

|           |                                             |
|-----------|---------------------------------------------|
| 氏 名       | 楠 直 樹                                       |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (薬 学)                                   |
| 学 位 記 番 号 | 薬 博 第 593 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    | 分泌性因子 Sclerostin および Fibin の骨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 辻 本 豪 三

### 論 文 内 容 の 要 旨

近年様々な骨系統疾患の患者数の増加が社会問題となっており、生活習慣の改善に加え、分子レベルでの予防・治療法研究が注目されている。分子レベルから骨疾患に対処するにあたっては、骨がどのように形成され、どのように維持されるかという分子機構を理解しなければならない。一般に、組織が形成されていく過程でおこる細胞増殖や分化は細胞外からのシグナルに依るところが大きい。そしてこの細胞外からのシグナルを主に担っているのが分泌性因子である。そこで申請者は、骨組織に作用する未だ機能不明な分泌性因子についてその機能を明らかにすることを目的として Sclerostin (SOST) および Fibin という二種の分子に着目しその機能を解析した。

#### 第一章 Sclerosteosis 原因遺伝子 Sclerostin の骨形成シグナル抑制作用機構に関する研究

Sclerostin は骨芽細胞の機能亢進に伴い骨形成が大きく亢進する常染色体性劣性遺伝疾患 Sclerosteosis (硬結性骨化症) の原因遺伝子として同定されたものである。Sclerosteosis においては Sclerostin の機能が欠失している。申請者はこの Sclerostin が骨形成において重要な役割を担っていると考え、その機能について検討した。

はじめに、Sclerostin は骨形成に関与すると考えられたことから、マウス胎児の骨組織における Sclerostin 遺伝子の発現を *in situ* hybridization (ISH) 法により解析した。その結果、Sclerostin 遺伝子は頭蓋骨や脛骨の骨膜・骨梁といった部位に発現していた。

Sclerostin は N 末端に分泌性シグナルに特有の疎水性の高い領域を有していることから Sclerostin の細胞外分泌性を検討した。バキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞に組換え Sclerostin を発現させたところ、培養上清中より Sclerostin を検出した。これより、Sclerostin の細胞外分泌性を確認した。さらに、Sclerostin はダイマー構造をとらずモノマーで分泌されることが明らかとなった。

Sclerostin はまた、Cysteine-knot モチーフとよばれる特徴的な構造を有している。この構造より Sclerostin は BMP (骨形成タンパク質) アンタゴニストとの相同性が認められる。そこで、Sclerostin が BMP アンタゴニストである可能性を検討した。培養骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞に BMP を添加すると分化が進行してアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が上昇する。Sclerostin は BMP6・BMP7 によるこの作用を濃度依存的に抑制したが、BMP2・BMP4 による作用は抑制しなかった。さらに、BIAcore システムを用いて Sclerostin と BMP リガンドとの結合性を検討した結果、Sclerostin は BMP6・BMP7 と結合性を示し、BMP2・BMP4 とは結合性を示さなかった。

これらより、Sclerostin は骨組織に発現し、細胞外に分泌され、BMP アンタゴニストとして骨形成シグナルを抑制する分子であることが明らかとなった。また、ダイマー構造をとらずモノマーで分泌される、リガンド選択性を有するといった他の多くの BMP アンタゴニストとは異なるユニークな特徴をもつ分子であることが示された。

#### 第二章 新規分泌性因子 Fibin の同定と骨組織における発現およびその機能に関する研究

申請者は DNA データベースよりシグナル配列を指標に新規分泌性因子の探索を行った。この過程で選択された分子の中

で、後に細胞外分泌性と骨組織での発現が明らかとなり、Fibin と命名した分子に着目し、その同定および機能解析を行った。

マウス胎児より Fibin を単離・同定したところ、Fibin は217アミノ酸からなり、N 末端に分泌性シグナルに特有の疎水性の高い領域を有していた。また、Fibin は既知の分子とは相同性の認められないユニークな分子であった。

まず、Fibin の細胞外分泌性を検討するため、COS7 細胞にマウス Fibin を発現させた。その結果、細胞抽出液中および培養上清中に Fibin を検出した。Fibin の細胞内局在性を検討したところ、Golgi に発現していたことから、Fibin は Golgi を介して細胞外に分泌される分子であることが明らかとなった。

次に、Fibin 遺伝子のマウス胎児期における発現を ISH 法により解析した。その結果、Fibin 遺伝子は主に頭蓋骨や脛骨の骨梁・肥大化層を除く軟骨層などの骨組織に強く発現していた。

Fibin が骨組織に発現していたことから、Fibin の骨形成における役割を検討した。COS7 細胞に Fibin を発現させ回収した conditioned medium を MC3T3-E1 細胞に添加したところ、ALP の上昇が抑制された。すなわち、Fibin は骨芽細胞の分化を抑制することが示された。

