

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791348

研究課題名 (和文) SUMO 化修飾の調節による歯根膜細胞から骨芽細胞への分化制御

研究課題名 (英文) Control of osteoblastic differentiation of periodontal ligament cells via regulation of SUMOylation

研究代表者

雪田 聡 (YUKITA AKIRA)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80401214

研究成果の概要 (和文)：

歯周病によって失われた歯周組織の回復を目的とした再生医療への応用に向けて、歯を支える骨(歯槽骨)を作る骨芽細胞を効率的に分化させることは非常に重要な目標の1つである。SUMOと呼ばれる小さなタンパク質が別のタンパク質に結合すること(SUMO化修飾)が目印となり、様々な生命現象を制御していることが知られている。本研究により人為的にSUMO化修飾を阻害すると、BMP(骨形成タンパク)シグナル伝達を促進させ、骨芽細胞への分化を増強させることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

Establishment of efficient differentiation into osteoblast is one of the most important approaches for regenerative therapy for periodontal disease. Conjugation of SUMO (Small ubiquitin-related modifier) is a post translational modification and regulates various biological events. In this study, I revealed that inhibition of SUMOylation (conjugation of SUMO) enhances osteoblastic differentiation via direct activation of BMP signal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：硬組織再生・SUMO化修飾・細胞分化制御

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病による歯周組織の破壊は歯の脱

落を引き起こし患者のQOL (Quality of life) を著しく低下させる。破壊された歯周病の再生にはエムドゲインや人工膜を用いた歯周

組織再生療法が実用化されているが、広く歯周組織を失った場合に適応が難しいなどの課題も多く残されている。歯周組織の形成を生体に近い状態で再現させることにより歯周組織を再生するアプローチは、これらの課題を克服する新たな治療法の確立に結びつくことが強く期待される。

(2) 歯根膜は歯槽骨とセメント質を結ぶ腱としての役割を担う軟組織である。歯根膜細胞は骨芽細胞としての特徴も併せ持ち、この細胞を利用して歯周病により失われた歯周組織を再生させる方法が研究されているが、細胞の分化制御のメカニズムなど未解明な点が数多く残されている。

(3) SUMO (Small Ubiquitin related modifier) はユビキチンに類似したタンパク質翻訳後修飾の1つで、SUMO化修飾により、標的タンパク質の細胞内局在や活性、安定性などが変化することが知られている。BMPシグナルの転写因子として機能する Smad4 もSUMO化修飾を受けることによって活性が調節されるが、骨形成におけるSUMO化修飾の役割についてはまだ知見が得られていない。ごく最近、骨芽細胞株 Saos-2 においてSUMO化修飾の促進因子 Ubc9 が Smad1 の核内局在に必要であるという報告もなされ、骨形成とSUMO化修飾の関連が注目されようとしているが、骨芽細胞の分化におけるSUMO化修飾の役割は未だほとんど知見が得られていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯周組織、特に歯槽骨の再生治療への応用に向けて、骨芽細胞の分化機構をさらに深く解明することを目指し、BMPシグナルなど、骨芽細胞分化に関与するシグナル伝達の調節を介して、SUMO化修飾が骨組織の形成に重要な役割を担っているのではないかと考え、

①SUMO化修飾に関与する因子の骨組織における局在

②骨芽細胞分化におけるSUMO化修飾の役割とSUMO化修飾の標的タンパク質の同定を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織学的検討

4週齢マウス脛骨を用い、SUMO化修飾に関与するSUMO-1、SUMO-2/3、Ubc9(以下、SUMO化修飾因子と表記)のそれぞれを認識する抗体を用いて、骨組織におけるそれぞれのタンパク質の局在を免疫組織学的に検討した。

### (2) 培養細胞

骨芽細胞の初期分化モデルとしてマウス筋芽細胞由来の培養細胞であるC2C12細胞を用いた。

### (3) SUMO化修飾の阻害

SUMO化修飾に必須の酵素であるUbc9をsiRNAによってノックダウンすることによりSUMO化修飾を阻害した。Ubc9のタンパク量の低下およびSUMO化修飾の阻害をウェスタンブロットにより確認した。

