変動の検討をリアルタイム PCR およびウェスタンブロット法により実施した。

②テトラサイクリン依存性に BMPRII 発現を誘導した際の下流遺伝子発現(Id-1 遺伝子および Id-2 遺伝子)への影響をリアルタイム PCR 法により評価した。

③BMPRII[WT]発現細胞と BMPRII[T977A]発現細胞の両者における BMP 依存性細胞応答の差について、リアルタイム PCR 法、マイクロアレイ法およびリアルタイム細胞計測システムによるセルインデックス(CI)、位相差顕微鏡による細胞形態等により評価し

た。

④さらに TNF を BMP と共処理した際の、量細胞株への影響の表出の違いについて、シグナルクロストークの観点からマイクロアレイやリアルタイム PCR により検討した。

#### 4. 研究成果

(1) JNK による BMPRII のリン酸化と Dullard との関係の検討

①COS7 細胞に BMPRII とヒト Dullard を共発現させたところ、BMPRII の細胞内タンパク質発現量の低下が認められた。一方、ドミナントネガティブ型 JNK もしくは脱リン酸化酵素 PP2C $\alpha$  (この分子は JNK 経路を抑制する作用を有する) を BMPRII と共に発現させたところ、BMPRII の発現量は増加した。さらに、ドミナントネガティブ型 JNK の共発現により、Dullard による BMPRII 発現の分解促進作用の抑制が認められた。

次に、全長型 BMPRII (BMPRII-FL) の C 末端領域を欠くスプライシングバリエーションである BMPRII-SH や BMPRII の C 末端領域 (CT 領域) のみを発現する BMPRII-CT を発現するプラスミドを準備し、ヒト Dullard による発現量抑制作用がこれら部分欠失変異体でも起こるのか否かについて検討したところ、BMPRII-FL と同様に、BMPRII-SH および BMPRII-CT においても、ヒト Dullard の共発現による発現量低下が認められた。これらの結果は、JNK 活性が Dullard 等を因子とする BMPRII 半減期制御に関与する可能性を示唆する一方、その半減期調節は BMPRII の CT 領域にのみ依存するのではないことを示唆しており、BMPRII の分解を直接的に誘導する E3 リガーゼの同定を含め、今後さらなる検討を要する。

②中枢神経系の発生は、一部は BMP シグナルによって制御される。マウス P19 胚性腫瘍細胞のレチノイン酸依存性神経分化において、Dullard、BMP2、BMP4 および BMPRII mRNA 発現量の変動を検討した。total mRNA を分化誘導開始後 0, 2, 4, 7 日目で回収したところ、神経幹細胞マーカーの一つである Mash1 がピークとなる第 4 日目において Dullard mRNA 発現量もピーク値を示すことが定量的 RT-PCR により示された。BMP4 mRNA 量は未分化マーカーである Oct3/4 mRNA と同様に、分化誘導後速やかに発現レベルが低下し、BMP2 mRNA 量は Dullard と同様に第 4 日目で一つのピーク値を示した。BMPRII mRNA は第 4 日目までに増加し、神経細胞やグリア細胞に分化する第 7 日目まで同じレベルを維持した。これらの結果は哺乳類神経系の発生においても Dullard の mRNA 量が制御されている可能性を示唆している。今後は、優れた内在性 Dullard 認識抗体の作製と、これによるタン

パク質発現量の変動の解析や、抗体により免疫沈降した Dullard について、ホスファターゼアッセイによる脱リン酸化酵素活性の変動の解析を実施する等により、P19 細胞神経分化過程における BMP 経路の調節機構がさらに検討されることが期待される。

