

機関番号：32409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890243

研究課題名（和文） 血小板に含まれる骨形成促進因子の骨格形成と血管における生理的役割の解明。

研究課題名（英文） Elucidation of physiological role of the bone formation potentiator contained in platelet.

研究代表者

大手 聡 (OHTE SATOSHI)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00547979

研究成果の概要（和文）：

本研究では申請者の研究グループが発見した、骨形成を促進する血小板由来タンパク質の作用機序の解明と将来的な臨床応用を目指し研究を行った。その結果、目的タンパク質は筋組織などで異所性骨形成を誘導するサイトカインである bone morphogenetic protein (BMP) に対して細胞レベルおよび生体レベルにおいてその活性を増強することが明らかとなった。本研究の成果から、目的タンパク質が骨形成促進薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to elucidate the physiological role of the bone formation potentiator contained in platelet. As a result, it became clear that this protein increase the activity of bone morphogenetic protein (BMP), which is the cytokine induce ectopic bone formation in muscular tissue, *in vitro* and *in vivo*. Our findings suggest that this protein will become new medicine of bone formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,990,000	597,000	2,587,000

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：骨代謝・血小板・Bone morphogenetic protein・Smad

## 1. 研究開始当初の背景

Bone morphogenetic protein (BMP) は、筋組織などで異所性骨形成を誘導するサイトカインとして発見された。今日、BMP は、異所性骨形成のみならず、個体発生過程の骨格形成や骨折の再生などにも重要なことが明らかとなっている。すでに欧米では、BMP が骨形成促進薬として臨床応用されているが、サルやヒト等の霊長類では、げっ歯類に比べて骨誘導に 100 倍以上の BMP が必要なことが

障害となっている。以前、我々は、BMP と併用できる BMP 活性を促進する生理活性物質を探索した結果、ヘパリンやヘパラン硫酸のような硫酸化多糖が、BMP による骨芽細胞分化の誘導活性や、BMP の異所性骨誘導活性を促進することを見出した。しかし、ヘパリンの全身的な長期投与は骨粗鬆症を惹起することが知られており、BMP による骨形成を促進する新しい生理活性物質の開発が必要と考えられた。そこで全身性に作用する BMP 活性

促進因子を探索した結果、血小板中に BMP 活性促進効果を見出し、この活性因子の単離・精製に成功した。

## 2. 研究の目的

我々のグループが発見した血小板由来骨形成促進因子について、以下の課題に取り組む。

(1) 大腸菌発現系を用いた血小板由来因子の大量発現系の確立と活性因子の大量調製。

(2) BMP との移植実験における *in vivo* での局所的骨形成促進活性の評価。

(3) BMP シグナル増強作用の分子機構の解明。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸菌を用いた遺伝子組み換えタンパク質の調製。

我々が同定した血小板由来因子のヒト cDNA を PCR 法でクローニングし、大腸菌の誘導型発現ベクター pET32 にサブクローニングした。この発現ベクターで大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を形質転換した後、チオレドキシニン・血小板由来タンパク融合タンパク質の発現を IPTG で誘導した。大腸菌の可溶性画分から His カラム、およびヘパリンカラムを用いて精製した。

(2) 血小板由来タンパク質の BMP リガンド特異性の解析。

本タンパク質の BMP に対する特異性を、筋芽細胞 C2C12 細胞における骨芽細胞分化誘導能を指標に RT-PCR、Northern blot 法、Western blot 法等により検討した。

(3) BMP と血小板由来タンパク質の移植による異所性骨形成実験。

本因子が *in vivo* で BMP 活性を促進することを確認するため、血小板由来タンパク質を BMP-2 と共にコラーゲンスポンジの担体を用いてマウスの筋膜下に移植し、誘導される異所性骨形成を生化学的、分子生物学的、および組織学的方法で経時的に観察した。

(4) BMP シグナル調節機構の解析。

BMP による細胞内シグナルは転写因子 Smad のリン酸化とその後の標的遺伝子の転写誘導によって伝達される。そこで、BMP シグナルへの影響を Smad のリン酸化、RT-PCR による BMP 応答性遺伝子の発現の変動および骨芽細胞分化誘導能を指標に解析した。

## 4. 研究成果

(1) 大腸菌で作製したヒトおよびマウスの目的タンパク質は、*in vitro* で BMP-4 による ALP や Osteocalcin の発現を促進した。また、BMP 刺激の初期反応として処理後 1 時間以内に認められる Smad のリン酸化と初期応答遺伝子 Id1 の発現も促進した。

(2) 目的タンパク質はヘパリンに高親和性であり、実際、ヘパリンカラムを用いてリコンビナントタンパクを効率よく生成することが可能であった。この血小板由来タンパク質は多量体を形成することが知られている。そこで、ヘパリン結合ドメイン、または多量体形成ドメインのアミノ酸に変異を導入したところ、BMP に対する促進活性を失った。

(3) 目的タンパク質を BMP-2 と混合してマウス筋膜下に移植すると、BMP-2 単独群に比べて大きく、骨塩量や骨密度の高い異所性骨が誘導された。一方、目的タンパク単独での異所性骨誘導作用は確認されなかった。

