

令和元年6月11日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17262

研究課題名(和文) FGF2誘導性の骨芽細胞分化を促進するPP2A調節サブユニットの同定

研究課題名(英文) identification of regulatory subunit of PP2A promoting FGF2-induced osteoblast differentiation

研究代表者

杉山 悟郎 (Sugiyama, Goro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00722828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞分化や増殖におけるFGF2の影響を検討し、FGF2刺激時の調節サブユニットの発現量を調べた。FGFシグナルはアルカリホスファターゼ活性を抑制した。一方で低濃度刺激ではALP活性を亢進した。細胞増殖能では濃度による影響はなかった。さらに骨芽細胞分化マーカー遺伝子のmRNA発現量も低濃度刺激において亢進した。また、FGF2刺激によってPpp2r2b遺伝子とPR55タンパク質の発現増加が認められた。PR55に対する抗体処理はFGF2によるALP活性の抑制効果を解除する傾向にあった。それゆえFGFシグナルは骨芽細胞分化に抑制的に作用し、PR55はその作用機序に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨芽細胞の分化や増殖は様々な細胞内シグナル伝達の厳密な制御を受けて構築されている。骨芽細胞分化に関わる主要な経路として、BMPを介したシグナル伝達が知られている。また発達や増殖、生存などに関わるFGFシグナルが骨形成や形態への影響が明らかとなっており、この両者の関連性は生命の恒常性に重要である。本研究から、リン酸化制御機構として脱リン酸化酵素PP2Aがその調節分子を介して骨芽細胞分化に関わっている可能性が示唆され、今後同分子を標的にした新規治療法が開発されていく可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：we examined the influence of FGF2 on the differentiation and proliferation and the expression of mRNA of regulatory subunit of PP2A on FGF2 stimulation. FGF signals suppressed the activity of ALP. However, low concentration of FGF2 promoted the activity without affecting activity of proliferation. In addition, the expression of mRNA of differentiation marker gene was also promoted by low concentration of FGF2. Expression of Ppp2r2b gene and PR55 protein were promoted by FGF2 stimulation, and the suppression of ALP activity by FGF2 was rescued by specific antibody for PR55 treatment. Therefore, these data suggested that FGF signals are suppressed osteoblast differentiation and PR55 was involved in the suppression.

研究分野：分子生物学

キーワード：PP2A 調節サブユニット 骨芽細胞分化 FGF2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨代謝は骨芽細胞と破骨細胞の分化や増殖におけるバランスによって調節されている。破骨細胞分化に対する研究は目覚ましく、臨床応用されている製剤も多い。一方、骨芽細胞分化に対する研究は比較的少なく、更なる解析と臨床応用可能な製剤の開発が望まれている。線維芽細胞増殖因子(FGFs)は骨代謝における重要な役割を担うサイトカインであり、細胞増殖や骨格形成を正に制御することが知られている。しかし骨芽細胞分化に関する影響に関しては未だ一定の見解が得られていない。骨形成に関わる主要なシグナルである BMP-SMAD シグナルは筋組織での異所性骨化や骨折治癒を促進することなどから骨形成の主体をなすと考えられていた。しかし近年、骨芽細胞特異的な BMP 受容体 (BMPR) 型のコンディショナルノックアウトマウスにおいて骨量の増加が認められた。また BMP4 過剰発現系マウスにおいて反対に骨量の大幅な減少がみられることから、BMP シグナルの骨調節因子としての機能が明らかにされつつある。

2. 研究の目的

BMPR は 型と 型に分けられ、両者ともに膜貫通型キナーゼ受容体である。これを着火点として様々な伝達分子のリン酸化反応へとつながる。FGF シグナルが活性化されると ERK や Akt などのキナーゼが活性化され、BMP シグナルへ影響をおよぼすことが知られているが、その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、生体内において主要な増殖因子の一つである、線維芽細胞増殖因子(FGFs)が骨芽細胞分化におよぼす影響について、タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A を介した脱リン酸化制御の観点から、この制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

骨芽細胞分化における FGF2 の影響: マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 (E1) 細胞を 10% ウシ血清培地にて培養した後、セミコンフルエントの状態、FGF2 (0.3nM ~ 5.8nM) 存在下または非存在下に、分化誘導培地へ交換した。5 日間の培養後、p-ニトロフェルリン酸を基質として、アルカリフォスファターゼ (ALP) の酵素活性を測定した。骨芽細胞の増殖における FGF2 の影響: 同様にして E1 細胞をそれぞれの濃度の FGF2 で 5 日間刺激し、細胞をディッシュから回収した後、セルカウンターを用いて細胞数を計測した。FGF2 刺激による骨芽細胞の形態変化におよぼす影響: 同様にして E1 細胞を FGF2 刺激した後、アクチンを蛍光染色することにより、細胞形態を観察した。BMP シグナルによる骨芽細胞分化に対する FGF2 の影響: E1 細胞に対して BMP2 (100ng/ml) 存在下に FGF2 (0.1 nM ~ 5.8nM) 刺激を行い、ALP 活性を測定した。

