

A study on effects of Sprouty2, an inhibiting factor of FGF signaling, on the control mechanism of osteoblast proliferation and differentiation

鬼村, 朋宏
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/26335>

出版情報：九州大学，2012，博士（歯学），課程博士
バージョン：
権利関係：



**FGF シグナル抑制因子 Sprouty2 による
骨芽細胞増殖・分化制御機構に関する研究**

A study on effects of Sprouty2, an inhibiting factor of FGF
signaling, on the control mechanism of osteoblast proliferation
and differentiation

2013 年

九州大学大学院歯学府歯学専攻
口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野

鬼村 朋宏

指導教員

九州大学大学院歯学研究院
口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野

中村 誠司 教授

本研究の一部は以下の学術雑誌に投稿中である。

**Sprouty2 controls osteoblast proliferation and differentiation via
MAPK and Smad pathways.**

Tomohiro Onimura, Takaharu Taketomi, Daigo Yoshiga, Daichi Muratsu, Terukazu
Sanui, Takao Fukuda, Akihiko Yoshimura, and Seiji Nakamura

Submitted to PLOS ONE

略語一覧

α -MEM: α -minimum essential medium

ANOVA: analysis of variance

ALP: alkaline phosphatase (アルカリホスファターゼ)

BMP: bone morphogenetic protein (骨形成タンパク質)

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid (相補的 DNA)

DEPC: diethyl pyrocarbonate

EGF: epidermal growth factor (上皮成長因子)

ERK: extracellular regulated kinase

FBS: fetal bovine serum (ウシ胎児血清)

bFGF: basic fibroblast growth factor (線維芽細胞増殖因子)

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HRP: horseradish peroxidase

KO: knock out (遺伝子欠損型)

MAPK: mitogen activated protein kinase

mRNA: messenger ribonucleic acid

OCN: osteocalcin (オステオカルシン)

Osx: osterix

PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)

PBST: phosphate-buffered saline with TritonX-100

PCR: polymerase chain reaction

PI: propidium iodide (ヨウ化プロピジウム)

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

Runx2: runt-related gene 2

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate–polyachrylamide gelelectrophoresis

siRNA: small interfering ribonucleic acid

Spred: Sprouty-related EVH-1 domain containing protein

TGF: transforming growth factor (形質転換増殖因子)

WT: wild type (野生型)

目 次

要旨	6
緒言	9
材料と方法	12
結果	22
研究 1. 骨芽細胞株における <i>Sprouty</i> / <i>Spred</i> ファミリーの発現	
1-1. 骨芽細胞における <i>Sprouty</i> / <i>Spred</i> ファミリーの mRNA の発現	22
1-2. 骨芽細胞におけるタンパク質レベルでの <i>Sprouty</i> 2、4 の発現	25
研究 2. <i>Sprouty</i> 2 強制発現による骨芽細胞株への影響	
2-1. <i>Sprouty</i> 2 が骨芽細胞の増殖に及ぼす影響	28
2-2. FGF シグナル伝達経路における <i>Sprouty</i> 2 の作用	30
2-3. BMP シグナル伝達経路における <i>Sprouty</i> 2 の作用	32
2-4. 骨芽細胞分化マーカーの発現における <i>Sprouty</i> 2 の作用	34
2-5. <i>Sprouty</i> 2 が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響	37
研究 3. <i>Sprouty</i> 2 ノックダウンによる骨芽細胞株への影響	
3-1. FGF シグナル伝達経路における <i>Sprouty</i> 2 ノックダウンの作用	40
考察	42
参考文献	48
謝辞	53

要 旨

線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) や 骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein: BMP) などの増殖因子は、骨芽細胞の増殖・分化の制御に重要であることが知られている。FGF はチロシンキナーゼ型受容体に結合し、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介して細胞の増殖・分化を促進するが、その抑制因子として Sprouty/Spred ファミリーという分子群が同定されている。一方、BMP シグナル経路において、その下流分子 Smad は MAPK 経路と密接に関連していることが報告されているが、その制御機構に関しては不明な点が多い。

本研究では、骨芽細胞における FGF-MAPK 経路と BMP-Smad 経路を介した Sprouty/Spred ファミリーによる増殖・分化制御機構について解析を行った。以下に本研究で得られた結果をまとめた。

1. ヒト骨芽細胞株 (SaOS-2) およびマウス骨芽細胞株 (MC3T3-E1) における Sprouty/Spred ファミリーの発現に関する検討

SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞を用いて、Sprouty/Spred ファミリーの messenger RNA (mRNA) およびタンパク質レベルの発現を RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法にて解析

した。その結果、bFGF 刺激により *Sprouty2/4* および *Spred1/2* の mRNA の発現誘導の促進を認めた。また bFGF 刺激時、タンパク質レベルでの *Sprouty2/4* の強い発現を認めた。さらに、MC3T3-E1 細胞における *Sprouty2/4* の局在を蛍光免疫細胞染色法にて解析したところ、共に細胞質に強い発現を認めた。

2. 骨芽細胞の増殖・分化における *Sprouty2* の作用に関する検討

SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞にリポフェクション法にて *Sprouty2* を強制発現させ、bFGF 刺激における細胞の増殖能を WST-8 assay を用いて解析した。その結果、bFGF 刺激により細胞増殖が亢進したが、*Sprouty2* を強制発現した細胞群では増殖が抑制された。また、細胞増殖・分化に関わる MAPK とアポトーシス抑制に関与する Akt のリン酸化に対する *Sprouty2* の作用をウエスタンブロット法にて検討したところ、両細胞株で bFGF 刺激における MAPK および Akt のリン酸化が *Sprouty2* の強制発現により抑制された。また同様に BMP-2 刺激下のシグナル伝達分子 Smad1/5/8 に及ぼす *Sprouty2* の影響を調べたところ、*Sprouty2* 強制発現により、Smad1/5/8 のリン酸化が抑制された。さらに、リポフェクション法を用いて、MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* siRNA を導入し、bFGF 刺激における MAPK および Akt のリン酸化をウエスタンブロット法にて解析した。その結果、MAPK および Akt のリン酸化が *Sprouty2* ノックダウンにより促進された。

3. 骨芽細胞分化マーカーの発現における *Sprouty2* の影響に関する検討

bFGF 刺激および BMP-2 刺激によって発現誘導される骨芽細胞分化マーカー *Runx2*、*ALP*、*osterix*、*osteocalcin* の発現をリアルタイム PCR 法にて解析したところ、bFGF および BMP-2 刺激により *Runx2*、*ALP*、*osterix*、*osteocalcin* の発現誘導が促進したが、*Sprouty2* 強制発現によりこれら分化マーカーの発現が抑制された。さらに、両細胞株における石灰化を von Kossa 染色、Alizarin red 染色を用いて検討したところ、BMP-2 刺激により骨芽細胞の石灰化の亢進を認めたが、*Sprouty2* 強制発現群では石灰化亢進は認められなかった。

以上の結果より、*Sprouty2* が FGF シグナル伝達経路ならびに BMP シグナル伝達経路のネガティブフィードバック因子として作用し、骨芽細胞の増殖・分化を抑制的に制御していることが示唆された。

緒 言

骨を構成する細胞には、軟骨細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞があげられる。骨組織はその成長が終わった後も、常に古い組織が吸収され、新しい骨が形成されてダイナミックに代謝されており、この過程は骨リモデリング (骨再構築) と呼ばれている (1)。この骨形成を担うのが間葉系幹細胞から分化する骨芽細胞である。骨芽細胞の増殖・分化・機能の制御には、骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein: BMP)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) などの増殖因子が重要な役割をしていることが知られている。

BMP は TGF- β スーパーファミリーに属する液性因子であり、現在までに 20 種以上同定されている (2)。BMP ファミリーのひとつである BMP-2 は骨芽細胞の分化を促進することが知られている (2-6)。BMP が受容体に結合すると、そのシグナルは Smads を介して伝達されるが、BMP-2 のシグナル伝達では特異的 Smad である Smad1、Smad5、Smad8 (Smad1/5/8) が重要な役割を担っている (7)。

一方、FGF はヒトで 23 種類の分子からなる FGF ファミリーを形成しており、線維芽細胞の増殖因子としてだけでなく、骨芽細胞を含むさまざまな細胞に対する細胞増殖や分化活性を有している。FGF はレセプター型チロシンキナーゼファミリーに属する細胞膜上の FGF 受容体 (FGFR) と結合することで、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を活性化し、細胞の増

殖・分化を促進する (8, 9)。この MAPK 経路の抑制因子として Sprouty/Spred ファミリーという分子群が同定されている (図 1)。

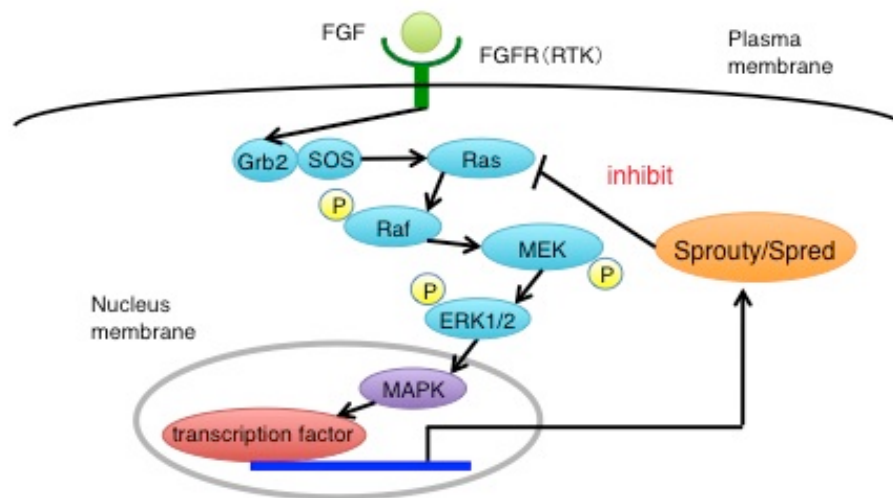


図 1: MAPK 経路と Sprouty/Spred ファミリー

FGF などの増殖因子が受容体に結合すると、そのシグナルがアダプター分子である Grb2 から SOS へと伝達され、Ras が GTP 型になることで活性化型 Ras になる。活性化型 Ras は Raf を誘導し、その後、Raf のリン酸化から次々と下流の分子のリン酸化が引き起こされ、最終的に核内へシグナルが伝達され、細胞増殖または分化をコードする遺伝子が転写される。Sprouty2 は、このシグナル経路に対し、負のフィードバック機構によって増殖因子からのシグナルを調節している。

Sprouty はショウジョウバエの遺伝学的解析により FGF シグナルを負に調節する分子として同定され、現在 4 種類のコモログが同定されている。このうち、少なくとも Sprouty2 および Sprouty4 は MAPK 経路により転写誘導されるネガティブフィードバック制御因子である (10, 11)。Spred (Sprouty-related EVH-1 domain containing protein) は Sprouty に似た分子として発見され、Ras-ERK 経路の抑制因子であり、3 種類のコモログが存在する (12-15)。Sprouty/Spred ファミ

