

平成21年 4月 30日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007-2008 年
 課題番号：19791050
 研究課題名 (和文) 成長軟骨細胞分泌性蛋白質因子による軟骨細胞分化調節機構の解明
 研究課題名 (英文) Regulation of growth-plate chondrocyte differentiation by self-produced secreted proteins
 研究代表者
 日高 聖 (KIYOSHI HIDAKA)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：10389421

研究成果の概要：

軟骨細胞の分化調節メカニズムへの理解を深めるため、分化を調節する分泌性蛋白質因子に焦点を当て、その同定・解析を試みた。その結果、SST-REX 法によって 313 クローンを単離し、70 種以上の分泌性蛋白質因子を同定した。これらの分子群の中から、特に候補因子として Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) に注目し、この分子が特定の軟骨細胞分化段階にのみ発現していることを突き止めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：軟骨細胞・軟骨細胞分化・成長軟骨・分泌蛋白質・SST-REX 法

1. 研究開始当初の背景

軟骨細胞の分化は、内軟骨性骨形成として長管骨骨端部成長板軟骨の石灰化前線で行われ、長軸方向への骨の伸長にあずかる生理現象である。慢性関節リウマチや変形性関節症に代表される軟骨疾患の罹患者は人口の約 1% にも及ぶにもかかわらず、軟

骨細胞についての理解は効果的な医療を生み出すまでに至っていない背景があった。したがって軟骨細胞の分化調節メカニズムを知ることは、生物学的意義はもとより外科臨床的にも重要であり、組織工学・再生医工学への発展が期待されるものである。内軟骨性骨形成には、骨芽細胞分化と協調

した軟骨細胞の増殖・分化・アポトーシスの精密な制御機構が必要である。その一端として、Runx2, 3 と Ihh, PTHrP のシグナルループによる調節機構が次第に明らかになりつつあった (Long et al, *Development* 131, 1309-1318, 2004, Komori T, *J Cell Biochem* 95, 445-453, 2005)。一方で、他にも数多くの因子がその調節に寄与しており、個々の因子の位置づけとその調節メカニズムを解明していくことが重要な課題であった。

2. 研究の目的

成長軟骨とは ①それを形成する軟骨細胞がそれぞれ分化しているものの単一の細胞群からなる組織である。②細胞外基質に富むため周囲組織や血流からのホルモン等による信号を軟骨細胞は受け取りづらい環境にある。という2つの理由から、分化過程の軟骨細胞自身が産生・分泌する分泌性蛋白質因子の中に、より直接的かつ重要な分化調節をつかさどる因子が存在し、Paracrine または Autocrine 機構を介して軟骨細胞の分化が制御されているのではないかと筆者は考えた。この仮説を踏まえて、成長軟骨細胞が細胞外へ放出する分泌性蛋白質因子に限局して、軟骨細胞分化を調節する鍵となる因子の同定を試みるべく本研究を設計した。

具体的手法として、分泌型蛋白質のスクリーニング法として極めて有効な手法である SST-REX 法 (Signal Sequence Trap based on Retroviral Expression) を応用し、軟骨細胞分化にあずかる分泌性蛋白質因子の網羅的な同定に取り組むこととした。さらに、*in vivo*・*in vitro* の両面から評価を加え、軟骨細胞の分化調節メカニズムにあずかる新しい知見を得ることを目的とし、以下の実験に取り組むこととした。

- (1) 成長軟骨細胞分泌性蛋白質因子の同定 (SST-REX法)
- (2) 得られた候補因子の *in vivo* での発現

評価

- (3) 軟骨前駆細胞株 ATDC5 (*in vitro* 分化モデル) を用いた発現評価

つまり、SST-REX 法によって成長軟骨細胞からの分泌性蛋白質因子を同定し [実験(1)]、得られた候補因子の *in vivo* での発現分布や組織形成時の経時的発現を詳細に評価する [実験(2)]。同時に軟骨細胞分化モデル ATDC5 を用いた発現評価を加えることによって [実験(3)]、候補因子の成長軟骨での挙動を詳細に明らかにすることを目的とする。