### (4) BMP2添加による骨芽細胞分化

C2C12細胞を培養細胞用のプレートに播種後、ヒト組み換えBMP2を添加して培養した。骨芽細胞分化の指標として、骨芽細胞マーカーであるアルカリホスファターゼの活性をNBT/BCIPを用いた染色によって、また骨芽細胞マーカーである*Runx2*、*Osterix*の遺伝子発現をRT-PCR法によって検討した。

### (5) BMPシグナル伝達の検討

BMPシグナルが活性化された時にのみ特異的に応答するId-1プロモーターをC2C12細胞に導入し、レポーターアッセイによりBMPシグナルの伝達を検討した。

### (6) Smad4変異体の作成

Smad4野生型を鋳型とし、113番目および158番目のリジン残基、およびその両方がアルギニンに置換されるようにプライマーを設計し、PCRにより点変異を加えた。作成したSmad4変異体は塩基配列を確認し、その他の配列に変異がないことを確認した。

## 4. 研究成果

### (1) SUMO化修飾に関与するタンパクの局在は骨芽細胞で減弱する

骨組織においてSUMO化修飾が何らかの役割を担っているのかを知るため、まず骨組織におけるSUMO化修飾因子の局在を免疫組織学的に検討した(図1)。

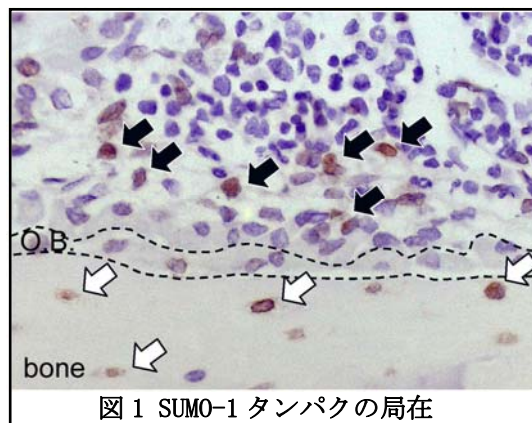


図1 SUMO-1タンパクの局在

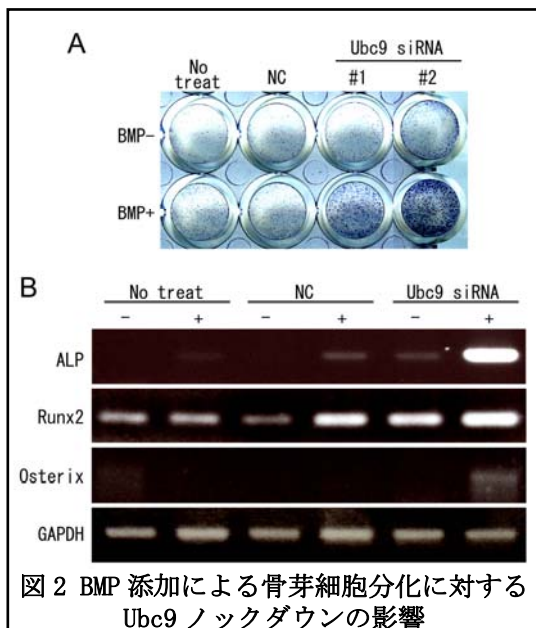
その結果、SUMO-1 タンパク質の局在を示すシグナルは骨芽細胞付近の骨髄細胞（黒矢印）および骨基質中に存在する骨細胞（白矢印）に認められる一方で、骨芽細胞が存在する領域（破線内 O. B. と表記）では減弱する傾向が認められた。同様の結果は SUMO-2/3 および Ubc9 の局在についても同様であることが確かめられた。