リーの遺伝子欠損 (knock out: KO) マウスの表現型についてはこれまでにさまざまな報告がある。*Sprouty2* KO マウスは野生型 (wild type: WT) マウスに比べて、体が小さく体重も軽いという報告があり (16)、臼歯部前方に過剰歯を生じるもの (17) や、口蓋裂を生じるという報告もされている (18)。また、*Spred1*、*Spred2* KO マウスでも顔面の変形、低成長を示すことが知られている (19, 20)。さらに、*Sprouty4* KO マウスは歯数の異常や四肢の指の形態異常、下顎骨の欠損が認められており、*Sprouty2/Sprouty4* のダブル KO マウスは胎生致死であり、頭部、歯牙、四肢に著しい形態異常を呈する (17, 21, 22)。これらのことから、*Sprouty/Spred* ファミリーは機能的に骨の形態形成の制御に重要な役割を果たしていると思われる。しかしながら、骨形成と *Sprouty/Spred* ファミリーとの関連についての詳細は明らかにされていない。

さらに、*Sprouty/Spred* ファミリーが抑制的に働く MAPK 経路と BMP シグナルの下流に存在する分子 Smad は密接な関係があるとされている (23-28)。

本研究では、骨形成に深く関与する骨芽細胞の増殖・分化における *Sprouty/Spred* の役割について検討を行った。

材料と方法

1. 試薬および抗体

リコンビナント試薬として SaOS-2 に human epidermal growth factor (EGF) および human basic fibroblast growth factor (bFGF) (Peprotech 社製 *NJ, USA*) を使用した。また、MC3T3-E1 には murine EGF および murine bFGF (Peprotech 社製 *NJ, USA*) を用いた。両骨芽細胞株に共通して human BMP-2 (GenScript 社製 *NJ, USA*) を使用した。

1 次抗体として、抗 Sprouty2 ポリクローナル抗体 (Proteintech 社製 *Chicago, IL, USA*)、抗 Sprouty4 ポリクローナル抗体 (Abnova 社製 *Taipei, Taiwan*)、抗リン酸化 extracellular regulated kinase (ERK) 1/2 (p-MAPK) モノクローナル抗体、抗リン酸化 Akt (p-Akt) ポリクローナル抗体、抗 Akt ポリクローナル抗体、抗リン酸化 Smad1/5/8 (p-Smad1/5/8) (Cell Signaling Technology 社製 *Beverly, MA*)、抗 ERK2 ポリクローナル抗体、抗 c-Myc 抗体 (Santacruz Biotechnology 社製 *CA, USA*) を用いた。

2. 骨芽細胞の培養

ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞株 SaOS-2 とマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 は、37°C、CO₂ 濃度 5% のインキュベーター中に、10% fetal bovine serum (FBS)、100 U/ml ペニシリンG (明治製菓)、100 µg/ml ストレプ

トマイシン (明治製菓) 存在下の α -minimum essential medium (Sigma-Aldrich 社製 UK) にてそれぞれ培養した。

3. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Sprouty/Spred ファミリーの mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて半定量的に検出した。SaOS-2 および MC3T3-E1 細胞を 6 穴プレートに 1.0×10^6 個/well で播種し、24 時間培養した。EGF (50 ng/ml)、bFGF (50 ng/ml) で 4 時間刺激した後、Trizol (Invitrogen life technologies 社製 California, USA) を用いて RNA を抽出した。RT-PCR は、GeneAmp RNA PCR キット (Applied Biosystems 社製 New Jersey, USA) を使用した。RT-PCR の条件は、42°C : 15 分 (transcription ステップ)、99°C : 5 分 (denature ステップ)、5°C : 5 分 (cooling ステップ) を 1 サイクル行った。*Sprouty/Spred* ファミリーの発現は精製された相補鎖 DNA (cDNA) を鋳型とし、PCR 法を用いて調べた。各種プライマーは表 1 に示す。PCR には KOD Plus (TOYOBO 社製 Tokyo, Japan) を用い、94°C : 2 分 (hot start 法による denature ステップ) を 1 サイクル行い、94°C : 30 秒 (denature ステップ)、58°C : 30 秒 (annealing ステップ)、68°C : 1 分 (extension ステップ) を 15 サイクル、94°C : 30 秒 (denature ステップ)、60°C : 30 秒 (annealing ステップ)、68°C : 1 分 (extension ステップ) を 15 サイクル行った。

表 1 : RT-PCR 法に用いたプライマーと反応条件

mRNA	PCR 産物の サイズ (bp)		プライマーの塩基配列 (5'→3')	アニーリング 温度 °C
<i>human sprouty2</i>	202	forward	TTTCCCATTTCGCTCATCTGC	58
		reverse	AGACCAACTTCCGAGCAATCG	
<i>human sprouty4</i>	373	forward	CAGCTCCTCAAAGACCCCTAGAAGC	58
		reverse	GTGCTGCTACTGCTGCTTACAGAGC	
<i>human sprouty1</i>	499	forward	TGTGGTATTAAAGACGCAGCCTTCCTCA	58
		reverse	CATATTGCTTGCCAAAAGCTTCCACAAA	
<i>human sprouty2</i>	411	forward	CTCCCTTTCCCCACTCCTTCTTATTGC	58
		reverse	GGAGACCCTAGAGAAAGACCCCAAGGAA	
<i>human GAPDH</i>	452	forward	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	58
		reverse	ACCACAGTCCATGCCATCAC	
<i>mouse sprouty2</i>	654	forward	TTTAAATCCACCGATTGCTTGG	58
		reverse	GCTGCACTCGGATTATTCCATC	
<i>mouse sprouty4</i>	519	forward	GGCCTGTGGAAAGTGTAAGT	58
		reverse	CCGGTTTCTTCCCAATCTAGG	
<i>mouse sprouty1</i>	526	forward	TTCACCACTGGAAGATCGATG	58
		reverse	TGTCTGTAGTCTGCATATCGACG	
<i>mouse sprouty2</i>	489	forward	ACAGAAGACGCGGACTCCTA	58
		reverse	ACAGCACCTGCACATCACTC	
<i>mouse GAPDH</i>	472	forward	CAATGCATCCTGCACCACCAA	58
		reverse	GTCATTGAGAGCAATGCCAGC	

4. リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR は Brilliant SYBR[®] Green QPCR Reagents (STRATAGENE 社製 *La Jolla, CA, USA*) を用いて行った。反応条件は、denature ステップは 95°C で 1 サイクル目が 5 分間、2 サイクル以降は 20 秒間で行った。extension ステップは 72°C で 20 秒間とし、全て 45 サイクルの増幅を行った。使用したプライマー配列は表 2 に示す通りである。定量化には MxPro QPCR Software (STRATAGENE 社製 *La Jolla, CA, USA*) を用いた。各 messenger RNA (mRNA) の発現量は *GAPDH* mRNA の発現量と比較して、相対的発現量 ($\Delta\Delta C_t$ 法) を算出した。

表 2: リアルタイム PCR 法に用いたプライマーと反応条件

mRNA	PCR 産物の サイズ (bp)		プライマーの塩基配列 (5'→3')	アニーリング 温度 °C
<i>human sprouty2</i>	202	forward	TTTCCCATTGCTCATCTGC	62
		reverse	AGACCAACTTCCGAGCAATCG	
<i>human sprouty4</i>	85	forward	CCCCGGCTTCAGGATTTA	62
		reverse	CTGCAAACCGCTCAATAC	
<i>human spread1</i>	92	forward	AGAGCGACTCAGGGACAAAA	62
		reverse	TCCAGTGGTGAAATGTTGGA	
<i>human spread2</i>	181	forward	CAGGGGAGTAAGGAAAGCAA	62
		reverse	ACAGGATGTGGGAGAGGAGA	
<i>human Runx2</i>	81	forward	GTAGATGGACCTCGGGAACC	62
		reverse	ACTGAGGCGGTCAGAGAACA	
<i>humna ALP</i>	120	forward	GACAAGAAGCCCTTCACTGC	62
		reverse	AGACTGCGCCTGGTAGTTGT	
<i>human Osx</i>	80	forward	GGCACAAGAAGCCGTACTC	62
		reverse	GTAAAGGGGGCTGGATAAGC	
<i>human OCN</i>	106	forward	GGCGCTACCTGTATCAATGG	62
		reverse	TCAGCCAACTCGTCACAGTC	
<i>human GAPDH</i>	174	forward	ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	62
		reverse	GTCATACCAGGAAATGAGC	

mRNA	PCR 産物の サイズ (bp)		プライマーの塩基配列 (5'→3')	アニーリング 温度 °C
<i>mouse sprouty2</i>	100	forward	ATAATCCGAGTGCAGCCTAAATC	62
		reverse	CGCAGTCCTCACACCTGTAG	
<i>mouse sprouty4</i>	103	forward	CGACCAGAGGCTCCTAGATCA	62
		reverse	CAGCGGCTTACAGTGAACCA	
<i>mouse spread1</i>	176	forward	CACAGCCTCCCTCGTTAAAA	62
		reverse	AGCACAGAGCATGCAGCTAA	
<i>mouse spread2</i>	185	forward	ATGGACCATTACCACCCTGA	62
		reverse	TAGGAGTCCGCGTCTTCTGT	
<i>mouse Runx2</i>	200	forward	GCCGGGAATGATGAGAACTA	62
		reverse	GGACCGTCCACTGTCACTTT	
<i>mouse ALP</i>	205	forward	GCTGATCATTCCCACGTTTT	62
		reverse	ACTGGGCCTGGTAGTTGTTG	
<i>mouse Osx</i>	121	forward	AGCGACCACTTGAGCAAACAT	62
		reverse	GCGGCTGATTGGCTTCTTCT	
<i>mouse OCN</i>	120	forward	CTGCGTGTGAAGAAGATCCA	62
		reverse	CCAGTGGACAGGGAAGATGT	
<i>mouse GAPDH</i>	181	forward	GGAGCGAGACCCCACTAACATC	62
		reverse	CTCGTGGTTCACACCCATCAC	

5. ウェスタンブロット法

溶解溶液 (40 mM Hepes、150 mM 塩化ナトリウム、0.5% ノニデット P-40、1 mM EDTA、1 mM バナデート、50 mM フッ化ナトリウム、1 mM ジチオスレイトール、100 mM ピロリン酸ナトリウム、10% グリセリン) を用いて細胞からタンパク質を抽出し、吸光度測定にて濃度定量後、1 レーン当たり総タンパク質量が 75 μ g になるようにして、sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った (30 mA、3 時間)。その後、タンパク質成分を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore 社製 *Billerica, MA, USA*) に転写 (250 mA、2 時間) し、抗体の非特異的結合を防ぐために、10% スキムミルク/PBS 中で室温にて 30 分間ブロッキングを行った。次に、1 次抗体として抗 Sprouty2 ポリクローナル抗体、抗 Sprouty4 ポリクローナル抗体、抗 p-MAPK モノクローナル抗体、抗 p-Akt ポリクローナル抗体、抗 Akt ポリクローナル抗体、抗 p-Smad1/5/8 は 500 倍希釈で使用し、抗 ERK2 ポリクローナル抗体、抗 c-Myc 抗体は 1000 倍希釈で用いて、4°C にて 16 時間反応させた。次に、PBST で 5 分 $\times$ 2 回洗浄後、2 次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG (Jackson Immuno-Research Laboratories 社製 *West Grove, PA, USA*) を用い、室温で 30 分間反応させた。その後、PBST で 15 分 $\times$ 4 回洗浄し、Super signal (PIERCE 社製 *Rockford, IL, USA*) で発色させて X 線フィルム (Fuji Film 社製 *Tokyo, Japan*) 上で検出した。