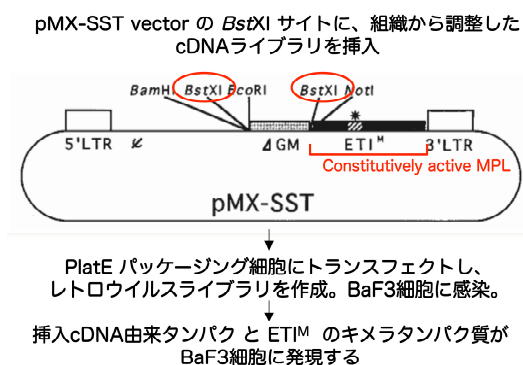
3. 研究の方法

- (1) 成長軟骨細胞分泌性蛋白質因子の同定

SST-REX 法は、N末端にシグナル配列を有する分子のみを単離できるスクリーニング法である。また、IL-3 非存在下での BaF3 細胞の growth という極めてシンプルなアッセイ系により評価できるため、分泌型蛋白質のスクリーニング法として極めて有効な手法である。具体的には以下の手順で行う。

- ① レトロウイルスライブラリの作製

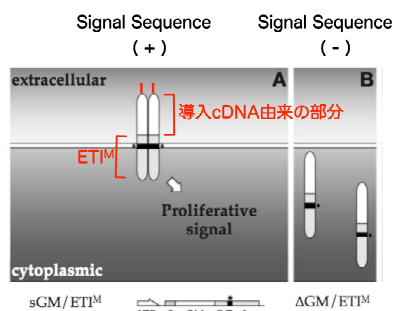
2週齢 C57BL6/J マウスの肋軟骨成長軟骨より poly(A)⁺RNA を調製し、逆転写により得られた cDNA を pMX-SST ベクターの *Bst*XI サイトにサブクローンして成長軟骨 cDNA ライブラリを作製した。これを PlatE パッケージング細胞に導入し、レトロウイルスライブラリを得た (図1)。



【図1】

② BaF3 細胞への感染、growth の評価

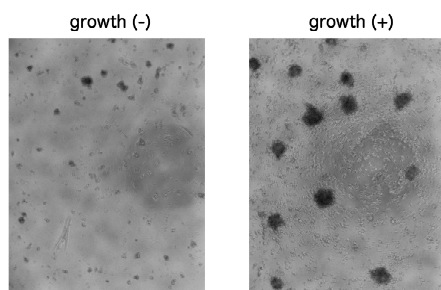
①で得られたレトロウイルスライブラリを BaF3 細胞に感染させた。この BaF3 細胞は、本来 IL-3 の存在下のみで増殖するが、導入 cDNA 由来のキメラ蛋白質がN末端にシグナル配列を有すると、増殖シグナルが持続的に活性化され IL-3 非存在下でも増殖する (図 2)。



レトロウイルスによって導入された cDNA にシグナル配列があると、(A) のような状態となり、IL-3 の非存在下で BaF3 細胞が増殖する。

【図 2】

この IL-3 非存在下で増殖する細胞株を単離・継代した (図 3)。



GrowthがみられたBaF3細胞よりGenomic DNAを調製し、PCRにより Signal sequence (+) cDNAを得る。Sequencingにより、Signal Sequence (+) タンパク質を同定。

【図 3】

③ 導入 cDNA の増幅とシークエンス

②で得られた BaF3 細胞から Genomic DNA を調製し (増幅不可能な場合には mRNA を調製)、導入されている cDNA を PCR 法により増幅した。この PCR 産物の DNA 塩基配列をシークエンスし、相同性検索を行って肋軟骨成長軟骨細胞で産生・分泌されている蛋白質群を同定した (Table 1,2)。

