

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20556

研究課題名(和文) DSCAMおよびnetrin-1の骨代謝における機能の解明

研究課題名(英文) Functional roles of DSCAM and netrin-1 in bone metabolism

研究代表者

榎木 祐一郎(enoki, yuichiro)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：30734199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：netrin-4は骨芽細胞の分化および遊走を促進することが明らかとなった。このことより、netrin-4は骨代謝において重要な役割を果たすことが示唆された。また、netrin-4はDSCAM受容体と結合しないことが明らかとなった。さらに、DSCAM受容体のノックアウトマウスでは骨量の異常は認められなかったことから、DSCAM受容体の骨代謝の重要性は低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We found that netrin-4 promotes osteoblast differentiation and migration, suggesting that netrin-4 plays vital roles in regulating bone metabolism. We showed that netrin-4 does not interact with DSCAM receptor and DSCAM knockout mice exhibit normal bone phenotype, indicating that DSCAM receptor does not play essential roles in bone metabolism.

研究分野：口腔外科学

キーワード：netrin DSCAM 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

骨は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスにより常に維持されている組織で、骨代謝の不均衡による骨量の低下に対して、現代医療に欠かせない手法のひとつである再生医療が試みられている。近年、semaphorin などサイトカインによる再生医療への応用の可能性が報告されている (Negishi-Koga, Nat Med 2011; Hayashi, Nature 2013)。サイトカインを用いた再生医療は、骨粗鬆症や顎堤吸収異常などの骨量減少や、顎骨における腫瘍・嚢胞・外傷・先天異常などで生じる顎骨欠損に対して骨量回復を期待できるため、今後重要な位置を占める治療法になると思われる。

血管系は、骨を含むいろいろな組織にさまざまなサイトカインやホルモンを供給しており、骨格の成長に不可欠な存在である (Clarkin, Cell Metab 2010)。一方で神経系が骨代謝を調節することが示されており (Karsenty, Nature 2012; Fukuda, Nature 2013)、神経系が血管系を制御すること (Saito, Science 2012) から、血管系による骨代謝制御が存在しても不思議ではない。実際、血管内皮細胞由来の endothelin-1 や tumor necrosis factor superfamily member 18 などの因子が破骨細胞を制御することが明らかとなっている。申請者らは昨年、血管内皮細胞の産生する netrin-4 が破骨細胞を抑制することで、骨量を回復させることを報告した (Enoki, FEBS Lett 2014)。netrin ファミリーは、semaphorin ファミリーと同様に、神経系において回路形成に重要な役割を担う分子としても知られている。このように、骨格系と神経系と血管系はネットワークを形成し、互いの代謝を調節してバランスを維持していると考えられる。

当初、われわれは netrin-1 に着目していたが、Mediero らおよび Maruyama らの研究によって、骨代謝における netrin-1 の機能は解析がすすんでしまった。そこで、われわれは netrin-4 の解析をすすめることとした。

近年、netrin-1 と結合する新しい受容体として、膜貫通型タンパク質の Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (DSCAM) が報告された (Ly, Cell 2008)。DSCAM 遺伝子は第 21 染色体上のダウン症精神遅滞責任領域に同定された遺伝子で神経組織に発現する (Yamakawa, Hum Mol Genet 1998)。一方で、ダウン症候群で骨密度の低下が認められることが報告されている (Angelopoulou, Calcified Tissue Int 2000; Baptista, Osteoporosis Int 2005; McKelvey, Osteoporosis Int 2012)。しかしながら、DSCAM 遺伝子が骨代謝においてどのような役割を演じるのかは不明である。このように、DSCAM は骨格系と神経系と血管系に深く関係している分子である可能性が示唆される。一方で、netrin-4 は DSCAM と結合するかどうか不明であり、われわれが示した

netrin-4 による破骨細胞分化抑制については、どの受容体を介して破骨細胞に作用するのかが明らかではない。

2. 研究の目的

われわれは今回、netrin-4 の骨芽細胞に対する作用を調べることで、netrin-4 が骨組織に発現しているかどうか検討すること、netrin-4 が DSCAM と結合するかどうか検討すること、DSCAM ノックアウトマウスの骨表現型を調べることで netrin-4 および DSCAM の骨代謝の役割について検討した。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的観察