5. 蛍光免疫細胞染色

培養溶液を吸引除去し、4% ホルムアルデヒド (ナカライテスク社製 *Kyoto,*

Japan) を加え室温で 30 分固定した。次に、5 分 × 3 回 PBST で洗浄し、抗体の非特異的結合を防ぐためにブロッキングバッファーの中に浸漬し、30 分間室温で反応させた。その後、5 分 × 3 回 PBST で洗浄し、抗 Sprouty2 ポリクローナル抗体、抗 Sprouty4 ポリクローナル抗体 (1/200) / ブロッキングバッファーで 1 次染色を行い、16 時間、4℃ で反応させた。その後、PBST で 15 分 × 2 回洗浄し、蛍光標識二次抗体 Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor[®] 488) (Cell Signaling Technology 社製 *Beverly, MA*) / ブロッキングバッファーで 2 次染色を行い、2 時間、室温で反応させた。次に、PBST で 15 分 × 2 回洗浄した後、VECTASHIELD Mounting Medium with Propidium Iodide (Vector Laboratories 社製 *California, USA*) で包埋し、HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (KEYENCE 社製 *Osaka, Japan*) にて観察した。

6. *Sprouty2* の強制発現

Sprouty2 遺伝子強制発現は X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent (Roche 社製 *USA*) を用いてリポフェクション法にて行った。SaOS-2 に *human Sprouty2* (pcDNA3-*hSprouty2*)、MC3T3-E1 に *mouse Sprouty2* (pcDNA3-*mSprouty2*) のプラスミドをそれぞれ導入した。対照群には empty vector (pcDNA3) を導入した。

7. 細胞増殖アッセイ

SaOS-2 および MC3T3-E1 に *Sprouty2* プラスミド もしくは empty vector プラスミド を遺伝子導入し、96 穴プレートに 5×10^2 個/well で播種した。24 時

間後に培地交換を行い、bFGF (50 ng/ml) を添加し 72 時間培養した。0、12、24、48、72 時間毎に WST-8 生細胞数検出キット (ナカライテスク社製 *Kyoto, Japan*) を用いて細胞数測定を行った。

8. Alizarin red 染色

SaOS-2 細胞を 24 穴プレートに 1.0×10^5 個/well で播種し、コンフルエントに達してから bFGF (100 ng/ml) または BMP-2 (300 ng/ml) を添加して、14 日間培養した。培地は 3 日毎に交換した。細胞は、10% ホルムアルデヒド (ナカライテスク社製 *Kyoto, Japan*) を用いて室温で 60 分間固定し、2 回水洗した後、28% 水酸化アンモニウム (Wako 社製 *Osaka, Japan*) にて pH 6.3~6.4 になるように調整した 1% Alizarin red S 水溶液 (ナカライテスク社製 *Kyoto, Japan*) を加え、5 分間染色した後 2 回水洗し、脱水乾燥させた。

9. von Kossa 染色

MC3T3-E1 細胞を 24 穴プレートに 1.0×10^5 個/well で播種し、コンフルエントに達してから bFGF (100 ng/ml) または BMP-2 (300 ng/ml) を添加して、14 日間培養した。培地は 3 日毎に交換した。細胞は、10% ホルムアルデヒドを用いて室温で 30 分間固定し、5% 硝酸銀水溶液 (Polysciences 社製 *Warrington, PA, USA*) を加え、10 分間 UV を照射させた。その後 5% チオ硫酸ナトリウム (Polysciences 社製 *Warrington, PA, USA*) で 2 分間処理し、黒化を停止させた。最後に水洗、脱水乾燥させた。

10. small interfering RNA (siRNA) の導入

Sprouty2 遺伝子発現抑制は X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche 社製 USA) を用いてリポフェクション法にて行った。使用した *Sprouty2* siRNA の塩基配列は 5'-GCCATCCGAAACACCAATGAGTACA-3' とした。対照群には Negative control siRNA (Invitrogen 社製 Carlsbad, CA, USA) を導入した。

11. 統計学的処理

統計学的解析は JMP (SAS institute 社製 Cary, NC, USA) を用い、Mann-Whitney *U* 検定および analysis of variance (ANOVA) を行った。 $P < 0.05$ の場合を有意差ありとした。統計学的処理を行った結果は、平均 $\pm$ 標準偏差で示した。

結 果

研究 1. 骨芽細胞株における *Sprouty*/*Spred* ファミリーの発現

1-1. 骨芽細胞における *Sprouty*/*Spred* ファミリーの mRNA の発現

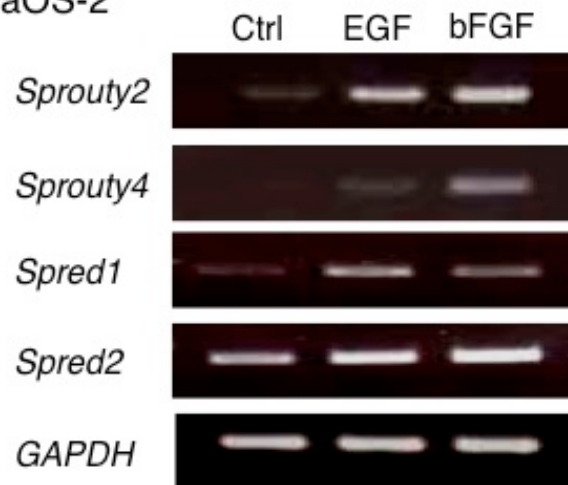
骨芽細胞における *Sprouty*/*Spred* ファミリーの役割を解析するにあたり、まず RT-PCR 法を用いて SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に発現する *Sprouty*/*Spred* ファミリーの mRNA の発現を確認した。

Sprouty は哺乳類で 4 種類、*Spred* は 3 種類のホモログが同定されており、そのうち *Sprouty* 2、4 および *Spred* 1、2 は MAPK 経路により転写誘導されるネガティブフィードバック制御因子である (12, 13, 15)。

SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞ともに、EGF、bFGF 添加時に *Sprouty*2、4 および *Spred*1、2 の発現誘導を確認した (図 2A と B)。さらに、骨芽細胞株における *Sprouty*/*Spred* ファミリーの発現量を定量化するために、リアルタイム PCR 法を施行した。その結果、EGF と bFGF 添加により、*Sprouty*2、4 および *Spred*1、2 の発現誘導が認められ、コントロール群と比較して bFGF 添加群の発現誘導の亢進を認めた (図 2C と D)。

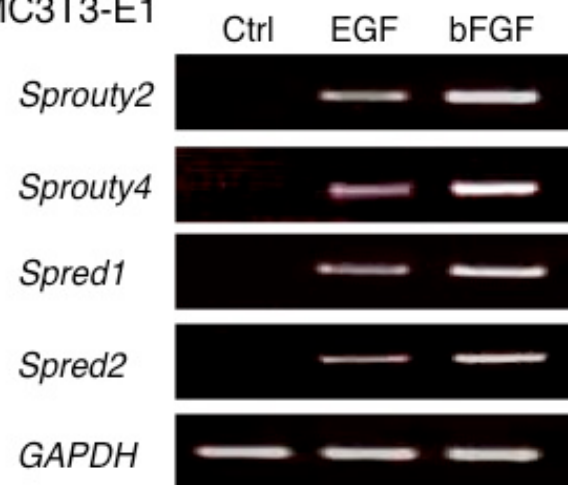
A

SaOS-2



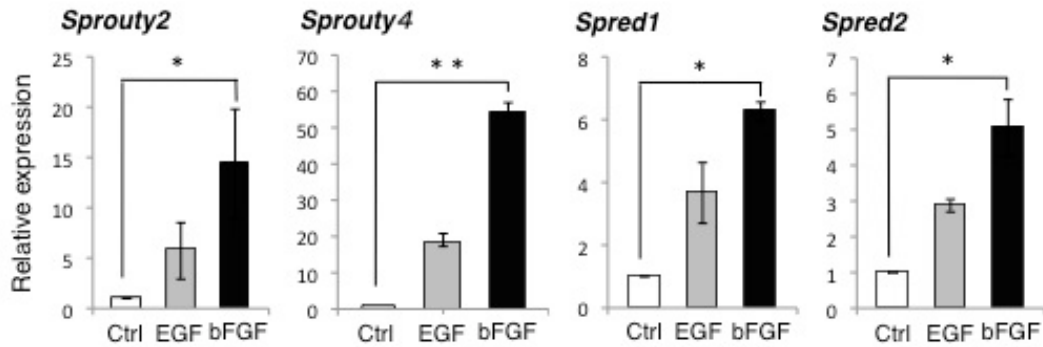
B

MC3T3-E1



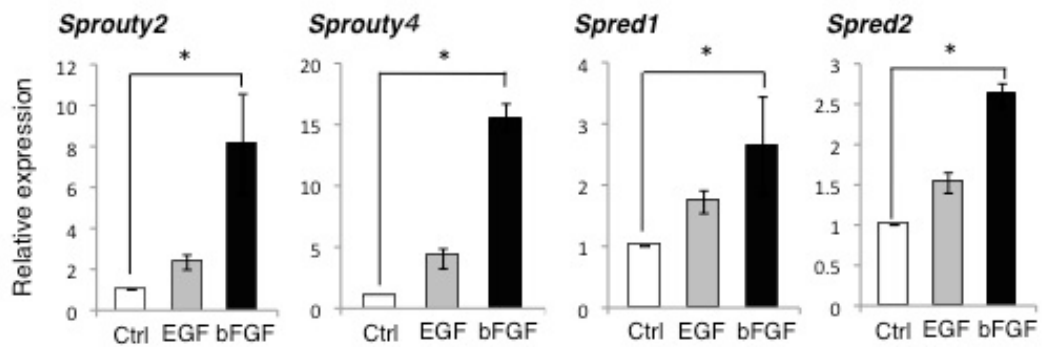
C

SaOS-2



D

MC3T3-E1



* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Mann-Whitney U-test

図 2：骨芽細胞株における *Sprouty*/*Spred* ファミリーの mRNA の発現

SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に EGF (50 ng/ml)、bFGF (50 ng/ml) で 4 時間刺激を行ったときの *Sprouty*/*Spred* ファミリーの mRNA の発現を RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法にて解析した。RT-PCR 法により、SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞において EGF、bFGF 刺激により、*Sprouty2*, 4 および *Spred1*, 2 の発現誘導を認めた (A と B)。リアルタイム PCR 法では、両骨芽細胞ともに bFGF 刺激により *Sprouty2*, 4, *Spred1*, 2 の発現誘導の促進を認めた (C と D)。

1-2. 骨芽細胞におけるタンパク質レベルでの Sprouty2 と Sprouty4

の発現

次に、タンパク質レベルでの Sprouty2 と Sprouty4 の発現を、ウエスタンブロット法を用いて解析した。SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞で、EGF ならびに bFGF 添加時に Sprouty2 と 4 の発現を確認した。両骨芽細胞において、Sprouty2 の発現は EGF 添加時より bFGF 添加時により強い発現を認めたが、Sprouty4 の発現では、有意な差は認めなかった (図 3)。また、骨芽細胞内 (MC3T3-E1) の Sprouty2 と 4 の局在を調べるために、蛍光免疫細胞染色を施行したところ、Sprouty2 と 4 それぞれ細胞質内に発現を認めた (図 4)。