骨芽細胞近傍の骨髄細胞（黒矢印）には骨芽細胞前駆細胞が含まれると考えられ、骨組織において SUMO 化修飾因子は骨芽細胞の分化時に一度そのタンパク量が減少し、骨細胞へ分化するとタンパク量が回復するのではないかと考えられる。したがって、細胞内の SUMO 化修飾も同様に骨芽細胞の分化時に抑制される可能性が示唆された。

### (2) SUMO 化修飾の阻害は BMP 添加による骨芽細胞分化を促進させる

研究成果(1)の結果より SUMO 化修飾が骨芽細胞分化を抑制的に調節しているのではないかと予想し、培養細胞を用いて SUMO 化修飾を阻害した場合の骨芽細胞分化への影響を検討した。培養細胞株は初期の骨芽細胞分化のモデルとして優れているマウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞を用いた。

SUMO 化修飾に必須の酵素である Ubc9 を siRNA によってノックダウンすると、SUMO 化修飾が阻害されることを確認した。この状態および、ネガティブコントロールの siRNA を導入した場合とでヒト組み換え BMP2 を添加し、骨芽細胞への分化を検討した。その結果を図 2 に示す。



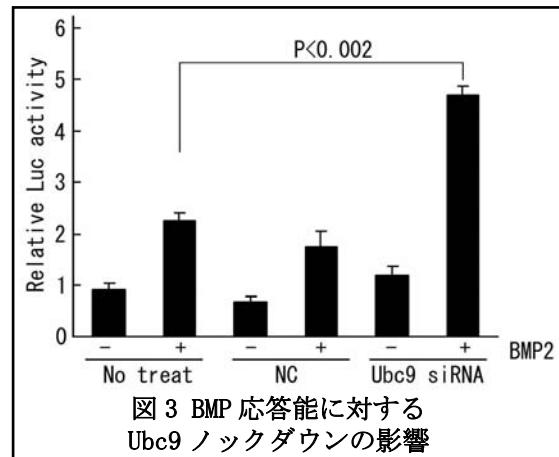
無処理(No treat)およびネガティブコントロ

ール(NC)と比較して Ubc9 のノックダウンによって SUMO 化修飾を阻害すると、BMP2 の添加によるアルカリホスファターゼの活性化(青色の呈色)が上昇し(図 2A、Ubc9 siRNA #1 および#2)、アルカリホスファターゼ(ALP)、Runx2、Osterix といった分化マーカーの遺伝子発現が上昇することが分かった(図 2B)。以上の結果より、BMP が誘導する骨芽細胞分化が SUMO 化修飾の阻害により増強されることが分かり、SUMO 化修飾は骨芽細胞分化を抑制的に調節していることが示唆された。

### (3) SUMO 化修飾の阻害は BMP シグナルの細胞内伝達を促進する

SUMO 化修飾の阻害による骨芽細胞分化促進の影響と BMP シグナル伝達との関連を明らかにするため、Id-1 プロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。Id-1 は BMP シグナル伝達に特異的に応答する遺伝子であり、SUMO 化修飾の阻害による分化促進が BMP シグナルの伝達を直接促進しているかを検証できる。

無処理(No treat)、ネガティブコントロールの siRNA (NC) を導入した場合、および Ubc9 に対する siRNA を導入して SUMO 化修飾を抑制した場合(Ubc9 siRNA)とで BMP を添加し、Id-1 プロモーターによって BMP 応答能を検討した結果、SUMO 化修飾の阻害により BMP シグナルの伝達が直接促進されることが明らかとなった(図 3)。



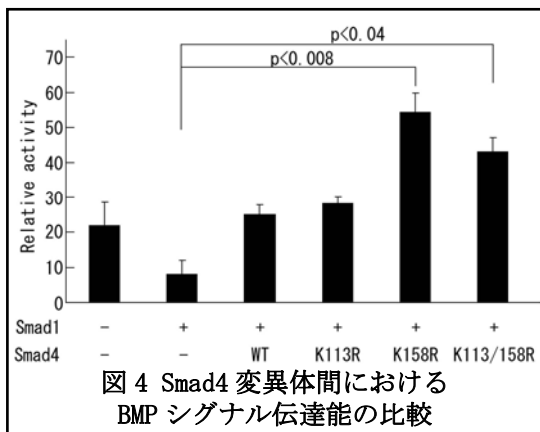
以上のことから研究成果(2)で示した SUMO 化修飾の阻害による骨芽細胞分化の促進は、BMP シグナル伝達を直接的に促進した結果であることが示唆された。

