

信田 益宏 論文内容の要旨

主論文

Critical regulation of BMP-induced osteoblastic differentiation by
Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling

Delta1/Jagged1 刺激によって活性化された Notch1 シグナルによる
BMP 誘導性骨芽細胞分化の重要な制御

信田 益宏、塚崎 智雄、柴田 恭明、チャン シン、
森石 武史、坂野 誠治、進藤 裕幸、山口 朗

Journal of Biological Chemistry, 2005 (in press)

長崎大学大学院医学研究科外科系専攻
(指導教授：進藤裕幸 教授)

緒言

哺乳類で4種類同定されている Notch 受容体は、膜結合型リガンドである Delta や Jagged により活性化され、様々な器官の発生に関与する。同時に Notch のシグナル伝達経路の異常が種々の疾患に関与していることも明らかになってきた。リガンド結合により Notch の細胞内ドメインは切断され、核内に移行後、核内蛋白と結合して種々の標的遺伝子を活性化する。しかし大多数の Notch 関連因子のノックアウトマウスが胎生早期致死のため、骨軟骨形成における作用は不明であった。近年 Notch1 の細胞内ドメインを過剰発現させることで骨分化への関与を検討した報告があるが、リガンド刺激でも同様な現象が起こりえるのか不明であり、また骨形成に重要な bone morphogenetic protein (BMP) との協調作用及びそのメカニズムは依然明らかにされていない。本研究では骨芽細胞の分化誘導において Delta1、Jagged1 刺激による Notch の活性化に差異があるか否か、そして BMP による分化誘導に Notch シグナルが必要かどうかを、主に培養細胞を用いて検討した。

方法

マウス大腿骨に作製した骨欠損部の修復過程や培養骨芽細胞における Notch、Delta、Jagged の発現を免疫染色や real-time PCR で検討した。Delta1、Jagged1 の骨芽細胞分化への関与を検討するため、各々の発現ベクターを前骨芽細胞である MC3T3-E1、C2C12 細胞に一過性に遺伝子導入し、骨芽細胞の分化マーカーである alkaline phosphatase (ALP) 活性や osteocalcin の産生量を蛋白レベルやプロモーター活性から検討した。さらに Delta1、Jagged1 のリコンビナント蛋白を用い、骨芽細胞の分化誘導能を検討するとともに、長期培養あるいはスキャフォールドを用いた移植実験から骨形成誘導能を調べた。また標的遺伝子活性化における Notch1 結合因子 CBF-1 の

関与について検討した。Notch シグナルを抑制するため、Notch 1 の細胞内ドメインをデコイとして過剰発現させたり、特異的インヒビター L685、458 による抑制実験、あるいは siRNA を用いて内因性 Notch1 の発現を阻害した。BMP シグナルとのクロストーク機構の解明のため、Id-1、Hes1 等のプロモーター活性や mRNA の発現を検討した。

結果

Notch1、Delta1、Jagged1 は、骨欠損部に集積した未分化間葉系細胞や骨芽細胞で共発現し、特に骨再生過程の 5 日目をピークに発現は上昇した。培養した前骨芽細胞にも上記因子の発現が確認できた。発現ベクターによる一過性の過剰発現では Delta1、Jagged1 とともに単独では明らかな生理活性を示さなかったが、BMP で誘導された ALP 活性をプロモーター活性も含め促進させるとともに、osteocalcin の発現を抑制した。リコンビナント蛋白刺激でも同様な結果が得られたが、そのためにはリガンドの培養ディッシュへの固層化が必要だった。また MC3T3-E1 細胞を長期に培養すると ALP 活性だけでなく osteocalcin や他の分化マーカー遺伝子の発現が上昇するとともに、石灰化も促進された。そしてヌードマウスに移植すると BMP による骨形成を促進した。さらに Delta1、Jagged1 による分化誘導はドミナントネガティブ CBF-1 で抑制された。Notch シグナルあるいは発現そのものを抑制すると、ALP 活性や osteocalcin の産生は著明に阻害され、他の分化関連因子の発現も抑制された。Delta1、Jagged1 は BMP による Id-1 遺伝子誘導には影響を及ぼさなかったが、Notch シグナルを抑制すると Id-1 の発現をプロモーターレベルで著明に抑制した。

考察

Notch シグナルは神経発生過程で接触型の側方抑制機構としての役割が認識されていたが、近年では骨髄における haematopoietic stem cell のニッチの維持に重要であることが明らかになっている。本研究の *in vivo* での発現分布から Delta/Jagged-Notch 系が骨芽細胞の分化過程でオートクライン・パラクライン的に作用している可能性が示唆された。また培養細胞に対する Delta1、Jagged1 の比較から、両者間に機能的差異はなく、osteocalcin の発現が一過性に抑制されるものの、最終的には BMP による骨芽細胞への分化を促進し、かつ細胞内では CBF-1 を介した伝達経路が重要であることが判明した。*In vivo* での発現分布を考え合わせると、Delta1 と Jagged1 は機能的には重複しており、未分化間葉細胞から骨芽細胞への細胞系譜の決定に重要な働きをしているものと考えられる。さらに Notch シグナルの抑制実験から Notch1 は骨芽細胞への分化誘導のみならず、BMP のシグナル伝達に必須であることが明らかになった。以上の結果から、Delta、Jagged を介した Notch1 標的遺伝子の誘導までのシグナル伝達経路は、近年注目を浴びている骨再生医療から骨粗鬆症までの幅広い分野で、治療のターゲットになる可能性を有するものと考えられる。