4. 研究成果

骨芽細胞の膜表面には無数の線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFRs) が発現しており、それぞれの FGFs と FGFRs のサブユニットを介した相互作用によって、そのシグナル伝達は厳密に制御されている。中でも主要な FGF である FGF2 は古くから骨芽細胞の分化や増殖を調節する役割が示唆されており、骨代謝における中心的存在と考えられる。FGF2 による FGF シグナルは FGFR1 や FGFR2 などの受容体の活性化から ERK や Akt などのシグナル伝達分子のリン酸化を促進する。骨芽細胞分化に対する FGF2 の役割としてこれまで動物実験などにより促進する報告もある一方で、in vitro 実験では抑制的に作用する報告もあり、不明な点が多い。そこで、まずマウス骨芽細胞前駆細胞である MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) を用いて、

FGF2 刺激における骨芽細胞分化への影響を検討した。骨芽細胞分化マーカーとしてアルカリホスファターゼ (ALP) の酵素活性を測定した。FGF2 (0.3nM ~ 5.8nM) 刺激を 1 週間行うことによって E1 細胞の ALP 活性は濃度依存的に抑制された。しかし低濃度刺激においては ALP 活性を亢進する結果となった (Fig1)。同様に FGF2 低濃度と高濃度で刺激を行い、骨芽細胞分化マーカーである *Runx2* や *Alp* の mRNA 発現量を測定したところ、FGF2 高濃度刺激で発現量が抑制され、低濃度ではコントロール群と同等かわずかに発現量が増加する結果となった (Fig2)。

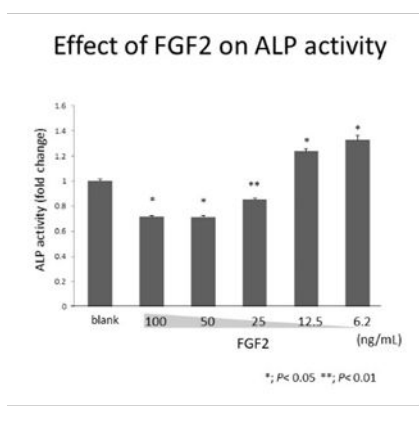


Fig.1

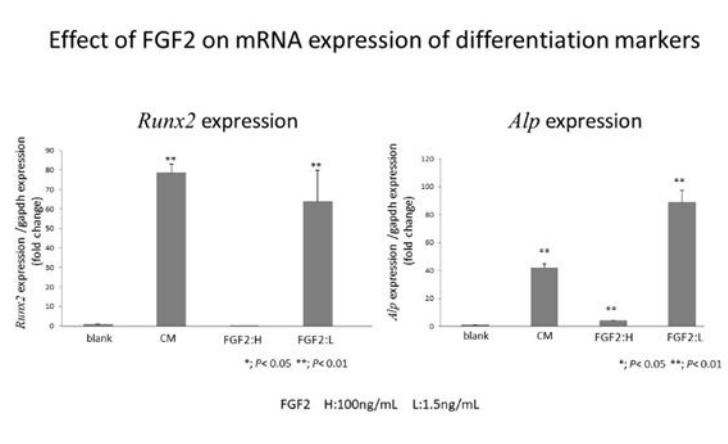


Fig.2

また、それぞれの濃度で刺激した際の細胞形態について検討したところ、高濃度刺激では細胞はやや丸みを帯びた敷石状をしているのに対して、低濃度では細い筋状に変化し骨芽細胞分化時に認められるような形態をしていた (Fig3)。このことから、FGF2 は骨芽細胞分化に抑制的に作用することが示唆された。さらに高濃度刺激と低濃度刺激では異なる作用を示すことがわかった。低濃度において骨芽細胞分化を促進する理由として、骨芽細胞分化への影響をおよぼさない濃度においても、細胞増殖能を活性化させている可能性が考えられたため、それぞれの濃度においての細胞数を検討した。FGF2 は低濃度刺激においても高濃度刺激と同程度の細胞増殖能を有することがわかった (Fig4)。つまり高濃度において FGF2 の細胞毒性の影響はなく、増殖シグナルと分化シグナルが独立して作用している可能性が示唆された。

