

氏名	葛 西 義 明
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第591号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	新規分泌性 BMP アンタゴニスト, ectodin の発見と歯形成における役割に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 伊藤 信行 教授 中山 和久 教授 小堤 保則

論文内容の要旨

これまでに多くの分泌性因子が同定され、形態形成や組織修復をはじめとする様々な生命現象において必要不可欠な役割を果たしていることが知られている。従って新規分泌性因子の探索・同定及びその機能解析は、複雑な生命現象を理解するうえで非常に意義のあることだと考えた。申請者は、新規分泌性タンパク質 ectodin を同定し、ectodin が BMP (骨形成タンパク質) アンタゴニストであること、正常な歯の形成に必須な役割を果たすことを明らかにした。

第一章 新規分泌性 BMP アンタゴニスト, ectodin の同定と発現分布

申請者は、DNA データベースを活用した新規分泌性因子の探索を行い、その結果ひとつの機能不明な新規タンパク質に着目した。ectodin と命名したこのタンパク質には典型的なシグナル配列の他に、シスチンノットモチーフと呼ばれる、システインの繰り返し配列からなるモチーフが存在していた。このモチーフは分泌性の BMP アンタゴニストによく保存されていることが知られており、ectodin にも同様の活性が期待された。まず ectodin が分泌性因子であることを確認するために、バキュロウイルス発現系を用いて ectodin を発現させた。その結果、培養上清に ectodin の存在が認められたことから、ectodin が分泌性因子であることが確認できた。

この発現系を用いて ectodin 組み換えタンパク質を作製し、BMP に対する抑制作用について検討した。前駆骨芽細胞に BMP を添加すると、細胞内シグナル伝達因子である Smad1/5/8 が特異的にリン酸化され、細胞内のアルカリフォスファターゼ活性が上昇する。ここへ ectodin を同時添加した場合、これらが抑制されることを確認した。この抑制作用は代表的な BMP である BMP2, BMP4, BMP7 いずれを用いた場合でも同様であった。実際 BIACORE システムにより ectodin がこれらの BMP と結合することが分かった。このことから ectodin は多くのサブタイプの BMP に対して抑制効果をもつ BMP アンタゴニストであることが明らかとなった。

次に ectodin の胎児期における発現部位を *in situ* hybridization 法を用いて検討した。その結果、発達段階の歯に強く発現していることが分かった。発達段階の歯はエナメル結節と呼ばれるシグナルセンターを形成するが、ectodin はエナメル結節には発現せず、その取り囲むような発現パターンを示した。これまでに発達段階の歯においてこのようなユニークな発現パターンを示す因子は報告されていない。このことから ectodin は歯形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

第二章 ectodin 欠損マウスの作製と歯における表現型解析

ectodin の生理的役割を明らかにするために、申請者はジーンターゲット法を用いて ectodin 欠損マウスを作製した。ectodin 欠損マウスはメンデルの法則に従って見かけ上正常に生まれ、その後の発育にも明らかな異常を認めなかった。そこで ectodin が発達段階の歯に特徴的な発現を示していたことから、成体において歯の様子を詳細に観察した。マウスは前歯に相当する門歯と奥歯に相当する臼歯を持ち、臼歯には咬頭とよばれる突起が規則正しく配置されている。ectodin 欠損マウスには本来形成されるべき門歯・臼歯に加えて、過剰な歯がそれぞれの近傍に形成されていた。また臼歯の表面には咬

頭の増加による表面パターンの異常が観察された。従って *ectodin* は正常な歯の本数の決定や臼歯表面のパターン形成に必要な不可欠な因子であることが明らかとなった。次に *ectodin* 欠損マウスの歯に認められた2つの形成異常について、胎児期の歯形成過程に着目し、その分子メカニズムの解明を試みた。

将来歯の生える領域の決定は早く、胎生12日齢頃にはすでに「予定歯形成領域」として、それぞれ上顎・下顎の特定の位置に規定されている。そこでこの予定領域に特異的に発現することが知られている *Shh* (*Sonic hedgehog*) の発現領域を whole-mount *in situ* hybridization 法で調べたところ、野生型と比較して明らかな *Shh* 発現領域の拡大が認められた。このことから、*ectodin* は胎児期における予定歯形成領域の広さを負に調節することで、将来の歯の本数を決定していることが明らかとなった。

予定歯領域の形成と同様に、臼歯表面のパターン形成もまた胎児期に規定されている。これまでの知見から、臼歯表面の咬頭は胎生16日齢頃のエナメル結節に由来し、これが動物種によって異なる咬頭パターンを示す最初の兆候となることが知られている。一方でエナメル結節の細胞自体は BMP シグナルを受けとることで、サイクリン依存性キナーゼインヒビターである *p21* を発現し、細胞増殖を停止している。そこで胎児期の *ectodin* 欠損マウス臼歯における *p21* の発現パターンを *in situ* hybridization 法により調べたところ、野生型と比較して顕著な *p21* 発現領域の拡大が認められた。このことから、*ectodin* は BMP シグナルを負に調節することでエナメル結節における *p21* の発現を制御し、将来の咬頭の確実な位置を決定していることが明らかとなった。

以上、本研究において、申請者は新規タンパク質 *ectodin* を同定し、*ectodin* が分泌性 BMP アンタゴニストであること、正常な歯の形成に必要な不可欠な役割を果たしていることを明らかにした。これらの成果は、複雑な歯形成機構の解明のみならず、再生医療分野における歯再生への応用に重要な知見をもたらすものと期待される。

