

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390475  
 研究課題名（和文）  
 骨格原基の細胞凝集形成に関わる分子の包括的機能解析法の確立と新規制御因子の同定  
 研究課題名（英文）  
 Molecular approaches to identify molecules involved in the cell aggregates formation in the skeletal blastema and elucidation of their functional properties  
 研究代表者  
 二藤 彰 (NIFUJI AKIRA)  
 鶴見大学・歯学部・教授  
 研究者番号：00240747

## 研究成果の概要（和文）：

発生の硬組織形成過程で起こる最初の重要な変化は、細胞が組織内で凝集すること、すなわち細胞凝集塊形成である。骨格の形成機構を理解する上で、細胞凝集塊を引き起こす分子メカニズムを解明することは極めて重要である。本研究では細胞凝集塊形成に関わる分子を網羅的に単離し、その遺伝子発現解析・機能解析を包括的に行う方法を確立した。さらにそれらを通じて新規制御因子の機能解析を試みている。

## 研究成果の概要（英文）：

During skeletal development, the skeletal blastema starts from cell aggregates formation in the mesoderm tissue. To understand skeletal tissue formation, it is crucial to elucidate molecular mechanism how cell aggregates are formed. In this study we aimed to establish molecular approaches to identify functional molecules involved in the cell aggregates formation and to analyze their expressions and functions. Through these approaches, we identified and characterized several molecules that may function in the skeletal blastema.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：薬理学 分化 遺伝子 発生 骨格形成

## 1. 研究開始当初の背景

硬組織形成における最初の重要な変化は細胞凝集塊形成である。胎生期の肢芽において、粗な未分化間葉組織の中に細胞が密集する部分が現れる。まもなくそれらの細胞が軟骨特

異的な分子、例えば転写因子Sox9を発現するようになる。凝集塊で細胞増殖が盛んに起こり、3次元的に広がり引き続いて他の軟骨表現形質を発現する。未分化間葉細胞の凝集塊形成は軟骨分化に先行することから、このin

vivoの発生期における細胞凝集塊形成時における決定的な変化はなにか、働いている制御因子が何かを知ることは、骨格原基の形成機構を理解するうえで極めて重要である。

発生における軟骨分化については、多くの研究がなされ、いくつかの重要な分子が同定されている。

例えば前述の転写因子Sox9は凝集塊形成直後の分化ならびに分化の維持において必須であることが報告されている。また研究代表者らは重要な制御因子として、BMP抑制分子であるNogginとforkhead型転写因子foxc2が細胞凝集塊領域に発現し、ともにBMPの制御下にあることを報告した。これらに分子の主たるターゲットは、細胞凝集塊形成以降の骨格原基であり、凝集塊形成そのものを制御する分子についてはほとんど未同定である。

これまでの研究成果からマウス肢芽においては胎生10日から11日において、細胞凝集塊が現れ、既知の重要な分子も選択的に発現することを確認している。本研究で目指す細胞凝集形成機構に関わる制御分子の同定に必要な手段は、この時期の骨格原基凝集塊特異的に発現している分子を網羅的に単離する手法と、凝集塊形成をターゲットとした機能解析法であると考えている。前者については、in vivoの微量な組織から特異的に発現している遺伝子を直接かつ網羅的に行う方法を確立することが必要である。共同研究者の荒木、安倍らが開発した新規高精度発現プロフィール法(HiCEP法)を応用した微量サンプル解析法を考案し、萌芽的な研究として開始した。本研究においては、それらの研究を発展させ、得られた多数の遺伝子について、包括的な発現解析と機能解析を行う方法論の確立を試み、さらに骨格組織の細胞凝集に関わる制御分子の同定を行う。

## 2. 研究の目的

これまでの予備研究として網羅的新規発現プロフィール解析法を用い、3万以上の転写物をカバーし、ナノグラムオーダーという微量のRNAから、細胞凝集塊に選択的に発現が認められる300種類の転写産物を得た。感度が高くほぼすべての転写産物をカバーする技術であるため、新規、既知含めて多数の候補遺伝子が得られており、次の研究の展開として、多数の中からいかに機能的な遺伝子を同定するか、ということが重要になる。本研究においては、詳細な遺伝子発現の局在解析を通じて機能の重要性を推定し、さらに各遺伝子をウイルスに組み込みin vitro, in vivo双方において間葉細胞に作用させ機能解析を行う。対象となる遺伝子が多数(最終的には300種類)であるため、大量にかつ簡便に行える発現解析法、機能解析法が必要である。すなわち骨格原基凝集塊特異的に発現している分子