以上の結果より、Sprouty/Spred ファミリーのうち、Sprouty2 と 4、Spred1 と 2 がヒトおよびマウスの骨芽細胞に強く発現していることが確認され、なかでも Sprouty2 は bFGF により強い発現誘導が起こることが明らかになった。

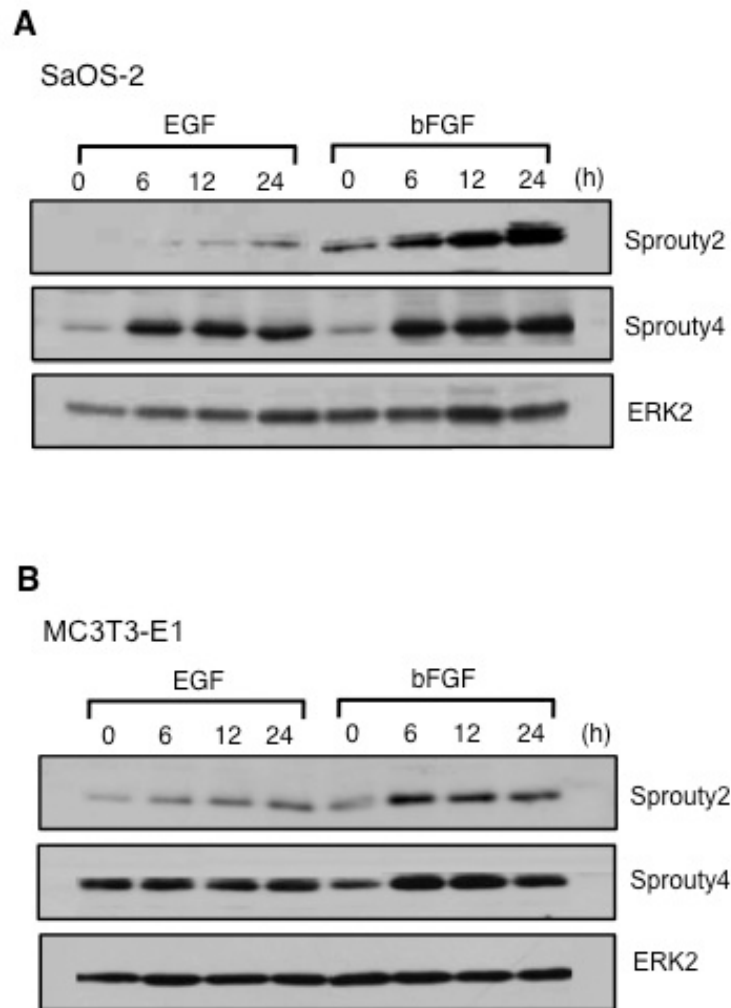


図 3：骨芽細胞におけるタンパク質レベルでの Sprouty2 と Sprouty4 の発現

SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に EGF (50 ng/ml) と bFGF (50 ng/ml) 刺激をそれぞれ行い、経時的に Sprouty2 および Sprouty4 の発現をウエスタンブロット法にて解析した。SaOS-2 において、Sprouty2 は EGF 刺激と比較して、bFGF 刺激により強い発現を認めたが、Sprouty4 に関しては EGF 刺激群と bFGF 刺激群に有意な差は認めなかった (A)。MC3T3-E1 においても同様に Sprouty2 は bFGF 刺激により発現の促進を認めたが、Sprouty4 においては EGF、bFGF 刺激で差は認めなかった (B)。

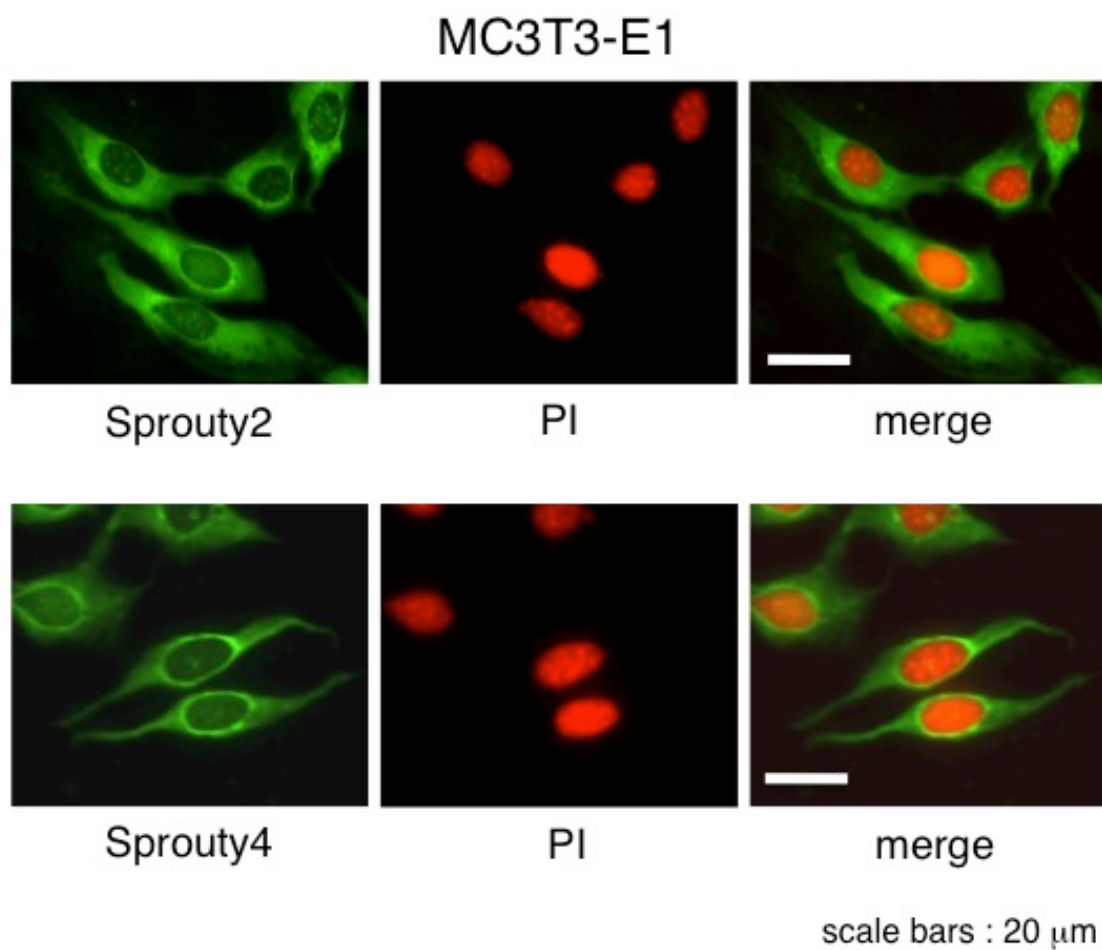


図 4 : MC3T3-E1 細胞における Sprouty2 と Sprouty4 の局在

MC3T3-E1 細胞における Sprouty2 および Sprouty4 の局在を蛍光免疫細胞染色にて検討したところ、Sprouty2、4 とともに細胞質に局在を認めた。

研究 2. *Sprouty2* 強制発現による骨芽細胞株への影響

2-1. *Sprouty2* が骨芽細胞の増殖に及ぼす影響

次に、mRNA レベル・タンパク質レベルで発現を確認できた *Sprouty2* の骨芽細胞への影響について検討を行った。最初に、細胞増殖への影響を WST-8 assay を用いて検討した。SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、bFGF 添加群と非添加群との比較を行ったところ、bFGF により細胞の増殖は促進したが、*Sprouty2* 強制発現により増殖能の低下を認めた (図 5)。

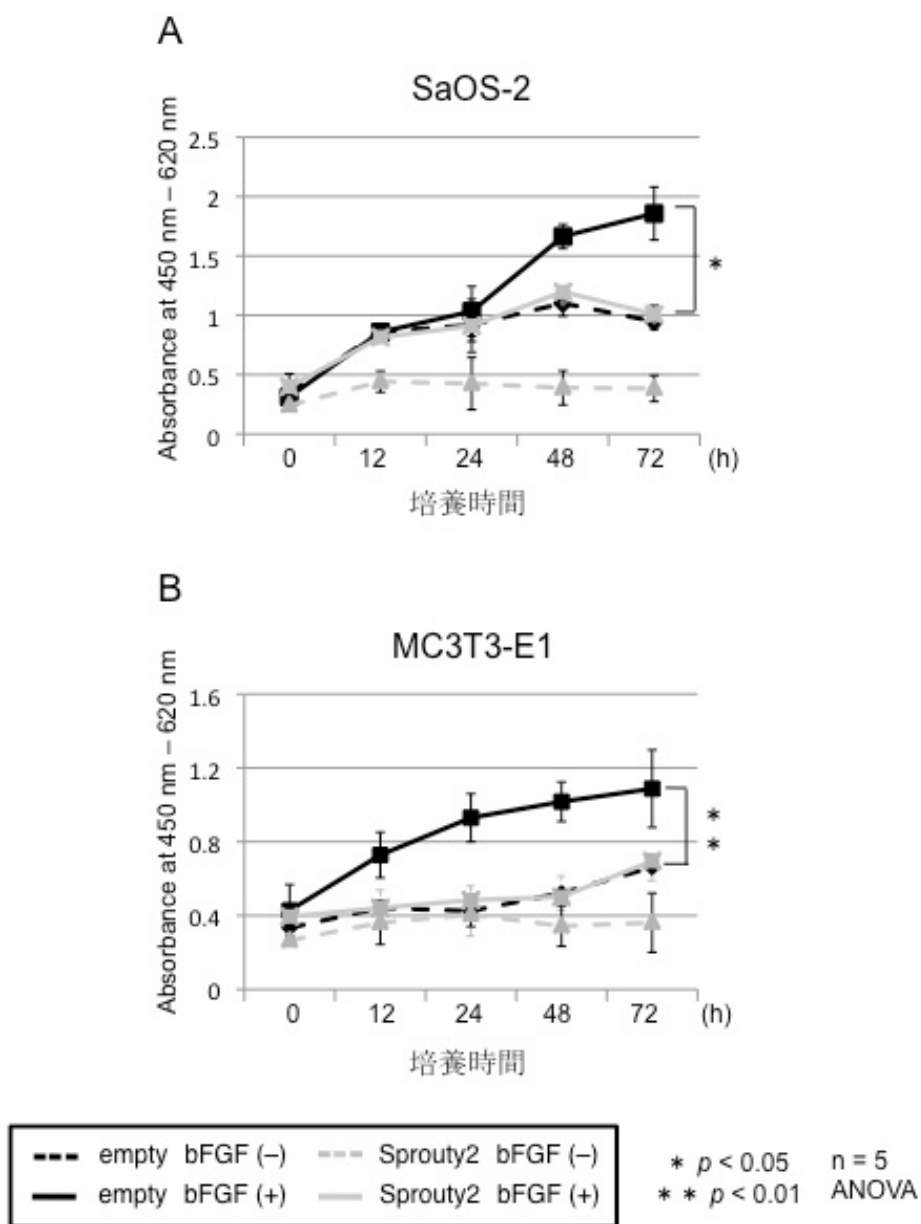


図 5 : *Sprouty2* の骨芽細胞増殖への影響

SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、bFGF (50 ng/ml) で刺激を行い、細胞の増殖能を経時的に計測した。SaOS-2、MC3T3-E1 とともに bFGF により細胞増殖の促進を認め、*Sprouty2* 強制発現した細胞群では bFGF による細胞増殖の抑制を認めた。

