

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 4 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861677

研究課題名(和文) FGFシグナル抑制因子Sprouty2による骨芽細胞増殖・分化制御機構の解析

研究課題名(英文) Sprouty2 controls osteoblast proliferation and differentiation via MAPK and Smad pathways.

研究代表者

鬼村 朋宏 (ONIMURA, TOMOHIRO)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70713428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：FGFやBMPなどの増殖因子は、骨芽細胞の増殖・分化の制御に重要であることが知られている。FGFはチロシンキナーゼ型受容体に結合し、MAPK経路を介して細胞の増殖・分化を促進するが、その抑制因子としてSprouty/Spredファミリーという分子群が同定されている。一方、BMPシグナル経路において、その下流分子SmadはMAPK経路と密接に関連していることが報告されているが、その制御機構に関しては不明な点が多い。本研究では、骨芽細胞におけるFGF-MAPK経路とBMP-Smad経路を介したSprouty/Spredファミリーによる増殖・分化制御機構について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：FGF and BMP play essential roles for bone formation and osteoblast activity via MAPK and Smad pathways. Sprouty family is known as intracellular inhibitor of the FGF signaling. Furthermore, MAPK pathway has been also reported to participate in BMP signaling. However, the mechanism of bone formation through the Sprouty family has not been clarified. In this study, we clarified the role of Sproutys for the proliferation and differentiation of osteoblast. The expression of Sprouty2 and Sprouty4 was induced by bFGF stimulation in SaOS-2 and MC3T3-E1 cells. The phosphorylation of MAPK and Smad1/5/8 were downregulated in both cell lines transfected with Sprouty2. Furthermore, Sprouty2 suppressed the mRNA expression of osterix, ALP, and osteocalcin. These results suggest that Sprouty2 can negatively control osteoblast proliferation and differentiation by downregulating MAPK and Smad pathways, and also suppress the induction of transcription factors for osteoblast differentiation.

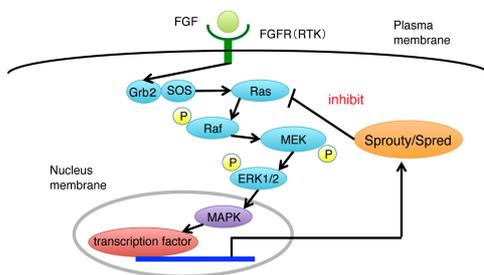
研究分野：基礎細胞学

キーワード：Sprouty / Spred bFGF BMP MC3T3-E1 SaOS-2

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨を構成する細胞には、軟骨細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞があげられる。このうち、骨形成を担うのが間葉系幹細胞から分化する骨芽細胞である。骨芽細胞の増殖・分化・機能の制御には、骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein: BMP)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) などの増殖因子が重要な役割をしていることが知られている。

(2) BMP のシグナル伝達では特異的 Smad である Smad1、Smad5、Smad8 (Smad1/5/8) が重要な役割を担っている。一方、FGF は線維芽細胞の増殖因子としてだけでなく、骨芽細胞を含むさまざまな細胞に対する細胞増殖や分化活性を有している。FGF はレセプター型チロシンキナーゼファミリーに属する細胞膜上の FGF 受容体 (FGFR) と結合することで、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を活性化し、細胞の増殖・分化を促進する。この MAPK 経路の抑制因子として Sprouty/Spred ファミリーという分子群が同定されている (下図)。



(3) Sprouty はショウジョウバエの遺伝学的解析により FGF シグナルを負に調節する分子として同定され、現在 4 種類の本モログが同定されている。このうち、少なくとも Sprouty2 および Sprouty4 は MAPK 経路により転写誘導されるネガティブフィードバック制御因子である。Spred (Sprouty-related EVH-1 domain containing protein) は Sprouty に似た分子として発見され、Ras-ERK 経路の抑制因子であり、3 種類の本モログが存在する。Sprouty/Spred ファミリーの遺伝子欠損 (knock out: KO) マウスの表現型についてはこれまでにさまざまな報告がある。Sprouty2 KO マウスは野生型 (wild type: WT) マウスに比べて、体が小さく体重も軽いという報告があり、臼歯部前方に過剰歯を生じるものや、口蓋裂を生じるという報告もされている。また、Spred1、Spred2 KO マウスでも顔面の変形、低成長を示すことが知られている。さらに、Sprouty4 KO マウスは歯数の異常や四肢の指の形態異常、下顎骨の欠損が認められており、Sprouty2/Sprouty4 のダブル KO マウスは胎生致死であり、頭部、歯牙、四肢に著しい形態異常を呈する。これらのことから、Sprouty/Spred ファミリーは機能的に骨の形

態形成の制御に重要な役割を果たしていると思われる。

2. 研究の目的

骨形成と Sprouty/Spred ファミリーとの関連についての詳細は明らかにされていない。

さらに、Sprouty/Spred ファミリーが抑制的に働く MAPK 経路と BMP シグナルの下流に存在する分子 Smad は密接な関係があるとされている。

本研究では、骨形成に深く関与する骨芽細胞の増殖・分化における Sprouty/Spred の役割について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞株における Sprouty/Spred ファミリーの発現