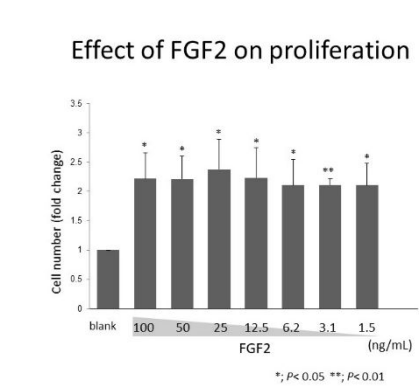


Fig.3

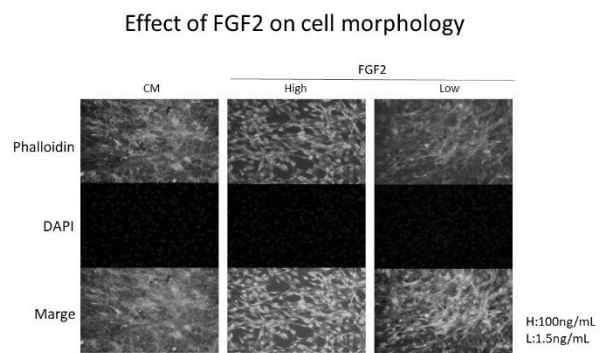


Fig.4

FGF シグナルは前述のように、様々な分子のリン酸化による活性化もしくは不活性化を経て伝達していく。FGF シグナルで重要な役割を担うリン酸化酵素については数多く報告されている一方で、脱リン酸化に関する研究は少ない。ERK や Akt などと関連性が知られている PP2A は主要なタンパク質ホスファターゼの一つであり、骨芽細胞を含めた多くの組織でユビキタスに認められる分子である。二量体として細胞内に存在し、複数の調節サブユニットと相互作用することで多彩な機能を構築する。そのため PP2A のリン酸化制御機構として調節サブユニットの発現や機能が重要となる。骨芽細胞分化に影響をおよぼす調節サブユニットについては不明な点が多い。そこで、FGF2 刺激による各調節サブユニットの発現動態について検討を行ったところ、PR55 をコードする *Ppp2r2b* 遺伝子の発現量の変化が一番多く、FGF2 刺激を行うことで 7 倍に増加した (Fig5)。さらにウエスタンブロッティング法によってタンパク質の発現量を解析すると、同様に FGF2 刺激によって発現量が増加することがわかった (Fig6)。次に FGF2 刺激時に抗 PR55 抗体を加えてみたところ FGF2 による ALP 活性への抑制作用を解除する傾向にあった。このことから、PR55 は FGF2 を作用させることで、FGF シグナルを介して発現し、骨芽細胞分化抑制に影響をおよぼしていることが示唆された。骨芽細胞分化の代表的なシグナルとして BMP シグナルが知られている。FGF2 と主要な BMP である BMP2 をともに作用させると、BMP シグナルによる骨芽細胞分化が抑制される。一方で、FGF シグナルは BMP シグナルで重要な役割を担う SMAD1/5/8 をリン酸化させる。このリン酸化には ERK や Akt を介したパスウェイの関与が示唆されているが、SMAD1/5/8 のリン酸化よりもさらに下流で、FGF シグナルを介した別の経路が存在する可能性が本研究から示唆された。

Effect of FGF2 on expression of PR55 β in MC3T3-E1 cells

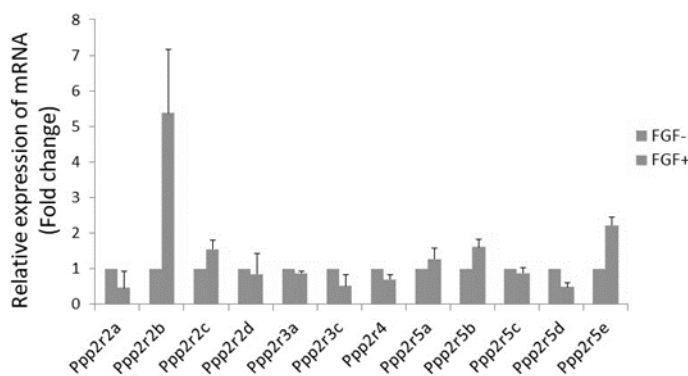


Fig.5

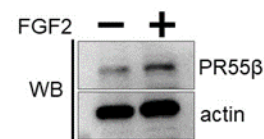


Fig.6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

鈴木あずさ、杉山悟郎：MC3T3-E1 細胞の分化と増殖における FGF2 の影響 第 60 回歯
科基礎医学会学術大会：福岡市 6 月 5 日 2018 年
鈴木あずさ、杉山悟郎、中島 梓、安田光佑、住田知樹、山田朋弘、森 悦秀：PP2A 調
節サブユニットを介した FGF シグナルと Wnt シグナルのクロストーク 口腔科学会学術
大会：埼玉 川越、4 月 19 20 日 2019 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：高 靖、山田 朋弘、鈴木 あずさ

ローマ字氏名：(GAO JING)、(YAMADA TOMOHIRO)、(SUZUKI AZUSA)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。