論文審査の結果の要旨

これまでに多くの分泌性因子が同定され、形態形成や組織修復をはじめとする様々な生命現象において必要な役割を果たしていることが知られている。従って新規分泌性因子の探索・同定及びその機能解析は、複雑な生命現象を理解するうえで非常に意義のあることだと考えた。申請者は、新規分泌性タンパク質 *ectodin* を同定し、*ectodin* が BMP (骨形成タンパク質) アンタゴニストであること、正常な歯の形成に必須な役割を果たすことを明らかにした。

申請者は、DNA データベースを活用した新規分泌性因子の探索を行い、その結果ひとつの機能不明な新規タンパク質に着目した。*ectodin* と命名したこのタンパク質には典型的なシグナル配列の他に、シスチンノットモチーフと呼ばれる、システインの繰り返し配列からなるモチーフが存在していた。このモチーフは分泌性の BMP アンタゴニストによく保存されていることが知られており、*ectodin* にも同様の活性が期待された。まず *ectodin* が分泌性因子であることを確認するために、バキュロウイルス発現系を用いて *ectodin* を発現させた。その結果、培養上清に *ectodin* の存在が認められたことから、*ectodin* が分泌性因子であることが確認できた。この発現系を用いて *ectodin* 組み換えタンパク質を作製し、BMP に対する抑制作用について検討した。前駆骨芽細胞に BMP を添加すると、細胞内シグナル伝達因子である *Smad1/5/8* が特異的にリン酸化され、細胞内のアルカリフォスファターゼ活性が上昇する。ここへ *ectodin* を同時添加した場合、これらが抑制されることを確認した。この抑制作用は代表的な BMP である BMP2, BMP4, BMP7 いずれを用いた場合でも同様であった。実際 BIACORE システムにより *ectodin* がこれらの BMP と結合することが分かった。このことから *ectodin* は多くのサブタイプの BMP に対して抑制効果をもつ BMP アンタゴニストであることが明らかとなった。

次に *ectodin* の胎児期における発現部位を *in situ* hybridization 法を用いて検討した。その結果、発達段階の歯に強く発現していることが分かった。発達段階の歯はエナメル結節と呼ばれるシグナルセンターを形成するが、*ectodin* はエナメル結節には発現せず、その取り囲むような発現パターンを示した。これまでに発達段階の歯においてこのようなユニークな発現パターンを示す因子は報告されていない。このことから *ectodin* は歯形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

そこで *ectodin* の生理的役割を明らかにするために、申請者はジーンターゲティング法を用いて *ectodin* 欠損マウスを作製した。*ectodin* 欠損マウスはメンデルの法則に従って見かけ上正常に生まれ、その後の発育にも明らかな異常を認めな

った。そこで *ectodin* が発達段階の歯に特徴的な発現を示していたことから、成体において歯の様子を詳細に観察した。マウスは前歯に相当する門歯と奥歯に相当する臼歯を持ち、臼歯には咬頭とよばれる突起が規則正しく配置されている。*ectodin* 欠損マウスには本来形成されるべき門歯・臼歯に加えて、過剰な歯がそれぞれの近傍に形成されていた。また臼歯の表面には咬頭の増加による表面パターンの異常が観察された。従って *ectodin* は正常な歯の本数の決定や臼歯表面のパターン形成に必要な不可欠な因子であることが明らかとなった。次に *ectodin* 欠損マウスの歯に認められた2つの形成異常について、胎児期の歯形成過程に着目し、その分子メカニズムの解明を試みた。

将来歯の生える領域の決定は早く、胎生12日齢頃にはすでに「予定歯形成領域」として、それぞれ上顎・下顎の特定の位置に規定されている。そこでこの予定領域に特異的に発現することが知られている *Shh* (*Sonic hedgehog*) の発現領域を whole-mount *in situ* hybridization 法で調べたところ、野生型と比較して明らかな *Shh* 発現領域の拡大が認められた。このことから、*ectodin* は胎児期における予定歯形成領域の広さを負に調節することで、将来の歯の本数を決定していることが明らかとなった。予定歯領域の形成と同様に、臼歯表面のパターン形成もまた胎児期に規定されている。これまでの知見から、臼歯表面の咬頭は胎生16日齢頃のエナメル結節に由来し、これが動物種によって異なる咬頭パターンを示す最初の兆候となることが知られている。一方でエナメル結節の細胞自体は BMP シグナルを受けとることで、サイクリン依存性キナーゼインヒビターである *p21* を発現し、細胞増殖を停止している。そこで胎児期の *ectodin* 欠損マウス臼歯における *p21* の発現パターンを *in situ* hybridization 法により調べたところ、野生型と比較して顕著な *p21* 発現領域の拡大が認められた。このことから、*ectodin* は BMP シグナルを負に調節することでエナメル結節における *p21* の発現を制御し、将来の咬頭の確実な位置を決定していることが明らかとなった。

以上、本研究において、申請者は新規タンパク質 *ectodin* を同定し、*ectodin* が分泌性 BMP アンタゴニストであること、正常な歯の形成に必要な不可欠な役割を果たしていることを明らかにした。これらの成果は、複雑な歯形成機構の解明のみならず、再生医療分野における歯再生への応用に重要な知見をもたらすものと期待される。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成18年2月24日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。