(2) *in vivo* での発現評価

(1)で新たに得られた候補因子の中から Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) に注目し、成長軟骨での発現を、マウス脛骨骨端成長軟骨から作製した組織切片を用いて、*in situ* ハイブリダイゼーション解析により詳細に評価した。解析を行う対象は分泌性蛋白質因子であるため、産生している細胞の *in vivo* での検出には *in situ* ハイブリダイゼーション法が効果的である。また、抗 IGFBP5 抗体を購入し、免疫組織染色法による検出を同時に行った。

(3) 軟骨細胞分化モデル ATDC5 細胞を用いた発現評価

ATDC5 細胞はインスリン刺激によって線維芽細胞様の形態から軟骨細胞へと分化する軟骨細胞分化モデル細胞株である。分化誘導した各段階の ATDC5 細胞から total RNA を調製し、半定量的 RT-PCR 解析にて、IGFBP5 の各分化過程での経時的発現を評価した。

4. 研究成果

(1) 成長軟骨細胞分泌性蛋白質因子の同定

本スクリーニング法によって、前述のような IL-3 非存在下で増殖する、つまりシグナル配列を含む cDNA が導入された BaF3 細胞のコロニーを 749 株採取した。そのうち、149 株は続く継代に耐えられず、cDNA の増幅が不可能であった。

Screening of signal sequence-positive genes in mouse growth plate chondrocytes by SST-REX

Colony picked up	749
- No growth	149
- type 1 alpha 2 chain	193
- type 2 alpha 1 chain	82
- Unable to sequence	12
Sequenced samples	313

【Table 1】

また、mRNA ライブラリはマウスの肋軟骨から調製していたため、この中には type 1 や type 2 collagen の mRNA が多く含まれることが予想された。そこで、あらかじめ設計していた primer set を用いて PCR 法で増幅したところ、193 株の type 1 $\alpha 2$ chain と 82 株の type 2 $\alpha 1$ chain が検出された。これらを除外してシークエンスを行った結果、12 株は解読不可能であったため、結局塩基配列を決定できたのは 313 株であった (Table 1)。

これらの配列をもとに相同性検索を行った結果、下記に示すように 70 種以上のシグナル配列を有する蛋白質を同定した (Table 2)。中には、分泌型蛋白質ではないがシグナル配列を含む、したがって本スクリーニング法で陽性として検出された膜蛋白質も含まれていた (Table 2)。