マウス骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞における Sprouty/Spred ファミリーの mRNA の発現を RT-PCR 法および、real-time PCR 法を用いて解析した。ヒト骨芽細胞株である SaOS-2 においても同様の実験を行った。また、Sprouty2、4 のタンパク質の発現を western blot 法を用いて解析した。

(2) Sprouty2 が骨芽細胞の増殖に及ぼす影響

次に、mRNA レベル・タンパク質レベルで発現を確認できた Sprouty2 の骨芽細胞への影響について検討を行った。最初に、細胞増殖への影響を WST-8 assay を用いて検討した。

(3) FGF シグナル伝達経路における Sprouty2 の作用

FGF シグナル経路の中で、細胞の増殖・分化と最も密接に関連しているものとしては、Ras-MAPK 経路と PI3K-Akt 経路がある。これらの経路における Sprouty2 の作用を調べるために、SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に Sprouty2 を強制発現させ、bFGF で刺激を行った時の MAPK と Akt のリン酸化を、ウエスタンブロット法にて解析した。

(4) BMP シグナル伝達経路における Sprouty2 の作用

骨形成タンパク質 (BMP) には重要な性質の一つに、その名が示すとおり骨誘導作用がある。BMP シグナル経路は、Smad1/5/8 のリン酸化によって開始され、Smad4 との複合体を形成し、核へと移行し転写因子を誘導する。これまでに、この Smad と MAPK 経路との関連が数多く報告されているため、MAPK 経路抑制因子である Sprouty2 も Smad 経路に作用しているのではないかと考え、その関連について検討を行った。

(5) 骨芽細胞分化マーカーにおける Sprouty2 の作用

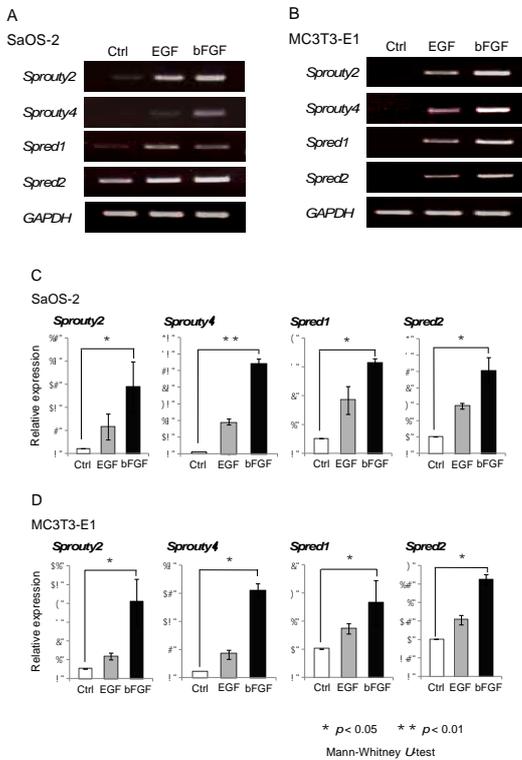
骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化した骨形成細胞で、幹細胞から段階的に分化していく。培養骨芽細胞系において、細胞の分化段階の指標となるマーカー遺伝子は多様に存在する。本研究では、SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に Sprouty2 を強制発現させ、

骨芽細胞分化マーカーである Runx2、ALP、osterix (Ox)、osteocalcin (OCN) の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

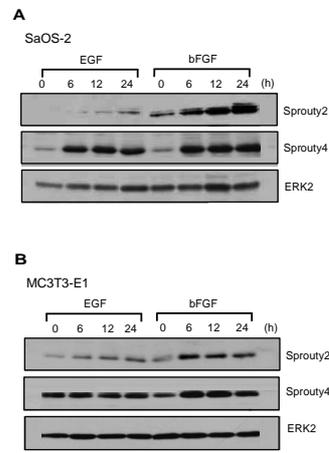
##### (1) 骨芽細胞株における Sprouty/Spred ファミリーの mRNA の発現

SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に EGF、bFGF で 4 時間刺激を行ったときの Sprouty/Spred ファミリーの mRNA の発現を RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法にて解析した。RT-PCR 法により、SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞において EGF、bFGF 刺激により Sprouty2、4 および Spred1、2 の発現誘導を認めた(A と B)。リアルタイム PCR 法では、両骨芽細胞ともに bFGF 刺激により Sprouty2、4、Spred1、2 の発現誘導の促進を認めた (C と D)。