C57BL/6 マウスの大腿骨組織を 10% 中性緩衝ホルマリンにて 48 時間固定し、エタノール系列にて脱水後、パラフィン包埋とした。滑走式マイクロトームで厚さ 2.5 μm に薄切した組織に対し、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行い光学顕微鏡にて観察した。また、免疫組織化学的観察において、組織学的観察と同じパラフィン包埋標本を使用し、滑走式マイクロトームで厚さ 2.5 μm に薄切した組織を使用した。抗 netrin-4 抗体を用いた。ヒストファイン シンプルステイン MAXPO(G) (ニチレイ・バイオサイエンス社製) による免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。なお、陰性対象 (Negative control) には、一次抗体として使用した各抗体の代替に mouse IgG を使用し、同様の手順で染色を行った。

(2) 定量 PCR

細胞を氷冷 PBS で洗浄し ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を 1 ml 加えてスクレイパー (AGC TECHNO GLASS, Shizuoka, Japan) で回収し、プロトコールに従って全 RNA を抽出し、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) により SYBR 法で定量 PCR を行った。定量 PCR の分析に関して、比較 Ct 法を用いて beta-actin を内部標準とした。

(3) プラスミド及び遺伝子導入法

netrin-4 発現ベクター (pNtn4)、Flag 付き DSCAM 発現ベクター (DSCAM-Flag)、V5 付き netrin-1 発現ベクター (Ntn1-V5)、V5 付き netrin-4 発現ベクター (Ntn4-V5) を準備した。細胞を 24 well plate に 6×10^4 個/well で播種し、Lipofectamine 2000 を用いて遺伝子導入した。

(4) 細胞増殖試験

細胞を 96 well plate に 5×10^3 個/well で播種し、Recombinant netrin-4 (500, 2000 ng/ml) あるいは PBS と共に 48 時間血清存在下で培養した。Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Fitchburg, WI, USA) を用いて、各 well に Cell Titer 96 Aqueous One Solution を添加してから 3 時間後にマイクロプレートリーダー (Bio Rad, Redmond, WA, USA) にて 490 nm の吸光度測定を行った (N=6 にて定量)。データは相対比で示した。

(5) 細胞

骨芽細胞として MC3T3-E1 を用いた。また、タンパク質の結合能を検討するために、HEK293 細胞を用いた。

(6) RNA 干渉

siRNA として Stealth Select RNAi siRNA for murine Ntn4, Stealth RNAi Negative Control Duplex (si-CTL) を用いて、細胞への導入は Lipofectamine RNAi MAX で行った。

(7) 免疫沈降法及び western blotting

細胞を氷冷 PBS で洗浄し lysis バッファー (1% Triton-X 100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 µg/ml aprotinin, 0.1 M NaF, 2 mM Na3VO4, 1 mM PMSF) にて溶解した。サンプルは 20 分間氷上に置き、5 分間 4°C で 15,000×g にて遠心した。150 µg の lysate に 2 µg の抗 Flag 抗体 (1 µL) を加えたもの、コントロールとして lysate のみを用意し、4°C で 2 時間 インキュベートした。protein A/G PLUS-agarose IP reagent を 20 µL それぞれに加えて、4°C にて 2 時間、ローテーターで インキュベートした。10 秒間・10,000rpm で遠心し上清を吸引し lysis buffer (200 µL) 加えることを 4 回繰り返した。最後にツベルクリン シリンジで吸引し、その後 lysis buffer を 10 µL, 2x sample buffer を 15 µL 加えて 90°C で 2 分間ボイルした。4°C・10 秒間・10,000rpm で遠心し、上清をすべて 8-16% の Mini-Protein Gel TGX に SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離後、30 分間 200V でトランスブロット転写システムにてミニポリフッ化ビニリデン転写膜 (Bio Rad, Redmond, WA, USA) へ転写した。非特異的結合を防ぐため膜を 5% のスキムミルクに浸した後、それぞれの抗体を用いて検出した。化学発光検出試薬として Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad) を使用し、Chemi-Doc XRS System (Bio Rad) にて検出した。1 次抗体として抗 V5 抗体を使用した。また、2 次抗体として、抗ウサギ IgG horseradish peroxidase (HRP) 標識抗体を使用した。