(2) 野生型 BMPRII および Thr977 リン酸化不能型 BMPRII [T977A] 安定発現細胞株を用いた解析

① Flp-In/T-REx システムにより Flag タグを融合させた野生型 BMPRII (BMPRII [WT]-Flag) もしくは BMPRII [T977A]-Flag を Flp-In/T-REx HEK293 細胞の FRT サイトにそれぞれ導入された細胞株をスクリーニングして得た。この安定発現細胞株における、BMPRII のテトラサイクリン依存的な発現誘導を mRNA もしくはタンパク質レベルで定量的 RT-PCR 法およびウェスタンブロット法により検討した。まず BMPRII [WT] 発現細胞株では、テトラサイクリンを  $1\mu\text{M}$  で処理後、3 時間後で BMPRII mRNA 発現量は  $6.02 \pm 1.92$  倍に、24 時間後で  $9.84 \pm 0.68$  倍に増加した。さらに、BMPRII タンパク質発現レベルは 3 時間後で  $3.86 \pm 0.44$  倍に、12 時間後で  $11.91 \pm 0.31$  倍に、さらに 24 時間後に  $15.16 \pm 3.85$  倍に増加するという実験データを得た。BMPRII [T977A] 発現細胞株についても同様の結果が得られた。

② BMPRII はそのキナーゼドメインが恒常的に活性化型であるとされていることから、BMPRII [WT] もしくは BMPRII [T977A] がテトラサイクリン依存性に発現誘導されることにより、下流のシグナル経路がリガンドである BMP による刺激なしに活性化されるか否かを検討した。BMPRII [WT] 発現細胞株および BMPRII [T977A] 発現細胞株に対し、テトラサイクリンを  $1\mu\text{M}$  で処理後、3 時間後、および 24 時間後に RNA を回収し定量的 RT-PCR 法で BMP/Smad シグナル経路の代表的な下流遺伝子である Id-1 と Id-2 の mRNA 発現量を解析したところ、テトラサイクリン処理前と比べ、その発現量においていずれの遺伝子も有意差は認められなかった。さらに、BMPRII [WT] もしくは BMPRII [T977A] の発現誘導のみによる細胞形態の著しい変化やアポトーシスは認められなかった。これらの結果より、作成されたテトラサイクリンによる発現調節が可能な両安定発現細胞株は BMPRII の機能的・分子生物学的解析には有用な細胞株であることが示唆された。

③ 次に、BMPRII の C 末端領域に存在する脊椎動物に高度に保存されたリン酸化部位、Thr977 のリン酸化や脱リン酸化による、BMP 下流遺伝子の発現特性や細胞機能が受ける影響を解明するため、上記 BMPRII [WT] 発現細胞と BMPRII [T977A] 発現細胞との間

での表現型の差異を検討した。まずリアルタイム PCR による解析では、Id-1 mRNA 発現量の BMP2 処理による初期の変動パターンに違いが認められた。また、リアルタイム細胞計測装置によりセルインデックス値(CI値)を評価したところ、テトラサイクリン処理をした BMPRII[WT]発現細胞において生じる BMP2 刺激依存性細胞増殖亢進(CI値の増加)が、テトラサイクリン処理をした BMPRII[T977A]発現細胞においては生じないことが示唆された。この際、位相差顕微鏡による計測では、細胞面積や細胞周囲長に有意な変化は認められなかったことから、CI値の変化はこれらの影響を受けていないと考えられる。これらの結果から、BMPRIIのC末端の Thr977 のリン酸化レベルは BMPシグナルによる細胞機能調節に一定の関与をする可能性が示唆された。今後、BMPRIIのC末端領域由来のシグナル形成の観点からのさらなる検討が期待される。

