



Neurogenesin-1 differentially inhibits the osteoblastic differentiation by bone morphogenetic proteins in C2C12 cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: チャンドラ, アビシェック メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/377

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 509号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏 名	Chandra Abhishek		
論文題目	<p>Neurogenesis-1 differentially inhibits the osteoblastic differentiation by bone morphogenetic proteins in C2C12 cells (ニューロジェネシン-1は C2C12 細胞において異なる骨形成因子による骨分化作用を分別的に阻害する)</p>		

博士(医学) Chandra, Abhishek

論文題目

Neurogenesis-1 differentially inhibits the osteoblastic differentiation by bone morphogenetic proteins in C2C12 cells

(ニューロジェネシン-1はC2C12細胞において異なる骨形成因子による骨分化作用を分別的に阻害する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

骨形成因子(bone morphogenetic protein, BMP)ファミリーはTGF β スーパーファミリーのなかでも最も大きいファミリーであり、特異的な受容体に結合し、細胞内シグナル伝達系を介していろいろな作用をおよぼす重要な分子群である。BMP-2、BMP-4、BMP-7を含む種々のBMPは多分化能をもつ間質細胞から骨芽細胞への分化を誘導する。BMP-2はC2C12筋芽細胞を骨芽細胞に分化させることはよく知られていることである。

2003年に本学解剖学講座で新しく単離されたニューロジェネシン-1(Neurogenesis-1, Ng1)はBMPアンタゴニストの構造をもっており、神経細胞への分化を促進することが報告されている(J Neurosci, 2003)。私は、BMPアンタゴニストは神経系だけでなく、他の組織においても細胞分化に重要な役割を果たしていることを仮定して、マウス胎児の切片にて、Ng1の発現を観察したところ、骨格系の細胞でNg1が発現していることを見出した。幸いにもC2C12筋芽細胞にBMP-2やBMP-7を作用させると骨芽細胞に分化するというシャーレ内細胞分化誘導系が利用できるため、この実験系でNg1の作用を検討することにした。

[材料ならびに方法]

C2C12細胞は10%牛胎児血清(FCS)を含むDMEM培養液にて培養した。HAタグを付加したラットNg1 cDNAをCX-N1発現ベクターに組み込んだ。その際、第1メチオニンと第2メチオニンから始まる2種類のコンストラクトを作成した(それぞれ、CX-M1-NG1-HA、CX-M2-NG1-HAと名付けた)。この両者をC2C12細胞にリン酸カルシウム沈殿法にて遺伝子導入し、永久株を樹立した。タンパクの発現は抗HA抗体を用いて検出した。組換えNg1タンパクとしては、この永久株を2日間培養した培養液を用いた。

骨芽細胞への分化は以下のようにして測定した。まず、12ウエルプレートに2 X 10⁴/cm²のC2C12細胞をまき、翌日、5% FCSと300 ngのBMP-2あるいはBMP-7を含むDMEMに交換した。この際、2つの濃度のNg1を同時に加えた。培養3日後と6日後に細胞抽出液を調製した。細胞抽出液のアルカリフォスファターゼ活性はp-nitro-phenyl phosphateを基質として測定した。

Ng1タンパクとBMPタンパクとの結合実験は以下のように行った。Ng1含有細胞培養液とBMP-2 (2 ng)、BMP-4 (2 ng)、BMP-7 (10 ng)を反応させ、次に抗HA抗体と反応させ、最後にprotein G-Sepharoseを加えた。洗浄後、SDS電気泳動サンプル液を添加して、protein G-Sepharoseに結合したタンパクを遊離させ、SDS電気泳動後、膜に移し、抗BMP-7抗体、抗BMP-2, 4抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

[結果]

2種の永久株細胞の細胞抽出液と細胞培養液を、抗HA抗体を用いてウエスタンブロット解析したところ

ろ、いずれの細胞抽出液にも1本のバンドを検出した。しかし、CX-M2-NG1-HAを導入した細胞培養液には、1本のバンドを検出できたが、CX-M1-NG1-HAを導入した細胞培養液では、バンドは検出できなかった。そこで、前者の細胞培養液を組換えNg1タンパクとして以後の実験に用いた。また、細胞培養液に検出されるバンドは細胞抽出液で検出されるバンドより易動度が遅かった。

C2C12細胞にBMP-2あるいはBMP-7を添加する際に、2つの濃度のNg1含有細胞培養液を同時添加した3日後と6日後にアルカリフォスファターゼ活性を測定したところ、Ng1はBMP-7による活性の上昇を濃度依存的に阻害した。一方、Ng1はBMP-2による活性の上昇には影響を与えなかった。

そこで、Ng1とBMP-7あるいはBMP-2の直接結合を検討した。その結果、Ng1はBMP-7には結合するが、BMP-2には結合しないことが判明した。

[考察]

1. Ng1タンパクは2つのコンストラクトのいずれでも合成されているが、第2メチオニンから始まるタンパクだけが細胞培養液へ分泌された。第1メチオニンから始まるタンパクはリーダー配列が長すぎて小胞体膜を貫通できないと考えられる。
2. 分泌されたNg1タンパクは翻訳後修飾を受けていることが推定される。
3. Ng1はBMP-7に結合することでBMP-7によるC2C12細胞の骨分化を阻害するが、BMP-2には結合できないので、BMP-2によるC2C12細胞の骨分化には影響を与えなかった。
4. Ng1は各BMPへの結合特異性の違いを介して、胎児発生期の各BMPによる各種細胞への作用を制御していると推定される。