これらより、申請者が同定した Fibin は骨組織に発現して骨形成を抑制する分泌性因子であることが明らかとなった。

以上の通り、申請者は Sclerosteosis 原因遺伝子 Sclerostin が BMP アンタゴニストであること、また、新規分泌性因子 Fibin を同定し、Fibin が骨組織に発現して骨形成を抑制する分子であることを明らかにした。本研究は、骨形成機構の解明および骨粗鬆症をはじめとする骨系統疾患の治療薬開発に有用な知見を提供するものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

近年様々な骨系統疾患の患者数の増加が社会問題となっており、生活習慣の改善に加え、分子レベルでの予防・治療法研究が注目されている。分子レベルから骨疾患に対処するにあたっては、骨がどのように形成され、どのように維持されるかという分子機構を理解しなければならない。一般に、組織が形成されていく過程でおこる細胞増殖や分化は細胞外からのシグナルに依るところが大きい。そしてこの細胞外からのシグナルを主に担っているのが分泌性因子である。そこで申請者は、骨組織に作用する未だ機能不明な分泌性因子についてその機能を明らかにすることを目的として Sclerostin (SOST) および Fibin という二種の分子に着目しその機能を解析した。

Sclerostin は骨芽細胞の機能亢進に伴い骨形成が大きく亢進する常染色体性劣性遺伝疾患 Sclerosteosis (硬結性骨化症) の原因遺伝子として同定されたものである。Sclerosteosis においては Sclerostin の機能が欠失している。申請者はこの Sclerostin が骨形成において重要な役割を担っていると考え、その機能について検討した。

Sclerostin は骨形成に関与すると考えられたことから、マウス胎児の骨組織における Sclerostin 遺伝子の発現を *in situ* hybridization (ISH) 法により解析した。その結果、Sclerostin 遺伝子は頭蓋骨や脛骨の骨膜、骨梁といった部位に発現していた。

Sclerostin は N 末端に分泌性シグナルに特有の疎水性の高い領域を有していることから Sclerostin の細胞外分泌性を検討した。バキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞に組換え Sclerostin を発現させたところ、培養上清中より Sclerostin を検出した。これより、Sclerostin の細胞外分泌性を確認した。さらに、Sclerostin はダイマー構造をとらずモノマーで分泌されることが明らかとなった。

Sclerostin はまた、Cysteine-knot モチーフとよばれる特徴的な構造を有している。この構造より Sclerostin は BMP (骨形成タンパク質) アンタゴニストとの相同性が認められる。そこで、Sclerostin が BMP アンタゴニストである可能性を検討した。培養骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞に BMP を添加すると分化が進行してアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が上昇する。Sclerostin は BMP6, BMP7 によるこの作用を濃度依存的に抑制したが、BMP2, BMP4 による作用は抑制しなかった。さらに、BIAcore システムを用いて Sclerostin と BMP リガンドとの結合性を検討した結果、Sclerostin は BMP6, BMP7 と結合性を示し、BMP2, BMP4 とは結合性を示さなかった。

これらより、Sclerostin は骨組織に発現し、細胞外に分泌され、BMP アンタゴニストとして骨形成シグナルを抑制する分子であることが明らかとなった。また、ダイマー構造をとらずモノマーで分泌される、リガンド選択性を有するといった

他の多くの BMP アンタゴニストとは異なるユニークな特徴をもつ分子であることが示された。申請者は DNA データベースよりシグナル配列を指標に新規分泌性因子の探索を行った。この過程で選択された分子の中で、後に細胞外分泌性と骨組織での発現が明らかとなり、Fibin と命名した分子に着目し、その同定および機能解析を行った。

マウス胎児より Fibin を単離・同定したところ、Fibin は 217 アミノ酸からなり、N 末端に分泌性シグナルに特有の疎水性の高い領域を有していた。また、Fibin は既知の分子とは相同性の認められないユニークな分子であった。Fibin の細胞外分泌性を検討するため、COS7 細胞にマウス Fibin を発現させた。その結果、細胞抽出液中および培養上清中に Fibin を検出した。Fibin の細胞内局在性を検討したところ、Golgi に発現していたことから、Fibin は Golgi を介して細胞外に分泌される分子であることが明らかとなった。次に、Fibin 遺伝子のマウス胎児期における発現を ISH 法により解析した。その結果、Fibin 遺伝子は主に頭蓋骨や脛骨の骨梁、静止層、増殖層、前肥大化層といった肥大化層を除く軟骨層などの骨組織に強く発現していた。Fibin が骨組織に発現していたことから、Fibin の骨形成における役割を検討した。COS7 細胞に Fibin を発現させ回収した conditioned medium を MC3T3-E1 細胞に添加したところ、ALP の上昇が抑制された。すなわち、Fibin は骨芽細胞の分化を抑制することが示された。これらより、申請者が同定した Fibin は骨組織に発現して骨形成を抑制する分泌性因子であることが明らかとなった。

以上の通り、申請者は Sclerosteosis 原因遺伝子 Sclerostin が BMP アンタゴニストであること、また、新規分泌性因子 Fibin を同定し、Fibin 骨組織に発現して骨形成を抑制する分子であることを明らかにした。本研究は、骨形成機構の解明および骨粗鬆症をはじめとする骨系統疾患の治療薬開発に有用な知見を提供するものと期待される。

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 27 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。