④TNF 経路は BMP 経路とクロストークし、BMP 依存性骨芽細胞分化等に影響を及ぼすとされているが、分子的機序は多くが不明である。そこで今回樹立した細胞株を用い、BMPRII-Thr977 の変異がこのクロストークに及ぼす影響を検討した。DNA チップにより、BMPRII[WT]発現細胞で BMP2 処理により 2 倍以上シグナル強度が変動し、さらに TNF- $\alpha$  共処理でシグナル強度が 2 倍以上変動する遺伝子群を分析し、203 遺伝子を同定した。この遺伝子群をさらに解析したところ、IL-1R1 受容体をはじめ、BMPRII[T977A]発現細胞においてシグナル強度の変動傾向が異なる遺伝子群を認めた。これらの結果は BMPRII の Thr977 のリン酸化・脱リン酸化が正常な BMP 経路依存性細胞機能の調節に必要なことを示唆するものであり、特に変動率の大きい遺伝子については、今後、リアルタイム PCR 法やレポーター遺伝子アッセイ等によりさらに詳細な検討を実施したいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① T.A. Kudo, T. Kobayashi. & S. Tamura. Bioinformatics-based cyclopedic search for novel JNK binding molecules. *Tohoku Univ. Dent. J.*, 26, 1-11, 2007, 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

- ① 工藤忠明, 清水良央, 張擘, 岡山啓昌, 趙菲, 狩野充浩, 田村眞理, 金高弘恭, 林治秀. Flp-In/T-REx システムを応用した II 型骨形成因子(BMP)受容体の新しい機能に

関する網羅的解析. 第 54 回東北大学歯学会. 2009 年 2 月 27 日. 仙台市

- ② T.A. Kudo, A. Watanabe, M. Asano, Y. Zhang, F. Zhao, M. Kano, Y. Shimizu, H. Kanetaka, S. Tamura, H. Hayashi. Establishment of a stable and regulable 293 cell line expressing the type II bone morphogenetic protein receptor: an approach toward proteome analysis. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. 2009 年 1 月 15, 16 日. 仙台市
- ③ F. Zhao, T.A. Kudo, Y. Zhang, M. Kano, S. Tamura, Y. Shimizu, H. Kanetaka, H. Hayashi. Regulation of the protein serine/threonine phosphatase Dullard in the course of neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. 2009 年 1 月 15, 16 日. 仙台市
- ④ K. Okayama, T.A. Kudo, Y. Shimizu, Y. Zhang, F. Zhao, M. Kano, H. Kanetaka, K. Sasaki. Genome-wide analysis of the regulation of BMP2-induced gene expression by inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  in a stable 293 cell line expressing BMPRII. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. 2009 年 1 月 15, 16 日. 仙台市
- ⑤ Y. Zhang, T.A. Kudo, M. Ku, F. Zhao, M. Kano, Y. Shimizu, H. Kanetaka, T. Hamada, H. Kanetaka. Role of the extracellular-signal-regulated kinase 5 (ERK5) pathway for neural differentiation in P19 embryonal carcinoma cells. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. 2009 年 1 月 15, 16 日. 仙台市
- ⑥ 工藤忠明, 清水良央, 金高弘恭, 林治秀. c-Jun N-terminal Kinase is a possible regulator of proton-associated sugar transporter-A. 第 50 回歯科基礎医学会. 2008 年 9 月 23~25 日. 東京都
- ⑦ 工藤忠明, 清水良央, 金高弘恭, 田村眞理, 林治秀. JNK による proton-associated sugar transporter-A の制御機構. 第 60 回日本細胞生物学会大会. 2008 年 6 月 28~7 月 1 日. 横浜市
- ⑧ 工藤忠明, 田村眞理, 林治秀.

Proton-associated sugar transporter-A is a potential target of JNK signal cascade. 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム. 2008年5月19日. 横浜市

- ⑨ 工藤忠明, 田村眞理, 林治秀. 骨吸収性サイトカインによるBMPRIIの調節機構. 第49回歯科基礎医学会. 2007年8月30, 31日. 札幌市

[図書] (計 1件)

- ① 小林孝安, 工藤忠明, 田村眞理, 帯刀益夫, 佐竹正延編 加齢医学 エイジングファイナル. 東北大学出版会 2007年 25-36.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

工藤 忠明 (KUDO TADA-AKI)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：50431606