2-2. FGF シグナル伝達経路における *Sprouty2* の作用

FGF シグナル経路の中で、細胞の増殖・分化と最も密接に関連しているものとしては、Ras-MAPK 経路 (29-32) と PI3K-Akt 経路 (33, 34) がある。これらの経路における *Sprouty2* の作用を調べるために、SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、bFGF で刺激を行った時の MAPK と Akt のリン酸化を、ウエスタンブロット法にて解析した。結果は、両骨芽細胞ともに bFGF 刺激により MAPK および Akt のリン酸化の促進を認めたが、*Sprouty2* 強制発現群では、リン酸化の抑制を認めた (図 6)。

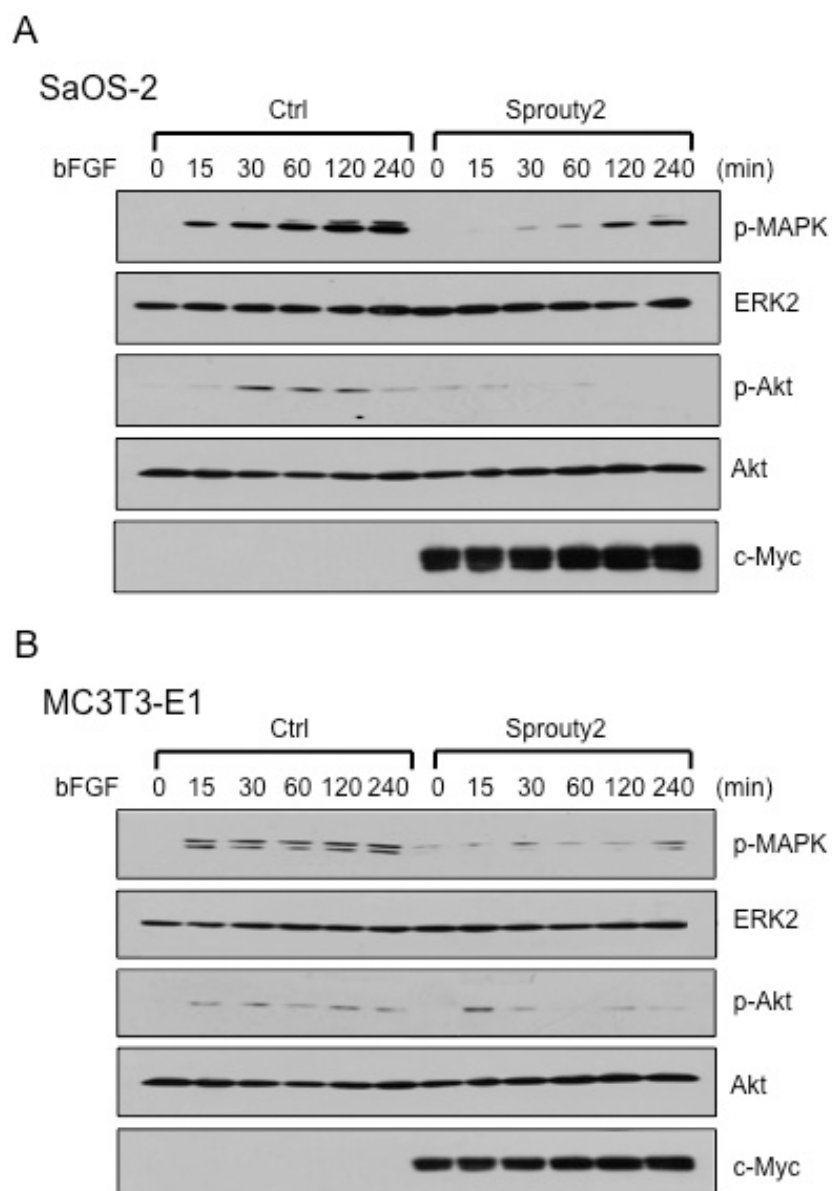


図 6: Sprouty2 の MAPK および Akt への影響

SaOS-2 および MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、bFGF (50 ng/ml) で刺激した時の MAPK および Akt のリン酸化をウェスタンブロット法を用いて解析した。両骨芽細胞株において、bFGF により MAPK および Akt のリン酸化の促進を認めたが、*Sprouty2* によりリン酸化の抑制を認めた。

2-3. BMP シグナル伝達経路における *Sprouty2* の作用

骨形成タンパク質 (BMP) には重要な性質の一つに、その名が示すとおり骨誘導作用がある。BMP シグナル経路は、Smad1/5/8 のリン酸化によって開始され、Smad4 との複合体を形成し、核へと移行し転写因子を誘導する。これまでに、この Smad と MAPK 経路との関連が数多く報告されているため、MAPK 経路抑制因子である *Sprouty2* も Smad 経路に作用しているのではないかと考え、その関連について検討を行った。まず、SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、BMP-2 で刺激を行い、Smad1/5/8 のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。結果は、両骨芽細胞ともに BMP-2 刺激により Smad1/5/8 のリン酸化促進を認めたが、*Sprouty2* 強制発現によりリン酸化の抑制を認めた (図 7)。

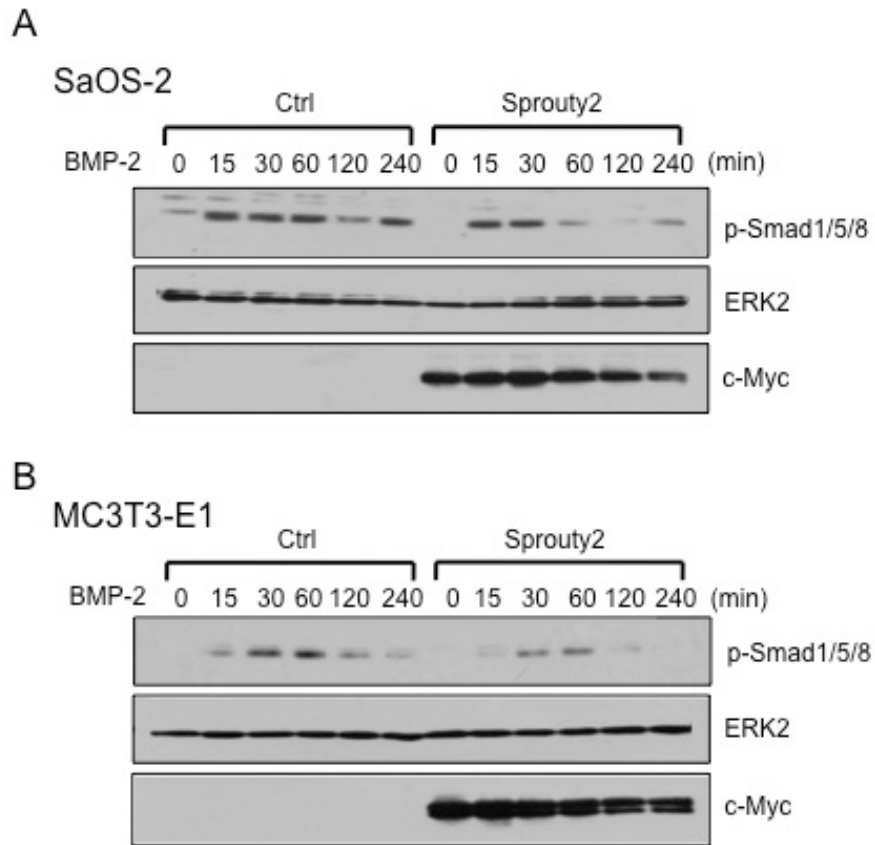


図 7: *Sprouty2* の *Smad* のリン酸化に対する影響

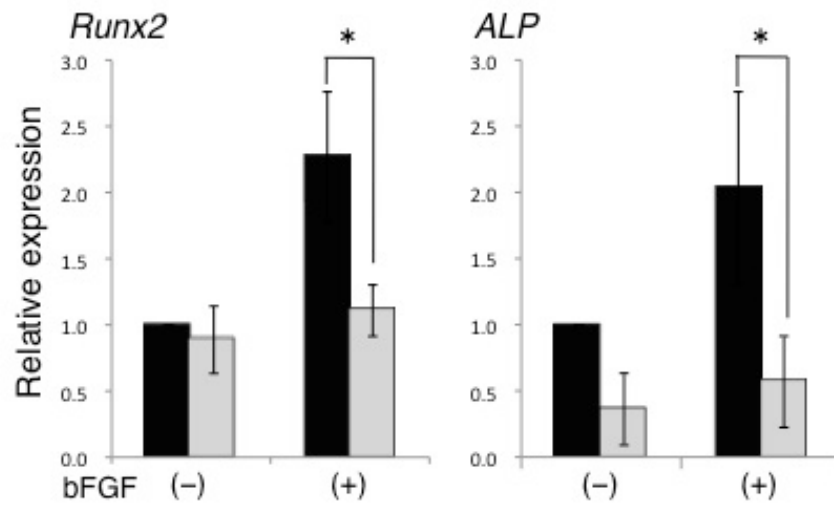
SaOS-2 および MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、BMP-2 (100 ng/ml) で刺激した時の *Smad1/5/8* のリン酸化を、ウェスタンブロット法を用いて解析した。SaOS-2 および MC3T3-E1 細胞ともに BMP-2 刺激による *Smad1/5/8* のリン酸化促進を認めたが、*Sprouty2* 強制発現によりリン酸化の抑制を認めた。

2-4. 骨芽細胞分化マーカーにおける *Sprouty2* の作用

骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化した骨形成細胞で、幹細胞から段階的に分化していく。培養骨芽細胞系において、細胞の分化段階の指標となるマーカー遺伝子は多様に存在する。本研究では、SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、骨芽細胞分化マーカーである *Runx2*、*ALP*、*osterix* (*Osx*)、*osteocalcin* (*OCN*) の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。その結果、両骨芽細胞において bFGF 刺激により *Runx2* および *ALP* の発現誘導が促進されたが、*Sprouty2* によりその発現が抑制された (図 8A と B)。さらに、BMP-2 刺激により *ALP*、*Osx*、*OCN* の発現誘導が促進されたが、*Sprouty2* 強制発現群ではその発現抑制を認めた (図 8C と D)。

