

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01946

研究課題名(和文) 新奇骨形成因子NELL1の骨誘導分子基盤の解明とその応用展開

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis of the bone-inducing factor NELL1

研究代表者

新美 友章 (Niimi, Tomoaki)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：30377791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト頭蓋骨縫合早期癒合症の骨癒合部位に高発現する遺伝子として単離されたNELL1は、種々の動物実験において骨形成を促進することから、新しい骨形成因子として注目を集めているが、NELL1の特異的な受容体および骨形成を促進するシグナル伝達機構の詳細は明らかになっていない。本研究ではNELL1受容体の探索およびシグナル伝達機構の解明に取り組んだ結果、NELL1の新奇受容体として間葉系細胞でも発現しているRobo2を同定した。さらに、酸性条件下においてのみ結合する様式を解明し、新たな骨形成シグナルとして働く可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨再生・欠損修復剤として欧米で承認されているBMPのような成長因子は分子量が30 k以下のサイトカインであるが、NELL1は3量体で400 kを超える巨大分子であり、分子の性状や局在においても大きく異なっている。このような新奇骨形成因子NELL1の受容体であるRobo2の同定と、酸性条件に特異的な結合様式の発見は、骨再生医療への応用の可能性を高め、さらに新たな創薬のターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The NELL1 gene was originally identified in craniosynostosis patients as being specifically upregulated within prematurely fusing sutures. Because of its potent osteoinductive activity, NELL1 protein may be useful for bone regeneration therapy. However, there is little knowledge regarding NELL1 receptors and NELL1-mediated signaling pathways. As a result of exploring the NELL1 receptor and elucidating the signal transduction mechanism, we identified Roundabout 2 (Robo2), which is mainly expressed in mesenchymal cells, as a novel receptor for NELL1. Furthermore, we elucidated the mode of ligand-receptor binding only under acidic conditions and suggested that it may act as a new bone formation signal.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：骨分化 再生医療

1. 研究開始当初の背景

(1) 事故や疾病により生じた骨欠損の治療法として、成長因子を適当なキャリアおよび標的細胞と組み合わせて組織を再生する **Tissue Engineering**（ティッシュ・エンジニアリング）の手法が急速に進展している。骨形成タンパク質: **Bone morphogenetic proteins (BMPs)** は単独で異所性の骨形成を誘導する唯一のサイトカインとして知られており、**BMP-2** 等を主成分とする骨再生・欠損修復剤が既に米国や欧州で承認され、臨床使用されているが、**BMPs** は様々な臓器の発生にも関与しており、投与部位に炎症を惹起するなど多くの合併症が報告されている。そのため、他の成長因子による代替利用が試みられているが、期待する骨形成効果が得られないなどにより進展していない。

(2) ヒト散発性頭蓋骨縫合早期癒合症 (**Craniosynostosis**) の骨癒合部位に高発現する遺伝子として単離された **NELL1 (Nel-like molecule 1)** は、種々の動物実験において骨形成を促進することが示され、**BMPs** を投与したときのような炎症を惹起しないことから、新しい骨形成因子として注目を集めている。しかし、**NELL1** の特異的な受容体は不明であり、骨形成を促進するシグナル伝達機構の詳細は明らかになっていなかったため、本研究課題の前段の研究として、① **NELL1** 受容体の探索、② 骨分化シグナル経路の解明、および③ **NELL1** タンパク質の機能領域の解析等を実施した。

(3) **NELL1** タンパク質のドメイン構造から推定して、**NELL1** が細胞接着活性を有すること、およびその細胞接着受容体がインテグリンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンであることを明らかにした。しかしながら、**NELL1** が間葉系細胞に対して特異的に骨形成を促進することを説明するには、インテグリンの他に骨芽細胞に特異的に発現する別の受容体、あるいは共受容体が存在することが推定され、その解明が次の課題として残された。

2. 研究の目的

本研究課題の前段の研究で残された課題を解明するために、① 間葉系細胞に特異的な **NELL1** 受容体を同定し、その下流のシグナル伝達経路を解明する。それと同時に、② **NELL1** タンパク質の種々の機能領域を同定し、それらの情報を基に合成した改変型 **NELL1** タンパク質の骨形成能を評価することにより、骨形成能を強化した新規骨形成因子を創成する。そして、③ **NELL1** および **NELL1** 受容体の機能を利用した新規骨再生治療法の開発への展開研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **NELL2** は **NELL1** とともに **NELL** 遺伝子ファミリーを構成しており、**NELL1** が骨形成能を有するのに対して、**NELL2** は脳神経系の機能に重要な働きをしている。近年、**NELL2** の新奇受容体として、**Robo** ファミリー受容体に属する **Robo3** が同定され、神経軸索の正中線交差を誘導することが報告された。そこで本研究では、**Robo** ファミリー受容体の **NELL1** への結合能について **NELL1** および **Robo** 受容体の欠変異体を作製し、様々な手法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) NELL1 と Robo1~Robo4 の結合を共免疫沈降法および固相化結合実験によって調べ、NELL1 が Robo3 とのみ結合することを明らかにした。また、Robo3 との結合部位は NELL1 の EGF 様ドメインに存在し、その立体構造が Robo3 との結合に重要な役割を果たしていることを見出した。しかしながら、Robo ファミリー受容体の細胞外領域の欠失変異体を作製して同様の実験をしたところ、NELL1 は Robo2 にも結合することを見出した (図 1)。また、培養細胞に Robo2 および Robo3 を発現させて、NELL1 との結合を調べたところ、*in vitro* の実験結果と一致した。Robo3 がおもに神経系組織で発現しているのに対して、Robo2 は間葉系組織での発現も多く見られることから、Robo2 が NELL1 の受容体として機能する可能性が示唆された。