(4) 目的タンパク質が BMP の骨芽細胞分化誘導活性を増強したことから、BMP の細胞内シグナル伝達機構を解析した。その結果、以下のことが明らかとなった。

① BMP による骨芽細胞の分化誘導と筋芽細胞の分化抑制作用には、細胞内シグナル伝達因子である転写因子 Smad が重要であった。特に、BMP による骨芽細胞の分化誘導には Smad1/5 が、筋分化の抑制には Smad4 がそれぞれ特に重要であることが明らかとなった。

② 骨芽細胞の分化誘導活性に重要な Smad1/5 の活性は、C 末端のリン酸化によって制御された。この C 末端の脱リン酸化を調節するホスファターゼ PPM1A は、BMP の骨芽細胞分化誘導活性を阻害した。さらに我々は、C 末端に変異を導入した構成的活性型 Smad1 を用いた実験から、PPM1A の作用機序として、Smad の脱リン酸化以外の作用点があることを見出した。この機序を解析した結果、PPM1A は、プロテアソーム系を介した Smad の分解を促進する事で BMP シグナルを抑制することが明らかとなった。

③ さらに、PPM1A と同様に Smad の C 末端を脱リン酸化するホスファターゼと報告されている SCP1 は、Smad の脱リン酸化ではなく、Smad のさらに下流で誘導される骨芽細胞分化に重要な因子を抑制することが明らかとなった。

④形態形成誘導因子である Wnt が BMP と協調的に骨芽細胞分化を誘導し、そのメカニズムは GSK3 $\beta$  依存的かつ  $\beta$ -catenin 非依存的であることが示された。

#### 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 5 件)

(1) A novel mutation of ALK2, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H. Ohte S, Shin M, Sasanuma H, Yoneyama K, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Maruki Y, Matsuoka M, Namba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Furuya H, Kamizono J, Kitoh H, Nakashima Y, Susami T, Haga N, Komori T, Katagiri T. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011, 407:213-218. 査読あり。

(2) Suppression of BMP-Smad signaling axis-induced osteoblastic differentiation by small C-terminal domain phosphatase 1, a Smad phosphatase. Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Shin M, Yoneyama K, Murata E, Kanomata K, Nojima J, Ono Y, Yoda T, Fukuda T, Katagiri T. *Mol Endocrinol*. 2011, 25:474-481. 査読あり。

(3) Canonical Wnts and BMPs cooperatively induce osteoblastic differentiation through a GSK3 $\beta$ -dependent and  $\beta$ -catenin-independent mechanism. Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Kanomata K, Yoneyama K, Kato H, Akita M, Oda H, Katagiri T. *Differentiation*. 2010, 80:46-52 査読あり。

(4) Dual roles of smad proteins in the conversion from myoblasts to osteoblastic cells by bone morphogenetic proteins. Nojima J, Kanomata K, Takada Y, Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Takada T, Tsukui T, Yamamoto TS, Sasanuma H, Yoneyama K, Ueno N, Okazaki Y, Kamijo R, Yoda T, Katagiri T. *J Biol Chem*, 2010, 285:15577-15586. 査読あり。

(5) Protein phosphatase magnesium-dependent 1A-mediated inhibition of BMP signaling is independent of Smad dephosphorylation. Kokabu S, Nojima J,

Kanomata K, Ohte S, Yoda T, Fukuda T, Katagiri T. *J Bone Miner Res*. 2010, 25:653-60. 査読あり。

[学会発表] (計 18 件)

(1) Identification of Zranb2, a novel R-Smads binding protein, as a suppressor of BMP signaling. Satoshi Ohte, Shoichiro Kokabu, Toru Fukuda, Shunichiro Iemura, Hiroki Sasanuma, Katsumi Yoneyama, Masashi Shin, Eijiro Jimi, Toru Natsume and Takenobu Katagiri. 2010 ASBMR Annual Meeting, 2010 年 10 月 17 日、トロント(カナダ)

(2) Platelet Factor 4 is a novel potentiator of BMP-induced osteoblastic differentiation and bone formation. Takenobu Katagiri, Toru Fukuda, Akihiro Tomoyasu, Masaaki Goto, Kunihiko Kodaira, Shoichiro Kokabu, Satoshi Ohte, 他 18 名 2010 ASBMR Annual Meeting, 2010 年 10 月 17 日、トロント(カナダ)

(3) Identification and characterization of a nuclear protein as a co-suppressor of BMP-regulated R-Smads. Satoshi Ohte, Shoichiro Kokabu, Toru Fukuda, Shunichiro Iemura, Hiroki Sasanuma, Katsumi Yoneyama, Masashi Shin, Eijiro Jimi, Toru Natsume and Takenobu Katagiri 8<sup>th</sup> International BMP Conference, 2010 年 9 月 15 日、ルーベン(ベルギー)

(4) 新規 R-Smad 結合分子 ZRANB2 の BMP シグナル阻害活性。大寺聡、古株彰一郎、福田亨、笹沼寛樹、米山克美、進正史、自見英治郎、片桐岳信。第 28 回日本骨代謝学会、2010 年 7 月 21 日、東京

(5) 骨芽細胞における Smad と Runx2 のクロストーク。大寺聡、福田亨、古株彰一郎、片桐岳信。第 7 回 RCGM フロンティアシンポジウム、2009 年 11 月 3 日、埼玉

[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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

[http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div04\\_PPhysiol/index.html](http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div04_PPhysiol/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大手 聡 (OHTE SATOSHI)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00547979

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：