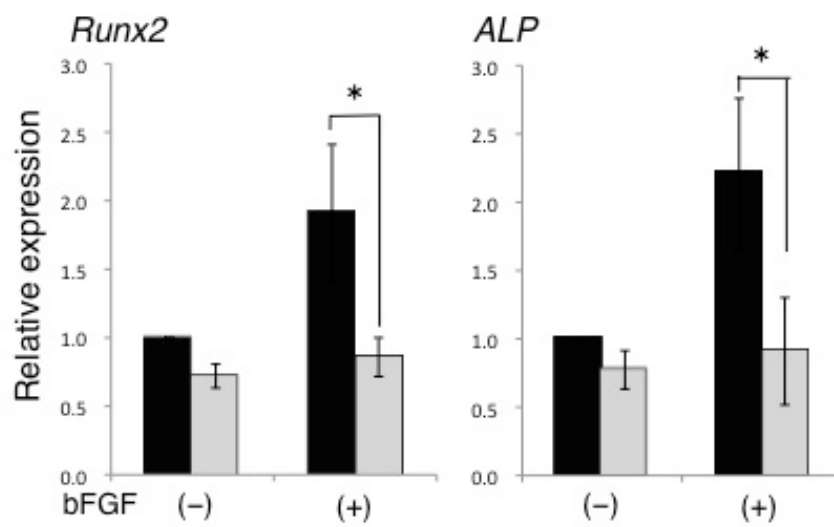
A

SaOS-2



B

MC3T3-E1

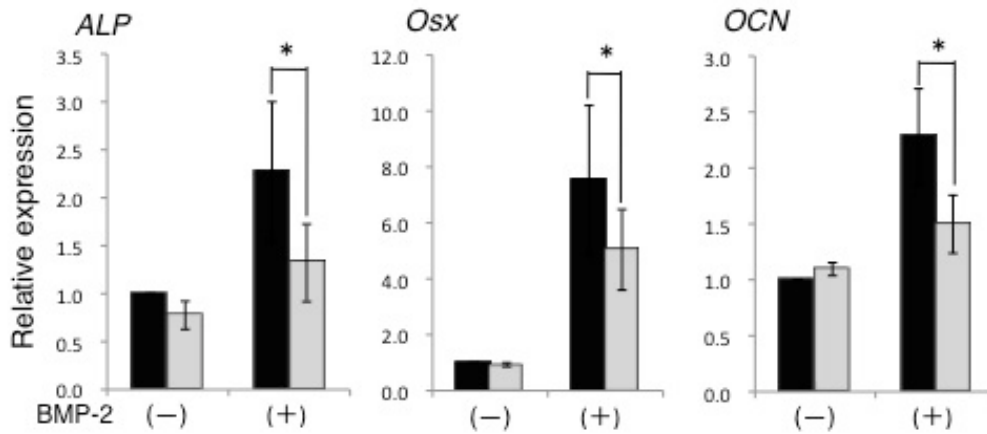


■ empty
 ■ Sprouty2

* $p < 0.05$
 Mann-Whitney U -test

C

SaOS-2



D

MC3T3-E1

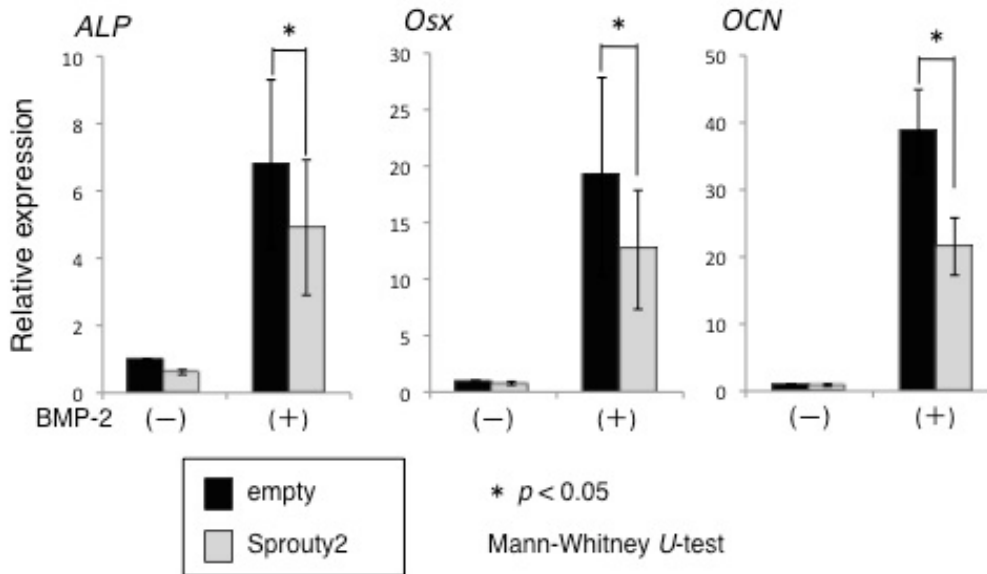


図 8: Sprouty2 の骨芽細胞分化マーカー発現誘導への影響

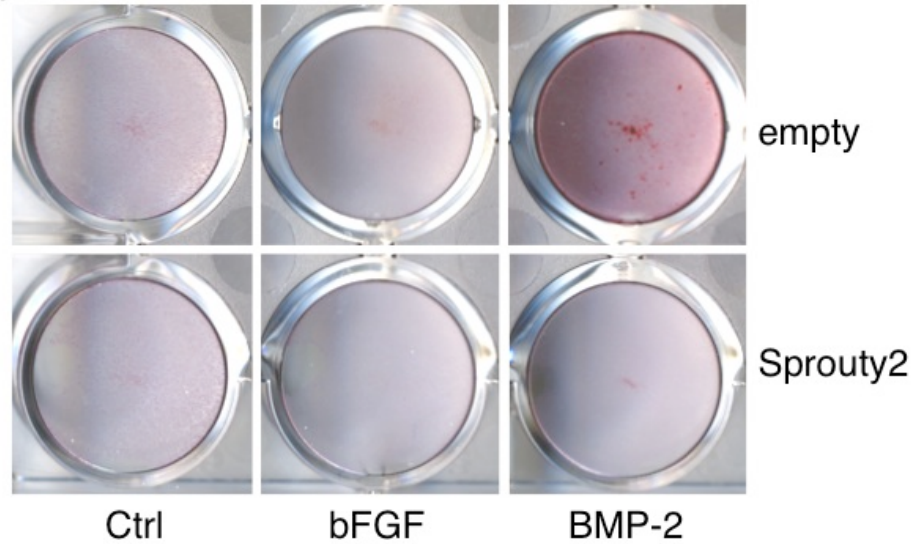
Sprouty2 の骨芽細胞分化マーカーへの影響を検討するため、骨芽細胞株に *Sprouty2* を強制発現させ、bFGF (50 ng/ml)、BMP-2 (100 ng/ml) 刺激時の骨分化マーカーの mRNA レベルでの発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。SaOS-2、MC3T3-E1 細胞において、bFGF 刺激により *Runx2* および *ALP* の発現誘導亢進を認め、*Sprouty2* により発現の抑制を認めた (図 8A と B)。また、BMP-2 刺激により、*ALP*、*Osx*、*OCN* の発現が誘導されたが、*Sprouty2* 強制発現群では発現誘導が抑制された (図 8C と D)。

2-5. *Sprouty2* が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響

次に、*Sprouty2* が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響について、Alizarin red 染色および von Kossa 染色を用いて検討した。まず、SaOS-2 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、bFGF および BMP-2 で刺激し、14 日後にその石灰化を Alizarin red 染色を用いて解析した (図 9A)。さらに、石灰化の程度を Image J を用いて定量化したところ、BMP-2 刺激時に骨芽細胞の石灰化促進を認めたが、*Sprouty2* 強制発現群では細胞の石灰化促進を認めなかった (図 9B)。同様に、MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、bFGF ならびに BMP-2 添加後 14 日目の石灰化を von Kossa 染色により評価し (図 10A)、Image J により定量化した。その結果、BMP-2 刺激時に control 群と比較して、*Sprouty2* 強制発現群の石灰化に有意な差を認めた (図 10B)。

A

Day 14



B

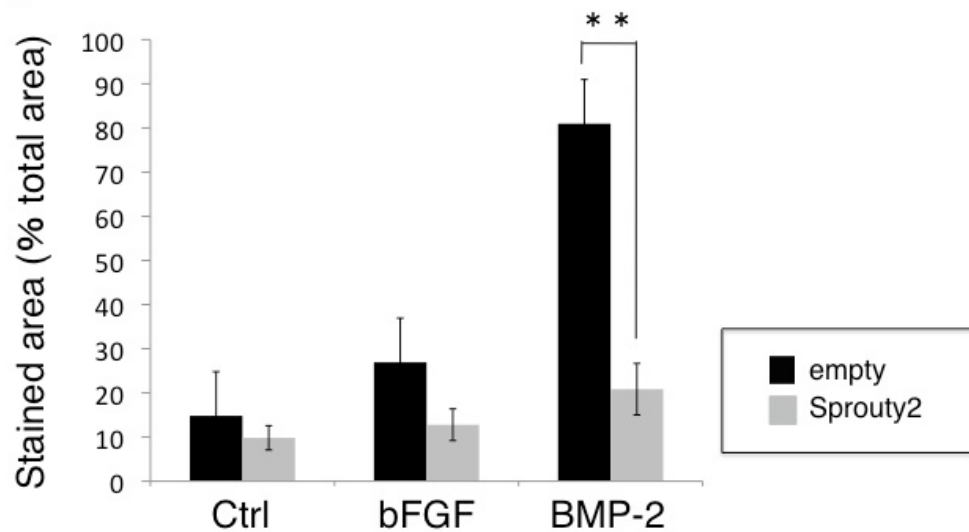
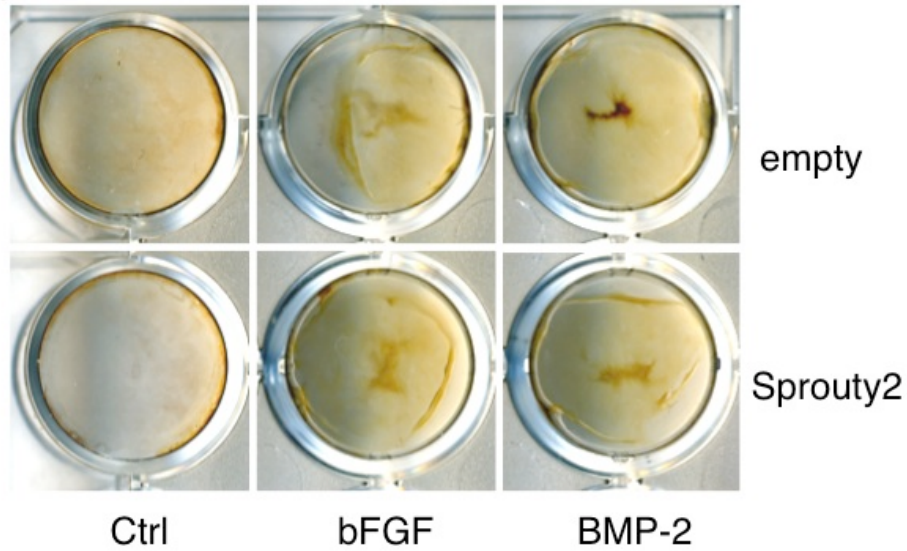


図 9: SaOS-2 における *Sprouty2* の石灰化への影響

SaOS-2 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、bFGF (100 ng/ml) ならびに BMP-2 (300 ng/ml) 刺激下で 14 日間培養した後、Alizarin red 染色により細胞の石灰化を検討した (A)。BMP-2 刺激時に石灰化の促進を認めたが、*Sprouty2* 強制発現群では BMP-2 刺激による石灰化促進が抑制された (B)。