を網羅的に単離する手法と、凝集塊形成をターゲットとした機能解析法が必要である。本研究では、従来の方法論を発展改良し、包括的な発現解析法、機能解析法の確立をめざし、それを通じて骨格原基の細胞凝集形成機構に関わる制御分子の同定を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 現在得られている候補遺伝子は凝集塊そのものに高い発現を示すと予想される遺伝子群であるが、より詳細な時間的空間的局在を知るため、ホールマウント in situ hybridizationを行う。とりわけ、多数の分子について同時に発現解析を行うための方法として、従来の方法を改良した包括的ホールマウント遺伝子発現解析法 comprehensive whole mount in situ hybridization(cWISH)の確立を行う。とりわけ遺伝子のクローニングがなされていなくても、PCRをベースとした方法でマルチウェルプレートで行うことができ、多量のサンプルをハイスループットで行うのに適している。

(2) ウイルスを用いて発現解析から絞り込んだ多数の候補遺伝子の機能解析を、in vitroのアッセイにて行う。遺伝子導入方法として確実かつ強力に発現させるため、まず組み換えアデノウイルスの構築を行う。アデノウイルスを用いる方法は他の遺伝子導入方法に比較し時間と手間がかかる。多数の候補遺伝子についてアデノウイルスを構築するため、従来のベクターに改良を加えたものを用いる。バックボーンベクターにはGFP遺伝子を挿入したので、トランスフェクション効率やウイルス上清のタイターチェックが容易になる。

また組み換えアデノウイルスの構築が極めて困難な遺伝子については、レトロウイルスを用いる。Kitamuraらが開発したpMYベクターに対象となる遺伝子のORFを組み込んで行う。

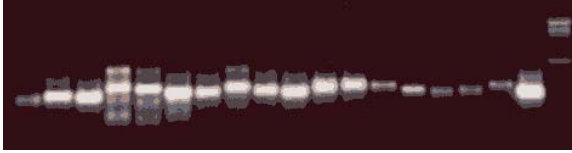
## 4. 研究成果

(1) 包括的遺伝子発現解析法の確立とそれを用いた発現解析

多くの遺伝子発現解析を同時に行うための方法として、従来の方法を改良した包括的ホールマウント遺伝子発現解析法 comprehensive whole mount in situ hybridization(cWISH)の確立を行った。従来の方法では、プローブラベルはクローニングベクターに組み込んでラベルをする。数十もの多数の分子を扱う上で、それらの方法では時間と手間を要するため、PCRをベースとしたラベル法を考案した。まずmRNAを鋳型にしてcDNAを合成し、続いて両端のプライマーによってPCRを行った。それに対して端にT3

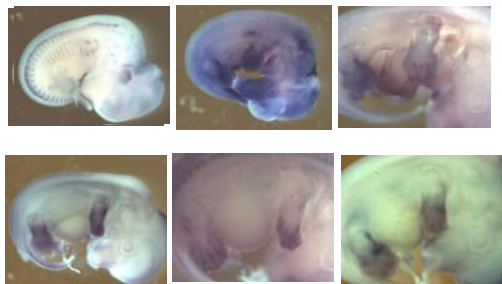
or T7 RNA polymeraseの認識部位を付加したプライマーでnested PCRを行う。それをテンプレートとしたRNA probe合成を行う。すべてマルチウェルプレートで行えるので、他種類のプローブを簡便に作製することが可能である。

(下図は18種の遺伝子について同時にプローブラベルを行ったゲルの写真を示す)



それらを用い約100遺伝子について発現解析を行った。多くが骨格原基やその周囲に特徴的な発現をすることを観察し、この包括的遺伝子発現解析法の有用性を確認した。

(下図は機能未同定のすべて異なる遺伝子の発現を示す。それらが枝芽の骨格原基あるいはその近傍に発現していることを示す。)

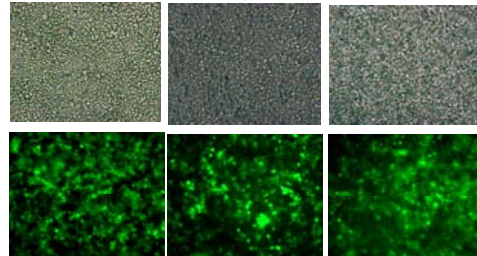


各遺伝子についてWISHで興味深い発現が認められたものについては、切片を作成し、セクション上で骨格形成期におけるそれらの遺伝子発現をさらに詳細に解析した。

(2) 前記の対象となった遺伝子のうち、骨格原基あるいは周囲に発現が特徴的であるが、機能が不明と思われる分子群について機能解析を行う強制発現法の確立を目指した。まず強制発現を行うためにはアデノウイルスベクターに組み込むシステムの確立を行った。アデノウイルスについては、多数の候補遺伝子について包括的に構築するため、従来のベクターに改良を加えたものを用いた。バックボーンとしてInvitrogen社 Gateway system Adenovirus vector を用いた。既存のベクターではなく、プロモーターとして最も強力なCAGプロモーターをもち、マルチクローニングサイトの下流にIRES-GFPカセットを組み込んだオリジナルベクターを作成した。このベクターのメリットはGFPが組み込まれていることにより、ウイルスのタイターチェックが容易に行える点にある。attR1, R2