(8) 統計解析

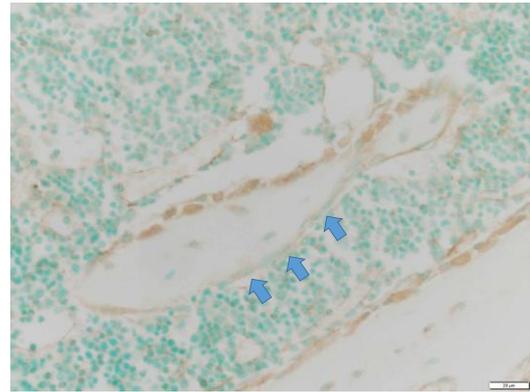
結果間の比較は 2 群間の比較には ttest を用い、3 群間以上の多重比較検定には Bonferroni 法を用いて解析した (#p<0.05, ##p<0.01)。

4. 研究成果

(1) マウス大腿骨組織における netrin-4 発現の検討

3 週齢の野生型メスマウスの大腿骨において netrin-4 の免疫染色による観察を行った。その結果、二次海綿骨および皮質骨表面の活性型骨芽細胞が netrin-4 を強く発現していた。二次海綿骨の休止面側の骨芽細胞は netrin-4 の発現が弱かった (矢印) (図 1)。

図 1



(2) netrin-4 の骨芽細胞の分化・増殖に対する作用の解析

次に netrin-4 の骨芽細胞における分化・増殖に対する作用を調べた。芽細胞分化が促進される培養条件において、骨芽細胞における netrin-4 の発現は経時的に上昇していた (図 2 A)。netrin-4 の siRNA を骨芽細胞に発現させたところ、ALP 活性の抑制が認められた (図 2 A)。一方、netrin-4 は骨芽細胞の増殖に対して促進あるいは抑制の作用を及ぼさなかった (図 2 B)。

図 2 A

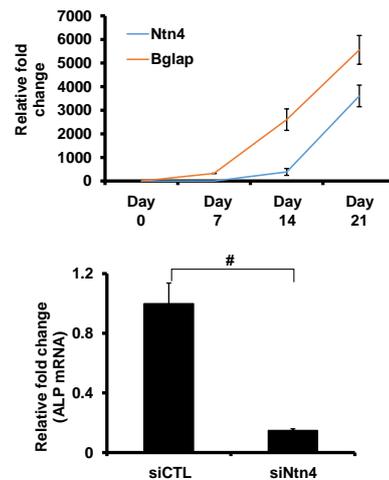
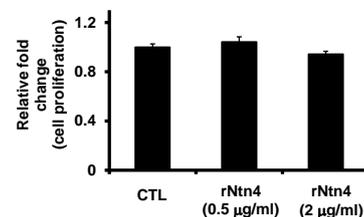


図 2 B



骨芽細胞分化培地において Recombinant netrin-4 で処理したところ石灰化が亢進し、ALP 活性が上昇した (図 3 A)。また、netrin-4 のプラスミドを作成し強制発現させたところ、ALP 活性が上昇した (図 3 B)。

図 3 A

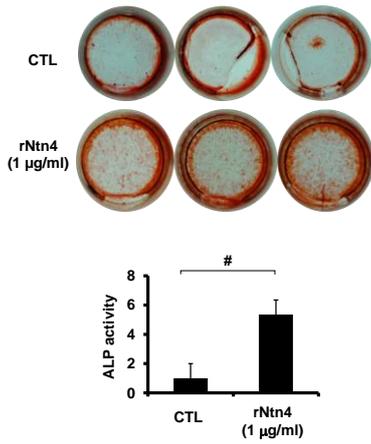
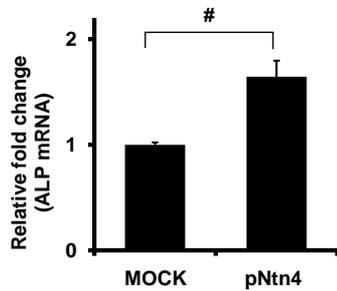


