

氏 名	Hany Mohamed Hanafy Khattab
学 位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5041号
学位授与の日付	平成26年9月30日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	The mechanism and effect of BMP-2 mutant L51P in promoting bone formation and osteoblast differentiation induced by BMP-2 (BMP-2による骨芽細胞分化および骨形成の促進における BMP-2 ミュータント L51P の効果とそのメカニズム)
学位論文審査委員	久保田 聡 教授 長塚 仁 教授 窪木 拓男 教授

学位論文内容の要旨

【Introduction】

Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) is a potent osteoinductive cytokine that plays crucial roles in bone development and repair. However, it is well known that large amounts of BMP-2 are required to induce sufficient bone formation in large mammals and humans possibly due to a feedback response of BMP antagonists following exogenous BMP-2 administration. Recently, Prof. Sebold et al. (Nature Structural & Molecular Biology, 2004) developed the L51P, which is an *in vitro* engineered BMP-2 variant with a leucine to proline substitution at codon 51. This modified protein is deficient in BMP receptor type I activation but maintains affinity for BMP antagonists, which can allow for the inactivation and/or depletion of BMP antagonists through the formation of L51P/BMP-antagonist complexes, and eventually enhance BMP-2 action in inducing osteogenesis. Although previous reports have shown that L51P can bind to noggin and interfere with its binding to BMP, the natural biological functions of L51P are not fully understood.

【Materials, Methods and Results】

First, to confirm the effect of L51P on BMP-2-induced osteogenic differentiation, C2C12 cells stably expressing the BMP-responsive mouse Id promoter were cultured with BMP-2 (100 ng/mL) and/or L51P (100 ng/mL). MC3T3E1 cells were stimulated with BMP-2 and/or L51P, and osteogenic differentiation of MC3T3E1 cells was assessed by Alizarin red staining and quantitative real time RT-PCR. In addition, the levels of phosphorylated Smad (p-Smad) 1/5/8 was evaluated by western blot. As hypothesized, simultaneous addition of L51P enhanced the BMP-2-induced osteogenic differentiation.

Next, to test the ability of L51P to competitively inactivate and/or deplete BMP antagonists, the cell binding affinity of BMP-2 ligands was investigated in the presence or absence of L51P.

Because the BMP antagonists were highly expressed 3 days after exogenous BMP-2 stimulation, we collected supernatants from 3-day stimulated cell cultures and used as condition culture media (CM). The results showed a significant decrease in the cell binding affinity of BMP-2 ligands when MC3T3-E1 cells were incubated with exogenous BMP-2 and conditioned medium, whereas simultaneous L51P addition competitively rescued the suppression of BMP-2-to-cell binding induced by conditioned medium incubation. In a delayed experimental model, L51P was applied 3 days after exogenous BMP-2 stimulation and we could observe a striking enhancement of the BMP-2-induced phosphorylated Smad-1/5/8 and luciferase activity of the Id1 promoter compared to the simultaneous addition of the two factors. Furthermore, the delayed L51P addition significantly rescued the binding affinity of the latent BMP-2 ligands in culture media possibly rich in BMP antagonists. Finally, we investigated the capability of L51P to induce *in vivo* bone regeneration and repair of critical-sized defects in the rat calvaria using protein-loaded biodegradable hydrogel as a carrier. Four weeks after surgery, substantial bone formation was observed in the BMP-2 (5 µg)/L51P (5 µg) combination groups, compared with BMP-2 (5 µg) alone group, while no bone formation in the L51P (5 µg) and control defect groups.

【Discussion and Conclusion】

I demonstrated that L51P influences the osteoinduction efficiency of BMP-2. This was demonstrated by the markedly increased *in vitro* osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells as well as by the enhanced regeneration of the critical-sized calvarial defects *in vivo*.

I also showed that delayed L51P stimulation produced a significant increase in the BMP-2-induced osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells and the luciferase activity of C2C12 cells. Moreover, we demonstrated for the first time that simultaneous and delayed L51P stimulation play an important role in the affinity of BMP-2 cell binding.

These findings provide a deeper insight into the cellular and molecular mechanisms involved in the effect of L51P in suppressing the BMP antagonists and enhancing BMP activity.

学位論文審査結果の要旨

TGF- β スーパーファミリーの一つであるBone morphogenetic protein(BMP)-2は、強力な骨誘導作用を有することから、次世代の骨造成法として期待され、様々な骨折・骨欠損モデルに対する治療法が試みられている。しかし、ヒトで効果が得られる量はmgオーダーであり、高濃度のタンパク質投与による浮腫などの副作用が報告されている。ヒトで大量のBMP-2が必要不可欠な理由の一つとして、ネガティブ・フィードバック機構の存在が考えられる。

本研究では、ネガティブ・フィードバック機構を制御することを目的に、BMP-2の51番目のアミノ酸であるロイシンをプロリンに変更し作製された、BMPアンタゴニストの機能を抑制する事のできるBMP変異体：L51Pを用い、L51PがBMPネガティブ・フィードバック機構を抑制することで、*in vitro*, *in vivo*においてBMP-2の骨芽細胞分化および骨形成能を正に制御することが可能か検討を行なっている。

まず、骨芽細胞様細胞株であるMC3T3-E1細胞をBMP-2およびL51Pにて刺激し、その効果を検討している。その結果、L51Pのみの刺激では骨芽細胞分化は促進されなかった。BMP-2/L51P同時刺激群において、BMP-2によって誘導されたSMADシグナルのリン酸化および骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現量は促進されたが、その促進量は低かった。しかし、事前にBMP-2にて3日間刺激した細胞をL51Pにて刺激した細胞群において、SMADシグナルのリン酸化、骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現量は著しく促進された。実際、BMP-2刺激1～3日後には、BMPアンタゴニストの一つであるNogginやChordinの遺伝子発現が上昇していたことから、L51PがBMPアンタゴニストの機能を阻害した可能性が示唆される。

次に、BMPネガティブ・フィードバック機構を模して、BMP-2にて細胞を3日間刺激することで誘導されたBMPアンタゴニストを多く含む培養上清を回収し、別の細胞に適用している。実際、培養上清を加える事で、BMP-2の細胞への結合能は有意に抑制された。しかし、L51Pを加える事で抑制されたBMP-2の細胞への結合能は有意に中和された。以上より、*in vitro*において、L51PはBMPアンタゴニストの機能を阻害することで、BMP-2の機能を促進する可能性が示唆される。

最後に、*in vivo*におけるL51Pの効果を検討するため、ラット背部皮下を用いた異所性骨形成モデルおよびラット頭蓋骨骨欠損モデルにて検討を行なっている。両モデルにおいて、L51PはBMP-2によって誘導される骨形成を有意に促進していた。

以上の結果は、L51PはBMPネガティブ・フィードバックを制御することで、BMP-2の骨芽細胞分化促進作用および骨形成能を促進することを明らかにしており、本研究は未だ不透明なBMPネガティブ・フィードバック機構の解明ならびに骨の再生技術への応用にもつながるものとして評価できる。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。