サイトをもつAdenovirus vectorにはLR反応で容易かつ迅速にクローニングできるので多数のベクター構築が容易となる。

(下図は機能未同定の異なる遺伝子を発現するアデノウイルスを作成し、それを細胞に感染させた写真を示す。下段がGFPの発現)



ウイルスベクターをヒト293細胞にトランスフェクションさせてウイルス粒子を産出させるが、ベクターに目的遺伝子を組み込んで以降のウイルス作成の際いくつかの問題が生じた。

GFPをモニターとして293細胞にトランスフェクションして効率を評価するが、効率に問題なくともその細胞培養上清中に、感染効率の高いウイルス粒子がほとんど存在しない場合がいくつかの遺伝子によって見られた。またGFPを指標としてウイルス粒子を確認したものの、目的とする遺伝子の発現が極めて低い遺伝子も見られた。

前者については、クローニングした遺伝子が293細胞に対して何らかの影響をおよぼす可能性が考えられる。後者については、目的とする遺伝子の配列一部欠失の可能性を考えたが、配列を確認したところそのような欠失は認められず、原因は不明であった。

(3) 一部の遺伝子については、レトロウイルスベクターに組み込んだ。すなわち、北村らが開発したレトロウイルスベクターpMys vectorを用い、そこに候補遺伝子の全長を組み込んだ。一方で、発現抑制を行うものについては、siRNAを作成した。それらをマウス胎生10日齢、11日齢の肢芽間葉系細胞、胎生18日齢頭蓋骨由来骨芽細胞に感染、あるいは遺伝子導入し、効果を解析した。

(4) 2つの機能分子NLK、PRDCが骨格原基に発現し、機能することを見いだした。

レトロウイルスを用いた強制発現、siRNAを用いた実験で骨格系細胞の分化初期に発現するNLKが、初期の分化過程に対して抑制的に働くことを見いだした。一方PRDCは骨格系細胞の分化初期に発現し、BMPに対して抑制的に働くことを見いだした。PRDCを発現させたアデノウイルスでは骨格系細胞の後期分化を顕著に抑制し、一方でそれらの発現抑制によ

って逆に分化を促進した。さらに別の転写因子はアデノウイルスの作成を行いマウス胎生10日齢、11日齢の肢芽間葉系細胞に感染させたところ、骨格原基の細胞凝集形成を有意に促進した。引き続いてそれらのvivoでの機能を解析している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

① Nifuji A, Ideno H, Ohyama Y, Takanabe R, Araki R, Abe M, Noda M, Shibuya H. Nemo-like kinase (NLK) expression in osteoblastic cells and suppression of osteoblastic differentiation.

**Exp Cell Res.** 査読有,2010;316(7):1127-36.

② Ideno H, Takanabe R, Shimada A, Imaizumi K, Araki R, Abe M, Nifuji A.

Protein related to DAN and cerberus (PRDC) inhibits osteoblastic differentiation and its suppression promotes osteogenesis in vitro.

**Exp Cell Res.** 査読有 2009 ;315(3):474-84.

③ Shimada A, Shibata T, Komatsu K, Nifuji A.

Improved methods for immunohistochemical detection of BrdU in hard tissue

**Journal of Immunological Methods** 査読有 2008 339(1):11-6.

④ Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Shimoda S, Oida S, Kawasaki K, Nifuji A.

Long-term effects of local pretreatment with alendronate on healing of replanted rat teeth

**J Periodont Res.** 査読有2008 43(2):194-200.

⑤ Hino K, Nakamoto T, Nifuji A, Morinobu M, Yamamoto H, Ezura Y, Noda M.

Deficiency of Clz, a nucleocytoplasmic shuttling protein, prevents unloading-induced bone loss through the enhancement of osteoblastic bone formation in vivo.

**Bone** 査読有 2007, 40(4):852-60.

⑥ Shimoyama A, Wada M, Ikeda F, Hata K, Matsubara T, Nifuji A, Noda M, Amano K, Yamaguchi A, Nishimura R, Yoneda T.

Ihh/Gli2 Signaling Promotes Osteoblast Differentiation by Regulating Runx2 Expression and Function.