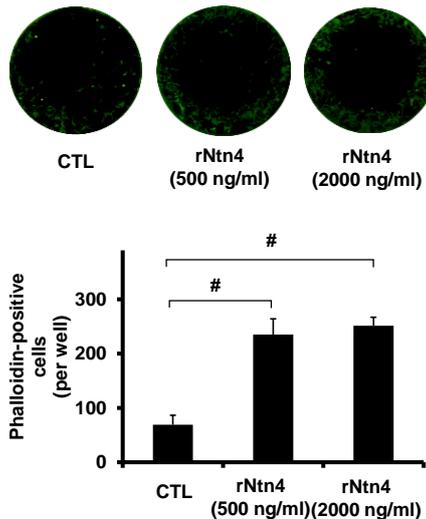
図 3 B



(3) netrin-4 の骨芽細胞の遊走能に対する作用の解析

骨芽細胞に Recombinant netrin-4 で処理し、遊走能を調べたところ遊走能は亢進していた (図 4)。

図 4



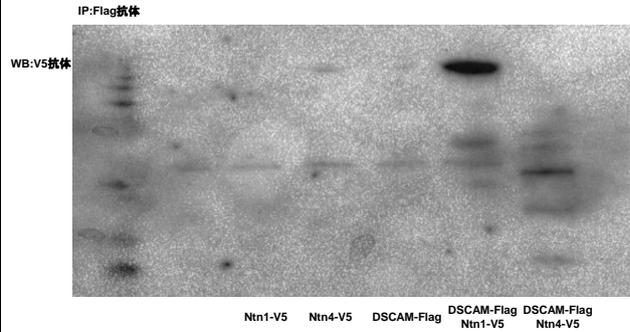
(4) HEK293 細胞における netrin-4 と DSCAM の結合能の検討

netrin-1 はすでに DSCAM 受容体と結合することが知られている(Liu G, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009). netrin-4 が DSCAM 受容体と

結合するかどうかについて検討した。

HEK293 細胞に Ntn1-V5, Ntn4-V5, DSCAM-Flag, Ntn1-V5 と DSCAM-Flag, Ntn4-V5 と DSCAM-Flag をそれぞれ導入し抗 Flag 抗体にて免疫沈降(IP)を行い, 抗 V5 抗体にて western blotting(WB)を行なった. その結果, netrin-1 は DSCAM と結合することが確認できたが, netrin-4 は DSCAM とは結合しないことが明らかとなった (図 5).

図 5



(5) DSCAM ノックアウトマウスにおける大腿骨の骨量解析

DSCAM ノックアウトマウス(DSCAM KO)について, 大腿骨の骨量解析をマイクロ CT で行ったところ, 野生型との有意差は認められなかった (下表).

	平均骨量% (N=5)
WT	0.0614
DSCAM KO	0.0768

これらの結果から, netrin-4 は骨芽細胞の分化を促進すること, 遊走を促進することが明らかとなった. このことより, netrin-4 は骨代謝において重要な役割を果たすことが示唆された. また, netrin-4 は DSCAM 受容体と結合しないことが明らかとなった. このことから, 別の netrin 受容体と結合する可能性が示唆された. さらに, DSCAM 受容体のノックアウトマウスでは骨量の異常は認められなかったことから, DSCAM 受容体の骨代謝の重要性は低いと考えられた.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- Enoki Y, Sato T, Kokabu S, Hayashi N, Iwata T, Yamato M, Usui M, Matsumoto M, Tomoda T, Ariyoshi W, Nishihara T, Yoda T. Netrin-4 promotes differentiation and migration of osteoblasts. *In Vivo* 2017 Sep-Oct;31(5):793-799. 査読あり doi: 10.21873/invivo.11132

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎木 祐一郎 (ENOKI, Yuichiro)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30734199