### (4) Smad4 の SUMO 化阻害は BMP シグナル伝達を促進する

SUMO 化阻害によって BMP シグナル伝達は促進することが明らかとなったが、BMP シグナル伝達において応答 Smad として働く

Smad1/5/8 のリン酸化レベル、および核内で転写因子として働く Smad4 のタンパクレベルには大きな変化が認められなかった。また、以前の研究により、Smad4 は SUMO 化修飾を受けることによりその転写活性が調節されていることが報告されている。

以上のことから、本研究で観察された SUMO 化修飾による骨芽細胞分化の調節は、Smad4 の SUMO 化修飾による転写活性の調節が重要なのではないかと考えられた。そこで、Smad4 において SUMO 化修飾を受ける 2 つのアミノ酸残基 (113 番目および 158 番目のリジン残基) に変異を加え、SUMO 化修飾を受けないようにした Smad4 変異体を作成し、Id-1 プロモーターを用いたレポーターアッセイにより BMP 応答能の検討を行った (図 4)。その結果、野生型 (WT)、113 番目のリジン残基をアルギニンに置換した変異体 (K113R) と比較して 158 番目のリジン残基に変異を加えた場合 (K158R) および両方のアミノ酸残基に変異を加えた場合 (K113/158R) に Smad4 の BMP 応答能が有意に上昇することが明らかとなった。



このことから SUMO 化修飾の阻害による骨芽細胞分化促進の少なくとも 1 つの原因は Smad4 の SUMO 化修飾が阻害されることにより BMP シグナル伝達が促進されたためであると考えられる。

#### (5) 研究成果のインパクトと今後の展望

本研究によって、①骨組織において骨芽細胞では SUMO 化修飾因子の発現が低下すること、②Ubc9 のノックダウンによる SUMO 化修飾の阻害が BMP 添加による骨芽細胞分化を促進させること、③Smad4 の SUMO 化修飾がマウス筋芽細胞由来 C2C12 において BMP シグナルを抑制的に制御していることがはじめて明らかにされた。

これらの知見を合わせ考えると、Smad4 の SUMO 化修飾が BMP シグナルによる骨芽細胞の分化を抑制していることが考えられる。BMP は強力な骨誘導能をもち、臨床応用が期待さ

れているタンパクであるが、大量に必要である点をはじめ、多くの課題が残されている。将来的に安全かつ人為的な SUMO 化修飾の阻害が可能となれば、本研究で得られた知見を活かし、SUMO 化修飾の制御を介して BMP がもつ骨誘導能を大幅に促進することが可能となるかもしれない。もしそうなれば、効率的な骨芽細胞分化の誘導が可能となり、歯周病で失われた歯周組織をはじめ硬組織の再生医療に応用されることが期待される。

一方で、SUMO 化修飾の標的となるタンパク質は数多く同定されており、Smad4 のみならず他のタンパク質の SUMO 化修飾も分化制御に重要である可能性も考えられる。今後、本研究で得られた知見を活かし、骨芽細胞分化に関与する他の因子に対する SUMO 化修飾の変動を検討する事や、SUMO 化修飾の阻害によって発現が変動する遺伝子の機能を解析する事によって、新たな分化機構が解明され、硬組織の再生治療につながることも強く期待される。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

発表者：雪田 聡

発表演題：骨芽細胞分化における SUMO 化修飾因子 Ubc9 の役割

学会名：第 51 回歯科基礎医学会学術大会・総会

発表年月日：2009 年 9 月 11 日

発表場所：新潟県新潟市新潟コンベンションセンター

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

雪田 聡 (YUKITA AKIRA)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80401214