**Mol Biol Cell.** 査読有 2007 18(7):2411-8.

⑦ Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt DT, Nifuji A, Ezura Y, Noda M.

Osteopontin is required for mechanical stress-dependent signals to bone marrow cells.

**J Endocrinology** 査読有 2007 193(2):235-43.

⑧ Kanda T, Yoshida Y, Izu Y, Nifuji A, Ezura Y, Nakashima K, Noda M.

PlexinD1 deficiency induces defects in axial skeletal morphogenesis.

**J Cell Biochem.** 査読有2007, 101(6):1329-37.

[学会発表] (計14件)

① 出野 尚、荒木良子、今泉和彦、安倍真澄、二藤 彰

The BMP antagonist PRDC promotes ALP activity in the absence of BMP

第32回 日本分子生物学会 横浜 2009年12月9-12日

② Akira Nifuji, Hisashi Ideno, Ryoko Araki, Masumi Abe

Coordinate expression of multiple transcripts containing fragments of Line-1 retrotransposons during skeletal cell differentiation

The 31st meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Denver Co, 2009年9月11-15日

③ BMP antagonist PRDC の発現抑制による骨形成の促進

出野 尚、荒木良子、今泉和彦、安倍真澄、二藤 彰

第 64 回体力医学会、新潟、2009 年 9 月 18～20 日

④骨再生を目的としたプラスミド DNA による in vivo 遺伝子導入のためのキャリアーの検討

柴田達也、島田明美、出野 尚、田畑泰彦、二藤 彰

第 27 回骨代謝学会、大阪、2009 年 7 月 23-25 日

⑤骨芽細胞分化の抑制・促進双方に働く BMP antagonist PRDC の機能

出野 尚、荒木 良子、安倍 真澄、二藤 彰  
第 27 回骨代謝学会、大阪、2009 年 7 月 23-25 日

⑥骨芽細胞の生存と分化に及ぼすアレンドロネートの影響は分化段階により異なる

小松浩一郎、島田明美、柴田達也、二藤 彰  
第 27 回骨代謝学会、大阪、2009 年 7 月 23-25 日

⑦柴田達也、島田明美、出野 尚、田畑泰彦、二藤 彰

生体吸収性材料と BMP-2 プラスミド DNA の組合せによる頭蓋骨欠損修復の試み  
第 8 回日本再生医療学会総会、東京国際フォーラム、東京、2009 年 3 月 5-6 日

⑧島田 明美、柴田 達也、小松 浩一郎、二藤 彰、硬組織における BrdU 免疫組織化学の高感度化。第 26 回日本骨代謝学会、大阪、2008 年 10 月 29 日

⑨柴田達也、島田明美、出野 尚、田畑泰彦、二藤 彰

プラスミド DNA 遺伝子導入による骨再生の試み

第 26 回日本骨代謝学会、大阪、2008 年 10 月 29-31 日

⑩再植歯周囲の骨リモデリングに及ぼす局所適用アレンドロネートの影響

小松浩一郎、島田明美、柴田達也、二藤 彰  
第 26 回日本骨代謝学会、大阪、2008 年 10 月 29 日

⑪Nifuji A, Ideno H, Takanabe R, Shimada A, Araki R, Abe M

Protein Related to DAN and Cerberus (PRDC) is expressed in skeletogenesis and prevents osteoblastic differentiation

The 29th meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Honolulu, Hawaii, 2007 年 9 月 16-19 日

⑫島田明美、柴田達也、小松浩一郎、二藤彰。硬組織における BrdU 免疫組織化学の最適化。第 49 回歯科基礎医学会学術大会、札幌、2007 年 8 月 31 日

⑬アレンドロネート局所適用した再植歯周囲の骨密度と細胞増殖。

小松浩一郎、島田明美、柴田達也、二藤 彰 : 第 49 回歯科基礎医学会学術大会、札幌、2007 年 8 月 30 日

⑭出野 尚、高鍋 利依子、荒木 良子、安倍真澄、二藤 彰

BMP 抑制分子 PRDC の骨芽細胞分化における発現、制御とその機能

第 25 回日本骨代謝学会、大阪、2007 年 7 月 19-21 日

〔図書〕 (計 1 件)

①二藤彰、浜田節男、坂上宏、李昌一、学建書院、解る薬理学、2008、343

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二藤 彰 (NIFUJI AKIRA)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 00240747

(2) 研究分担者

柴田 達也 (SHIBATA TATSUYA)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号 : 90323708

(3) 連携研究者

荒木 良子 (ARAKI RYOKO)

放射線医学総合研究所・重粒子医科学セ  
ンター・チームリーダー  
研究者番号：40392211