[結論]

1. 組換えNg1タンパクを培養液に産生できるのは、第2メチオニンから始まるコンストラクトである。
2. 培養液中に検出されるNg1タンパクは細胞内に検出されるものよりSDS電気泳動上大きい分子量をもっていた。
3. Ng1はBMP-7によるC2C12細胞の骨芽細胞への分化を抑制したが、BMP-2による骨芽細胞への分化は抑制しなかった。
4. Ng1はBMP-7に結合するが、BMP-2には結合しなかった。

論文審査の結果の要旨

骨形成因子(bone morphogenetic protein, BMP)ファミリーはTGF β スーパーファミリーに属する分泌性タンパクで、特異的な受容体を介する細胞内シグナル伝達系により、骨・軟骨形成だけでなく眼、肺、腎などさまざまな組織の形成や機能維持に関わる。一方、2003年に本学解剖学講座で新しく単離されたニューロジェネシン-1 (Neurogenesis-1, Ng1) はBMPアンタゴニストの構造を有し、神経細胞への分化を促進することが報告されている(J Neurosci, 2003)。申請者は、Ng1が神経系以外の組織においても細胞分化に関わることを想定して、マウス胎児の切片にてその発現を検討した。その結果、骨格系の細胞でNg1が発現していることを見出した。これをもとに、Ng1の骨形成における役割を検討した。

Ng1発現永久株を作成した。HAタグを付加したラットNg1 cDNAをCX-N1発現ベクターに組み込んだ。その際、第1メチオニンと第2メチオニンから始まる2種類のコンストラクト(CX-M1-NG1-HA、CX-M2-

NG1-HA)を作成した。この両者をC2C12細胞にリン酸カルシウム沈殿法にて遺伝子導入し、永久株を樹立した。2種の永久株細胞の細胞抽出液と細胞培養液を解析したところ、いずれの細胞抽出液にも、CX-N1タンパクを検出したが、細胞培養液中には、第2メチオニンから始まるNG1-HAタンパクのみを検出した。これより組換えNg1タンパクを培養液に産生できるのは、第2メチオニンから始まるコンストラクトのみであるとした。また培養液中に検出されるNg1タンパクは細胞内のタンパクよりSDS電気泳動上大きい分子量を有することより、分泌されたNg1タンパクは翻訳後修飾を受けていることが推定された。この永久株の2日間の培養液を組換えNg1タンパクとして用いた。

C2C12細胞がBMP-2あるいはBMP-7刺激により骨芽細胞へ分化するというシャーレ内細胞分化誘導系を用いて、Ng1の影響を検討した。骨芽細胞への分化は細胞抽出液のアルカリフォスファターゼ活性を指標に評価した。BMP-2あるいはBMP-7に、2つの濃度のNg1を同時に加え、培養3日後と6日後に評価した。Ng1はBMP-7によるC2C12細胞の骨芽細胞への分化を濃度依存的に阻害したが、BMP-2による分化には影響しなかった。

Ng1タンパクとBMPタンパクとの結合を解析した。Ng1含有細胞培養液とBMP-2 (2 ng)、BMP-4 (2 ng) §BMP-7 (10 ng) を各々反応させ、抗HA抗体とprotein G-Sepharoseにより免疫沈降させた後、抗BMP-7抗体、抗BMP-2,4抗体を用いてウエスタンブロットにより解析した。その結果、Ng1はBMP-7には結合するが、BMP-2には結合しないことが判明した。これよりNg1はBMP-7に結合することでBMP-7によるC2C12細胞の骨分化を阻害するが、BMP-2によるC2C12細胞の骨分化には影響を与えないと考えられた。Ng1は各BMPへの結合特異性の違いを介して、胎児発生期の各BMPによる各種細胞への作用を制御していると推定された。

審査委員会は、申請者がNg1が骨形成に関与する事実を明らかにするとともに、Ng1がBMP-7に結合することによりBMP-7依存性の骨芽細胞の分化を阻害する機構を初めて明らかにした事を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 骨におけるNg1発現の時間的経緯は検討したか
- 2) BMP発現の局在との関連は検討したか
- 3) *in situ* hybridizationに³⁵S[UTP]を使用した理由は何か
- 4) 生理的に存在するNg1はいずれのメチオニンから始まっているか
- 5) C2C12の動物種は何か
- 6) アルカリフォスファターゼ活性を骨分化の指標としてよいか
- 7) BMP7刺激によるC2C12細胞の形態変化に対するNg1の影響を検討したか
- 8) 結合実験で非特異的タンパクが同定された理由は何か
- 9) Ng1の翻訳後修飾は糖鎖付加として良いか
- 10) Ng1の糖鎖付加の生理的意味合いは何か
- 11) Ng1と他のBMP antagonistとの間に相同性はあるか
- 12) 実験値の統計学的有意差はどのように検定したか
- 13) 動物実験における3Rの原則とは何か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	浦野哲盟	
	副査	蓑島伸生	副査 上田啓次