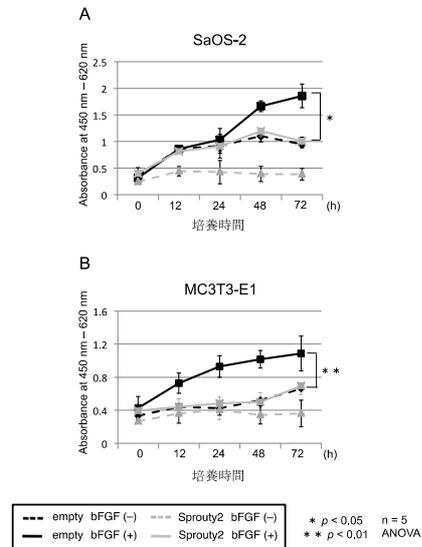
##### 骨芽細胞におけるタンパク質レベルで Sprouty2 と Sprouty4 の発現

SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に EGF と bFGF 刺激をそれぞれ行い、経時的に Sprouty2 および Sprouty4 の発現をウエスタンブロット法にて解析した。SaOS-2 において、Sprouty2 は EGF 刺激と比較して、bFGF 刺激により強い発現を認めたが、Sprouty4 に関しては EGF 刺激群と bFGF 刺激群に有意な差は認めなかった(A)。MC3T3-E1 においても同様に Sprouty2 は bFGF 刺激により発現の促進を認めたが、Sprouty4 においては EGF、bFGF 刺激で差は認めなかった(B)。



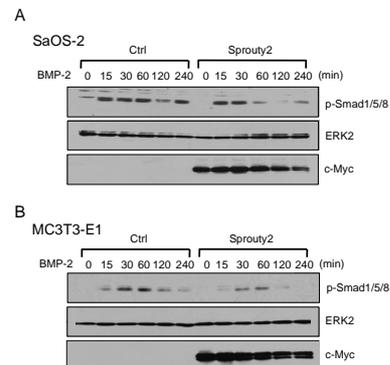
##### (2) Sprouty2 が骨芽細胞の増殖に及ぼす影響

SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に Sprouty2 を強制発現させ、bFGF 添加群と非添加群との比較を行ったところ、bFGF により細胞の増殖は促進したが、Sprouty2 強制発現により増殖能の低下を認めた。



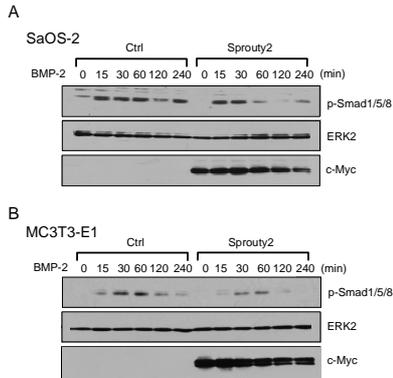
##### (3) FGF シグナル伝達経路における Sprouty2 の作用

両骨芽細胞ともに bFGF 刺激により MAPK および Akt のリン酸化の促進を認めたが、Sprouty2 強制発現群では、リン酸化の抑制を認めた。



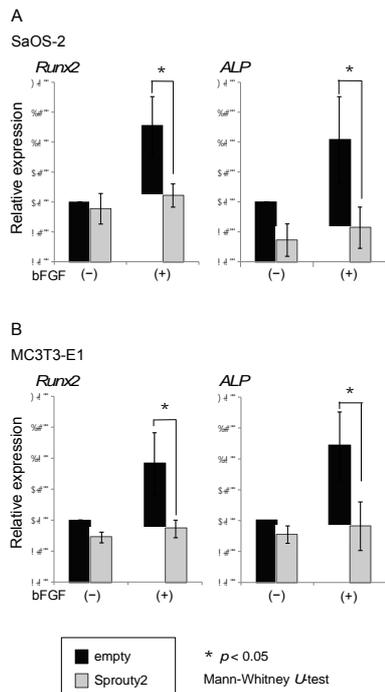
#### (4) BMP シグナル伝達経路における Sprouty2 の作用

両骨芽細胞ともに BMP-2 刺激により Smad1/5/8 のリン酸化促進を認めたが、Sprouty2 強制発現によりリン酸化の抑制を認めた。

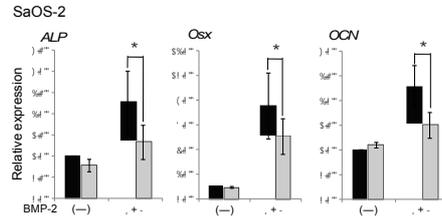


#### (5) 骨芽細胞分化マーカーにおける Sprouty2 の作用

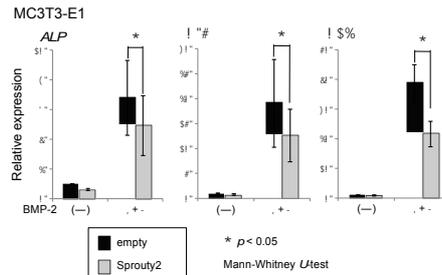
両骨芽細胞において bFGF 刺激により Runx2 および ALP の発現誘導が促進されたが、Sprouty2 によりその発現が抑制された。さらに、BMP-2 刺激により ALP、Osx、OCN の発現誘導が促進されたが、Sprouty2 強制発現群ではその発現抑制を認めた。



**C**



**D**



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼村 朋宏 (ONIMURA, TOMOHIRO)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 70713428