

論 文 要 旨

氏 名	浦田真梨子
タイトル (日英併記)	A peptide that blocks the interaction of NF- κ B p65 subunit with Smad4 enhances BMP2-induced osteogenesis (NF- κ B p65 と Smad4 の結合を阻害するペプチドは BMP2 が誘導する骨芽細胞分化を促進する)

論文の要旨 (日本語で記載)

生体内の骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスによって骨量が維持されている。しかし、骨粗しょう症や関節炎などの代謝性骨疾患では、このバランスが崩れ相対的に骨吸収が骨形成を上回り骨量が減少する。現在、これらの疾患に対する治療薬は骨吸収抑制に基づくものが多い。近年ビスフォスホネート製剤などで過度に骨吸収を抑制すると顎骨壊死や不定形骨折などの有害事象が報告され、そのリスクを下げる為にも、骨形成促進作用を有する薬剤の開発が求められている。

Bone Morphogenetic Protein (BMP)は強力な骨誘導能を持つサイトカインで、米国食品医薬品局により 2002 年に整形外科領域、2007 年に歯科領域での適応が認可された。しかし、これまでの臨床報告では、期待どおりの骨形成効果が得られていない。その原因の一つとして、我々は炎症反応などにより活性化される転写因子 nuclear factor κ B (NF- κ B) の p65 の TA2 ドメインが BMP シグナルの伝達分子である Smad4 の MH1 ドメインに会合し BMP シグナルを抑制すること、さらに NF- κ B を阻害することで BMP による骨形成を促進することを報告した。一方、NF- κ B は様々な生命現象に不可欠な分子で、その阻害は新たな有害事象を引き起こす可能性がある。そこで今回我々は NF- κ B の機能を失うことなく p65 と Smad4 の結合を解除し、骨形成を促進する薬剤の開発を試みた。

p65 TA2 ドメインと Smad4 MH1 ドメインの結合領域をアミノ酸レベルで同定するため、GST 融合 TA2 欠失変異体を作製し、Smad4 MH1 との結合を GST pull down assay で検討したところ、TA2 の 428 番目のアミノ酸から 443 番目のアミノ酸の領域が Smad4 MH1 と結合した。この領域のアミノ酸配列をもとに Smad4-binding domain (SBD) ペプチドを合成し、GST pull down assay や免疫沈降法によって、SBD ペプチドが TA2 と MH1 の結合を阻害し、p65 と Smad4 の会合を阻害することを確認した。次にマウス前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて BMP シグナルや BMP2 が誘導する骨芽細胞分化に対する SBD ペプチドの効果を検討した。SBD ペプチドは BMP2 刺激による Smad1/5 のリン酸化に影響しなかったが、BMP の標的遺伝子である Id1 の mRNA 量を増加させ、さらに骨芽細胞分化マーカーの ALP 活性やオステオカルシンの発現量も増加させた。また SBD ペプチドは BMP による Primary osteoblast の石灰化を亢進した。一方、SBD ペプチドは TNF α が誘導する I κ B α の分解や p65 のリン酸化、さらには NF- κ B の標的遺伝子 IL-6 発現の量に影響を与えなかった。BMP2 単独または BMP2 と SBD ペプチドを含有したコラーゲンペレットをマウス筋膜下に移植すると、BMP2 と SBD 含有群で皮質骨の密度の高い異所性骨が形成された。

以上から、SBD ペプチドは NF- κ B シグナルに影響を与えることなく BMP シグナルを亢進し骨芽細胞分化と骨形成を促進すると考えられる。