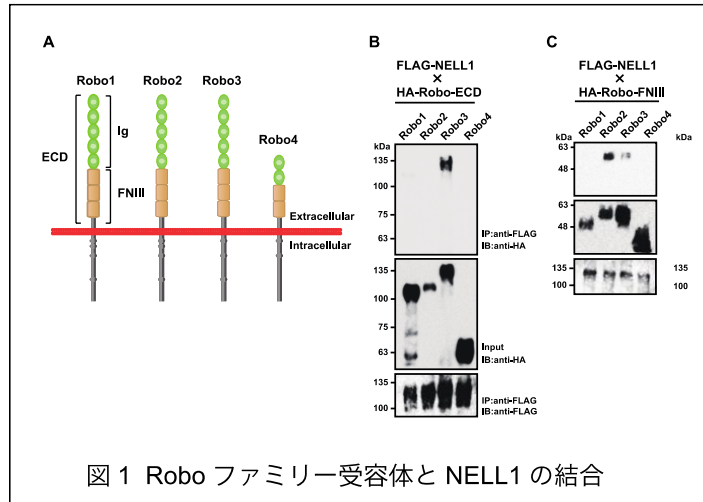


図 1 Robo ファミリー受容体と NELL1 の結合

図 1) また、培養細胞に Robo2 および Robo3 を発現させて、NELL1 との結合を調べたところ、*in vitro* の実験結果と一致した。Robo3 がおもに神経系組織で発現しているのに対して、Robo2 は間葉系組織での発現も多く見られることから、Robo2 が NELL1 の受容体として機能する可能性が示唆された。

(2) NELL1 の新奇受容体として同定した Robo2 について、pH 7 付近の生理的条件下においては、NELL1 は Robo2 に結合できないが、pH 5~6 付近の酸性条件下では、Robo2 の細胞外領域のコンフォメーション変化により、NELL1 が結合できるようになることを明らかにした (図 2, 3)。細胞外 pH の低下は破骨細胞による骨吸収を活性化することが知られており、骨形成と骨吸収のカップリング機構が存在するならば、酸性条件下で NELL1 が骨芽細胞表面の Robo2 に結合することによって骨形成のトリガーを引くような役割を果たしていることが推測された。

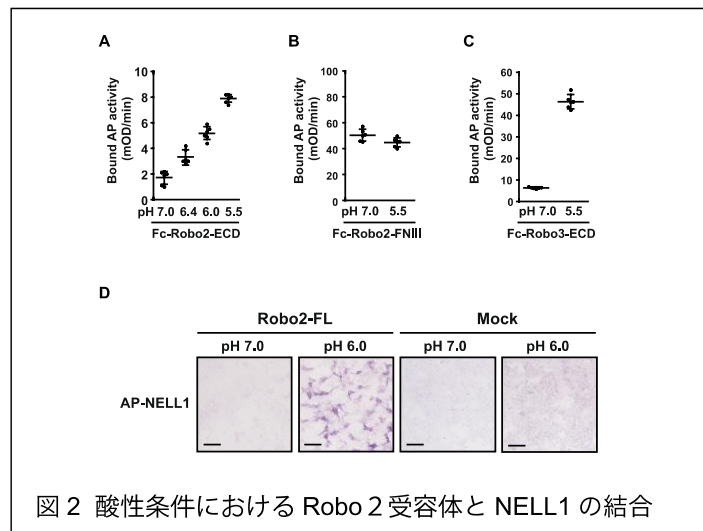


図 2 酸性条件における Robo 2 受容体と NELL1 の結合

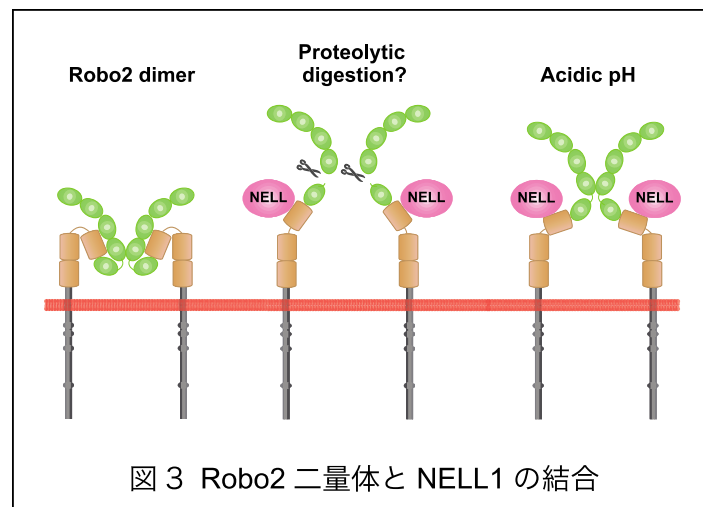


図 3 Robo2 二量体と NELL1 の結合

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto, N., Kashiwagi, M., Ishihara, M., Kojima, T., Maturana, A. D., Kuroda, S., and Niimi, T.	4. 巻 294
2. 論文標題 Robo2 contains a cryptic binding site for neural EGFL-like (NELL) protein 1/2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 4693-4703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.005819. Epub 2019 Jan 30.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------