A

Day 14



B

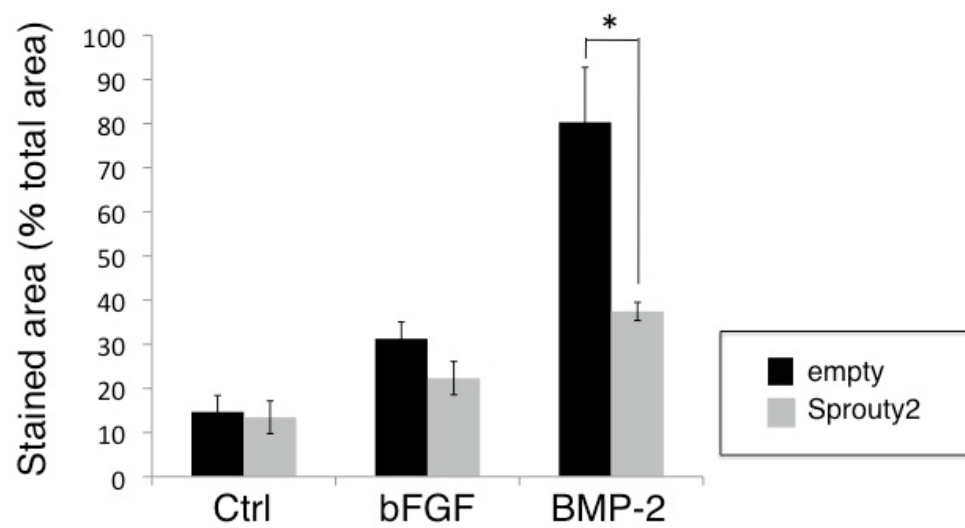


図 10 : MC3T3-E1 細胞における *Sprouty2* の石灰化への影響

MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* を強制発現させ、bFGF (100 ng/ml)、BMP-2 (300 ng/ml) 刺激下で 14 日間培養した後、von Kossa 染色により細胞の石灰化を検討した (A)。BMP-2 刺激により石灰化の促進を認めたが、*Sprouty2* 強制発現群では、BMP-2 による石灰化促進が抑制された (B)。

研究 3. *Sprouty2* 遺伝子抑制による骨芽細胞株への影響

3-1. FGF シグナル伝達経路における *Sprouty2* ノックダウンの影響

さらに、*Sprouty2* ノックダウンによる骨芽細胞への影響を検討するために MC3T3-E1 細胞に *Sprouty2* siRNA をリポフェクション法にて導入した。48 時間培養した後 bFGF で刺激を行い、MAPK および Akt のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。結果は、control 群と比較して siRNA 群では、MAPK および Akt のリン酸化が促進されていた (図 11)。

MC3T3-E1

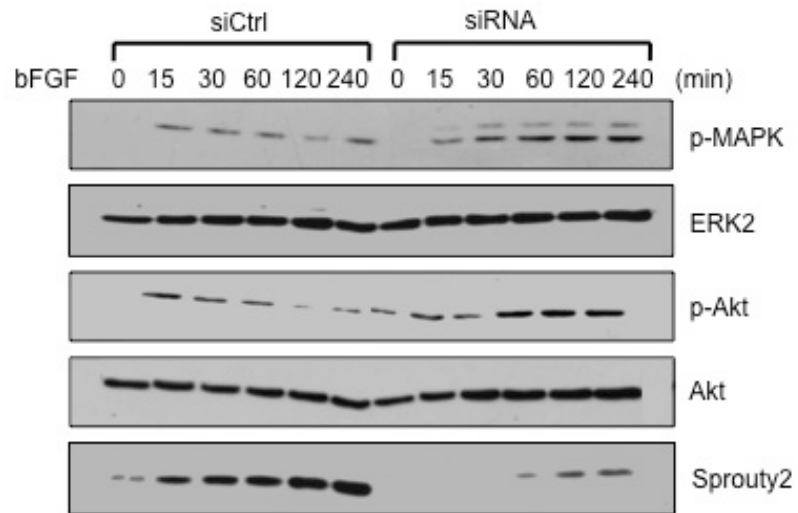


図 11 : *Sprouty2* siRNA による MAPK および Akt に対する影響

Sprouty2 siRNA をリポフェクション法にて MC3T3-E1 細胞に導入した後、bFGF (50 ng/ml) にて経時的に刺激を行い、MAPK および Akt のリン酸化をウエスタンブロット法にて解析した。結果は、*Sprouty2* ノックダウンにより MAPK および Akt のリン酸化が、control 群と比較して促進されていた。

考 察

骨形成に関わるシグナル伝達系として、Ras-MAPK (ERK1/2) 経路、BMP-Smad 経路が広く知られており、これらの伝達系がクロストークして骨形成は複雑なネットワークで制御されている。MAPK 経路は、MAPKKK (Raf)、MAPKK (MEK)、MAPK (ERK) により構成されており、EGF や FGF などの増殖因子により活性が誘導される。活性化した ERK は最終的に核へ移行し、転写因子が活性化され、細胞の増殖・分化の遺伝子が発現する。FGF は 1~23 のファミリーを形成しており、その中の bFGF は、p42/p44 MAPK (ERK1/2) を活性化し、骨芽細胞の増殖・分化に重要な成長因子の 1 つである (28-31)。

この MAPK 経路の抑制因子である Sprouty/SpreD ファミリーの骨との関連については報告が少なく、詳細は不明である。しかしながら、KO マウスの表現型からも Sprouty/SpreD ファミリーが骨形成に関与していることが考えられる。

そこで、本研究ではまず初めに Sprouty/SpreD ファミリーの骨芽細胞での発現を調べた。MC3T3-E1 細胞および SaOS-2 細胞において、mRNA レベルで EGF、bFGF 刺激により *Sprouty2*、*4* および *SpreD1*、*2* の発現を認め、タンパク質レベルで *Sprouty2* および *4* の存在を確認した。また、*Sprouty2* および *Sprouty4* の骨芽細胞における局在を、蛍光免疫細胞染色を用いて解析したところ、*Sprouty2*、*4* とともに MC3T3-E1 細胞の細胞質に発現が認められた。MC3T3-E1 において、FGF-1 刺激による *Sprouty2* の発現誘導は報告されている (35) が、

Sprouty4 および Spred1、2 の発現は報告されていない。さらに、本研究でヒト骨芽細胞株である SaOS-2 細胞にも Sprouty/Spred ファミリーが発現していることが明らかになった。このことから、マウスのみならずヒト骨芽細胞においても Sprouty/Spred ファミリーが関与していることが示唆された。

次に、mRNA レベルとタンパク質レベルで発現を確認した Sprouty2 の骨芽細胞における作用について検討した。はじめに、*Sprouty2* を各種骨芽細胞に強制発現させ、bFGF 添加後の細胞の増殖能を経時的に解析した。bFGF は MAPK 経路を介して骨芽細胞の増殖を促進することが知られており (36, 37)、MC3T3-E1 細胞および SaOS-2 細胞それぞれで bFGF 刺激により細胞増殖の亢進を認めたが、*Sprouty2* 強制発現群では両骨芽細胞ともに細胞増殖の抑制を認めた。また、FGF シグナル経路において骨芽細胞の増殖・分化に重要な役割を担っている因子として MAPK 経路の他に Akt 経路が存在する。増殖因子による刺激は、MAPK 経路と同時にアポトーシス誘導を抑制する経路にも伝わり、細胞死を防ぐ。このアポトーシス抑制活性の経路は PI3K のリン酸化活性から始まり、Akt のリン酸化を通して、細胞の生存やアポトーシス誘導を阻害する (PI3K-Akt 経路) (33, 34)。そこで、この MAPK と Akt のリン酸化に対する *Sprouty2* の影響をウェスタンブロット法にて解析したところ、*Sprouty2* は両骨芽細胞における MAPK および Akt のリン酸化を抑制していた。これらのことから、*Sprouty2* は Ras-MAPK (ERK1/2) 経路および PI3K-Akt 経路を阻害することにより、骨芽細胞の増殖を抑制していることが示唆された。

TGF- β スーパーファミリーには TGF- β の他、アクチビン、BMP などが含まれる。これらの因子は細胞の増殖や、分化、アポトーシスの制御などに重要な

役割を果たしている。その中のひとつである BMP は多分化能をもつ間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化する過程や、石灰化ならびに骨形成に関与する重要な因子として知られている。BMP の細胞内シグナルは、I 型と II 型に分類される膜貫通型セリン/スレオニンキナーゼ受容体によって誘導される。BMP が結合した II 型受容体は I 型受容体を活性化し、活性化された I 型受容体は、細胞質に存在する Receptor-regulated Smad (R-Smad) と呼ばれる Smad1/5/8 をリン酸化する。さらに、Smad1/5/8 は Smad4 と複合体を形成し、核内へ移行して転写因子を誘導する (38, 39)。また、これまでに BMP と FGF との関連についてはいくつかの報告があり、軟骨において FGF が軟骨細胞増殖や Ihh (indian fedgehog) の発現を抑制するのに対し、BMP は軟骨細胞の増殖や前肥大軟骨細胞による Ihh の発現を促進するとされている (40, 41)。Ihh は前肥大軟骨細胞と肥大軟骨細胞に発現しており、そのシグナルは軟骨の増殖、PTHrP (parathyroid hormone related peptide) の産生、骨芽細胞分化に重要な経路とされている。一方、間葉系幹細胞 C3H10T1/2 や、筋芽細胞 C2C12 細胞においては、BMP-2 刺激により ERK のリン酸化が促進されるという報告 (23, 42) もあり、BMP シグナルと MAPK 経路の関連が示されているが、詳細のメカニズムについては明らかになっていない。

そこで、本研究では骨芽細胞における BMP シグナルと Sprouty2 との関連についての検討を行った。SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞に BMP-2 で刺激を行ったところ、Smad1/5/8 のリン酸化が促進されたが、*Sprouty2* 強制発現により Smad1/5/8 のリン酸化は抑制された。Sprouty が Ras-MAPK 経路のみならず、BMP-Smad 経路も抑制するという本研究の結果は、Sprouty の細胞内にお

ける役割において新たな発見であるが、BMP-Smad 経路において Sprouty がどの分子に結合して Smad1/5/8 のリン酸化を抑制するかは不明であることから、今後は免疫沈降法などを用いてターゲット分子を同定する必要があると考える。

また、SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞における Sprouty2 の骨芽細胞分化マーカーに対する影響を検討したところ、Sprouty2 によりアルカリホスファターゼ (ALP)、osteocalcin (OCN)、骨芽細胞分化の転写因子である Runx2、osterix (Osx) の発現が抑制された。Runx2 および Osx は骨芽細胞分化に必須の転写因子として最もよく知られている因子であり、それぞれの KO マウスでは、骨芽細胞分化不全によって骨が形成されない。また、Osx は Runx2 の下流に存在しているとされている (5, 6, 43-45)。骨の石灰化には骨芽細胞が発現する ALP による石灰化抑制因子ピロリン酸の分解が重要である (46)。また、OCN は Bone Gla Protein (BGP) ともよばれ、ビタミン K 依存性アミノ酸 γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) を含有する骨基質タンパク質であり、骨の石灰化を調節している。この ALP や OCN は骨芽細胞において、細胞が分化、石灰化する時に発現される分化マーカーとして知られている (3, 4, 39, 45, 47)。これら骨芽細胞分化マーカーは、Ras-MAPK 経路や BMP-Smad 経路によって転写誘導されるが、Sprouty2 により両経路にネガティブフィードバックがかかることで活性化が抑制され、その結果として、骨芽細胞分化マーカーの発現が抑制されたと考えられた。

次に、Sprouty2 の SaOS-2 細胞および MC3T3-E1 細胞における石灰化への影響を解析したところ、Sprouty2 により石灰化も抑制させることが明らかとなった。本実験では BMP-Smad 経路において、Sprouty が直接的に作用しているの

か、または FGF-MAPK 経路を介して間接的に作用しているかの発見には至らなかったが、*Sprouty2* は *Smad1/5/8* のリン酸化を阻害することによって骨芽細胞の分化および石灰化を抑制することが示唆された。

最後に、siRNA により *Sprouty2* 遺伝子抑制を行ったところ、MC3T3-E1 細胞において bFGF 刺激により MAPK および Akt のリン酸化が control 群と比較して、促進されていた。この結果は、図 6 の結果を裏付けるデータとなり、*Sprouty2* を抑制することで、MAPK および Akt を介して、骨芽細胞の増殖・分化を促進することが示唆された。

今後は、in vivo における骨の形態や治癒過程に関して、*Sprouty2* KO マウスの骨を用いた骨折モデルの治癒課程などを検討していきたいと考えている。また、骨芽細胞の増殖・分化には複数の遺伝子がシグナルクロストークを介して関与するとされているため、近年研究が進められている Wnt シグナルと *Sprouty2* との関連や、*Sprouty4* や *Spred1*、*2* の骨芽細胞への関与についてさらに検討し、ヒトにおける骨再生機構の解明へ向けて研究を繋げていきたい。

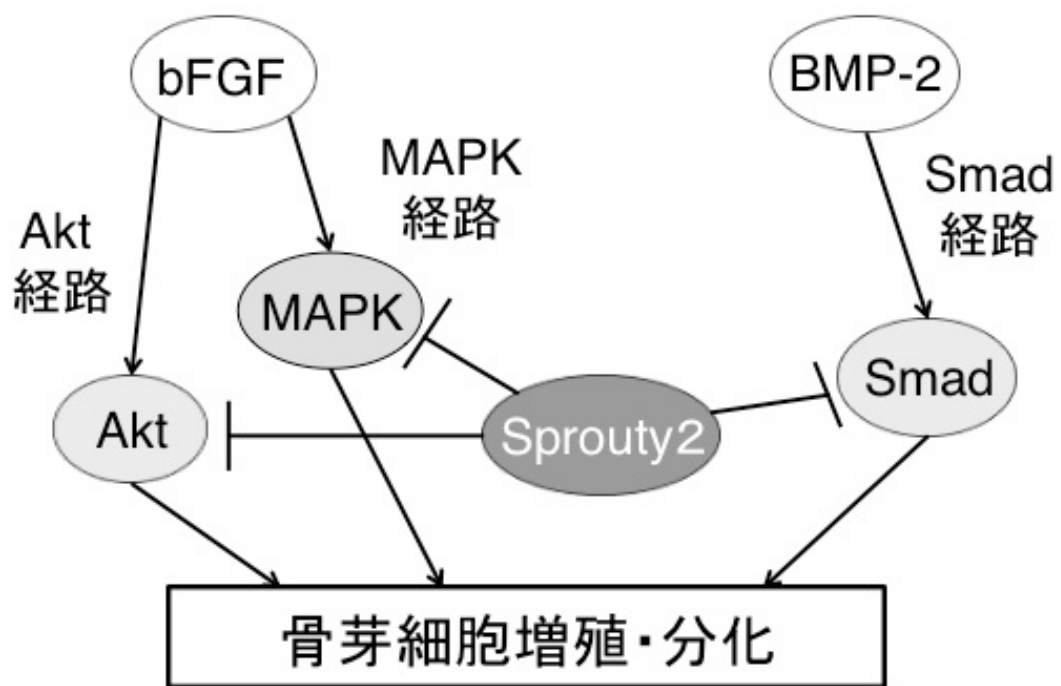


図 12 : Sprouty2 の MAPK、Akt および Smad 経路を介した骨芽細胞の増殖・分化への関与

参考文献

1. Harada S & Rodan GA (2003) Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423(6937):349-355.
2. Yamaji N, *et al.* (1994) A mammalian serine/threonine kinase receptor specifically binds BMP-2 and BMP-4. *Biochemical and biophysical research communications* 205(3):1944-1951.
3. Yamaguchi A, *et al.* (1996) Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochemical and biophysical research communications* 220(2):366-371.
4. Tamura S, *et al.* (2001) The effects of transplantation of osteoblastic cells with bone morphogenetic protein (BMP)/carrier complex on bone repair. *Bone* 29(2):169-175.
5. Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, & Ryoo HM (2003) BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochemical and biophysical research communications* 309(3):689-694.
6. Kanzaki S, *et al.* (2011) Dual effects of heparin on BMP-2-induced osteogenic activity in MC3T3-E1 cells. *Pharmacological reports : PR* 63(5):1222-1230.
7. Takeda K (1994) Expression of serine/threonine kinase receptors during ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein (BMP). *Kokubyo Gakkai zasshi. The Journal of the stomatological society, Japan* 61(4):512-526.
8. Welsh IC, Hagge-Greenberg A, & O'Brien TP (2007) A dosage-dependent role for Spry2 in growth and patterning during palate development. *Mechanisms of development* 124(9-10):746-761.
9. Goldfarb M (2001) Signaling by fibroblast growth factors: the inside story. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2001(106):pe37.

10. Sasaki A, Taketomi T, Wakioka T, Kato R, & Yoshimura A (2001) Identification of a dominant negative mutant of Sprouty that potentiates fibroblast growth factor- but not epidermal growth factor-induced ERK activation. *The Journal of biological chemistry* 276(39):36804-36808.
11. Sasaki A, *et al.* (2003) Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Cell cycle* 2(4):281-282.
12. Kim HJ & Bar-Sagi D (2004) Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(6):441-450.
13. Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, & Licht JD (2006) Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. *Trends in cell biology* 16(1):45-54.
14. Kato R, *et al.* (2003) Molecular cloning of mammalian Spred-3 which suppresses tyrosine kinase-mediated Erk activation. *Biochemical and biophysical research communications* 302(4):767-772.
15. Wakioka T, *et al.* (2001) Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* 412(6847):647-651.
16. Taketomi T, *et al.* (2005) Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia. *Nature neuroscience* 8(7):855-857.
17. Klein OD, *et al.* (2006) Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling. *Developmental cell* 11(2):181-190.
18. Matsumura K, *et al.* (2011) Sprouty2 controls proliferation of palate mesenchymal cells via fibroblast growth factor signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 404(4):1076-1082.
19. Bundschu K, *et al.* (2005) Gene disruption of Spred-2 causes dwarfism. *The Journal of biological chemistry* 280(31):28572-28580.
20. Tudece IL, Schuh K, & Bundschu K (2010) Spred2 expression during mouse development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239(11):3072-3085.
21. Taniguchi K, *et al.* (2007) Sprouty2 and Sprouty4 are essential for

- embryonic morphogenesis and regulation of FGF signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 352(4):896-902.
22. Charles C, *et al.* (2011) Regulation of tooth number by fine-tuning levels of receptor-tyrosine kinase signaling. *Development* 138(18):4063-4073.
 23. Lou J, Tu Y, Li S, & Manske PR (2000) Involvement of ERK in BMP-2 induced osteoblastic differentiation of mesenchymal progenitor cell line C3H10T1/2. *Biochemical and biophysical research communications* 268(3):757-762.
 24. Yue J, Frey RS, & Mulder KM (1999) Cross-talk between the Smad1 and Ras/MEK signaling pathways for TGFbeta. *Oncogene* 18(11):2033-2037.
 25. Jun JH, *et al.* (2010) BMP2-activated Erk/MAP kinase stabilizes Runx2 by increasing p300 levels and histone acetyltransferase activity. *The Journal of biological chemistry* 285(47):36410-36419.
 26. Chen PY, *et al.* (2010) Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. *Nutr Res* 30(3):191-199.
 27. Kraunz KS, Nelson HH, Liu M, Wiencke JK, & Kelsey KT (2005) Interaction between the bone morphogenetic proteins and Ras/MAP-kinase signalling pathways in lung cancer. *British journal of cancer* 93(8):949-952.
 28. Miraoui H & Marie PJ (2010) Fibroblast growth factor receptor signaling crosstalk in skeletogenesis. *Science signaling* 3(146):re9.
 29. Miraoui H, *et al.* (2009) Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein kinase C signaling. *The Journal of biological chemistry* 284(8):4897-4904.
 30. Chaudhary LR & Avioli LV (2000) Extracellular-signal regulated kinase signaling pathway mediates downregulation of type I procollagen gene expression by FGF-2, PDGF-BB, and okadaic acid in osteoblastic cells. *Journal of cellular biochemistry* 76(3):354-359.
 31. Shimoaka T, *et al.* (2002) Regulation of osteoblast, chondrocyte, and

- osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *The Journal of biological chemistry* 277(9):7493-7500.
32. Yan YX, *et al.* (2012) Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation. *PloS one* 7(4):e35709.
 33. Hsu JH, *et al.* (2002) Role of the AKT kinase in expansion of multiple myeloma clones: effects on cytokine-dependent proliferative and survival responses. *Oncogene* 21(9):1391-1400.
 34. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, & Anderson KC (2001) Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 20(42):5991-6000.
 35. Yang X, *et al.* (2006) Sprouty genes are expressed in osteoblasts and inhibit fibroblast growth factor-mediated osteoblast responses. *Calcified tissue international* 78(4):233-240.
 36. Li CF & Hughes-Fulford M (2006) Fibroblast growth factor-2 is an immediate-early gene induced by mechanical stress in osteogenic cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21(6):946-955.
 37. de la Concepcion Matesanz M, *et al.* (2012) Signaling pathways of immobilized FGF-2 on silicon-substituted hydroxyapatite. *Macromolecular bioscience* 12(4):446-453.
 38. Minamizato T, *et al.* (2007) CCN3/NOV inhibits BMP-2-induced osteoblast differentiation by interacting with BMP and Notch signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications* 354(2):567-573.
 39. Lo YC, Chang YH, Wei BL, Huang YL, & Chiou WF (2010) Betulinic acid stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells: involvement of BMP/Runx2 and beta-catenin signals. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(11):6643-6649.
 40. Vajo Z, Francomano CA, & Wilkin DJ (2000) The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis,

- and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocrine reviews* 21(1):23-39.
41. Kronenberg HM (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423(6937):332-336.
 42. Gallea S, *et al.* (2001) Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone* 28(5):491-498.
 43. Komori T, *et al.* (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5):755-764.
 44. Nakashima K, *et al.* (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1):17-29.
 45. Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, & Roman-Roman S (2003) BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18(10):1842-1853.
 46. Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, & Karsenty G (2005) Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes & development* 19(9):1093-1104.
 47. Kim do Y, *et al.* (2012) Ginsenoside Rd stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells by activating AMP-activated protein kinase via the BMP-2 signaling pathway. *Fitoterapia* 83(1):215-222.

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導を頂きました 中村誠司 教授 に深甚なる謝意を表します。また直接御指導頂きました 武富孝治 助教 に深謝致します。九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野の皆様には多くの建設的御意見と御指導を賜り、心より感謝致します。