clones	seq#	locus	description
47			procollagen, type I, alpha 1
193+29			procollagen, type I, alpha 2
62+13			procollagen, type II, alpha 1
40			procollagen, type III, alpha 1
7			procollagen, type IV, alpha 1
3			procollagen, type IV, alpha 2
5			procollagen, type V, alpha 3
1			procollagen, type VI, alpha 2
1			procollagen, type VII, alpha 3
3	NM 009828		procollagen, type XIV
5	NM 008788		procollagen C-endoglycosidase enhancer protein (Protein)
1	MJ26PERMA		perlecan (heparan sulfate proteoglycan 2)
23	AF131708		osteopontin
22	NM 175047		osteocalcin (OC)
19			osteoposin
14	NM 007992		osteonin (OPN)
8	170	NM 010516	osteonin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)
6	NM 181728		ADP-ribosyltransferase 3 (ART3)
5	114	NM 010097	SPARC-like 1 (SPARC1, hevin) (SPARC1)
1			extracellular matrix associated protein (SEI1)
4	194	NM 008175	osteonin (OSN)
4	198	NM 020486	basal cell adhesion molecule (Bcam)
1			luteal phase glycoprotein (LpG1)
3	80	NM 024263	matrix remodeling associated 6 (Mras6)
1			asp3 mRNA for adipocyte-specific protein 3 (ADSP3)
2	10,13		PRKDC1ED, similar to hemolysin 1 (LOC222345)
2	81,131	NM 022023	glia maturation factor beta (Gmfb)
2	102,168	BC115436	RKLN cDNA 493429/98 gene
1			Mouse 2B5 ribosomal RNA 1
2	104,199	NM 009278	trypsinogen (Tryp)
2	116,290	NM 019707	cadherin 13 (CDH13)
2	150,178	NM 008304	synovectin 2 (Syn2)
2	166,185	AK024488	unclassified
1			XMR 980398
2	226,314	NM 008695	inducible 2 (Ind2)
2	260,302	NM 009242	secreted acidic cysteine rich glycoprotein (Sacr)
1	12	NM 392089	PRKDC1ED, bromodomain and PHD finger containing, 3, transcript variant 5 (Bprf3)
1	16	NM 013299	matrix metalloproteinase 9 (Mmp9)
1	26	NM 391940	PRKDC1ED, human C-gamma actin binding protein 290)
1	36	AK014281	clone 31193/93 product hypothetical protein
1	45	NM 008925	protein kinase C substrate BOK-1
1	49	BC043026	adipase 1, A isoform (muscle form)
1	57	AK020398	hypothetical basic protein 179 homolog (BC059873)
1	59	NM 008610	matrix metalloproteinase 2 (Mmp2)
1	65	NM 022310	heat shock 70kD protein 4 (glucose regulated protein)(Hspa4)
1	66	AF176841	hypothetical transcription activator 1-like protein containing protein (NM_287217)
1	86	NM 008555	mannan-binding lectin serine peptidase 1 (Masp1)
1	87	NM 146120	zelectin (Zec)
1	97	MIM487953	agrin receptor (Agr2)
1	115	NM 088092	melastatin 1 (Mst1)
1	117	NM 013488	CD4 antigen (CD4)
1	120		unknown
1	130	NM 00104489	mink fat obesity-EGF factor 8 protein (Mfat8)
1	136	AF127609	fibroblast growth factor receptor 5 (FGFR5)
1	169	NM 133963	glycine adhesion (Gad7)
1	177	NM 015784	perlecan, osteoblast specific factor (Postr)
1	191	NM 009605	adiponectin, C1Q and collagen domain containing (Adipo1)
1	200	AF197930	Fc gamma receptor III (Fcgr3)
1	235	NM 139134	chondlectin (Chod)
1	245	NM 013493	cellular matrix acid binding protein (Cmabp)
1	246	NM 019442	fibronectin 1 (Fbn1)
1	270	NM 011652	stin (Tn), transcript variant N2-A (AF100271)
1	276	AK019278	aglycid similar to ELMARKYDING TRANSLOCATION INITIATION FACTOR 3, SUBUNIT 1 (ALPNA_390K)
1	280	AK100645	putative nuclear corepressor initiation factor 3 subunit (nfc-3) (Fragrant) homolog
1	281	NM 007607	carbonic anhydrase 4 (Car4)
1	289	NM 010612	kinase insert domain protein receptor (Kidp)
1	293	AK03103	NYKFLK1 = platelet-derived growth factor receptor related tyrosine kinase 1
1	299	NM 007471	osteoblast matrix (OB) precursor protein (Obsp)
1	299	NM 016779	derlin matrix protein 1 (Dm1)
1	299	AK167973	Derlin matrix acidic phosphoprotein 1 precursor (Derlin matrix protein 1) (DMP-1)(AG1) homolog 1
1	307	NM 207655	epidermal growth factor receptor (Egfr)

[Table 2]

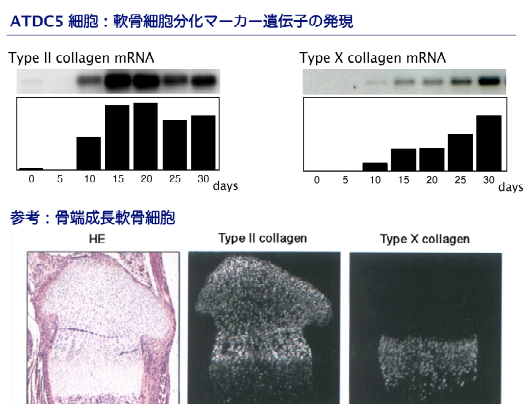
(2) *in vivo* での発現評価

(1) で得られた候補因子の中でも、軟骨組織に限らず骨や歯牙といった硬組織形成との関連が示されており、本研究の目的である軟骨細胞の分化メカニズムに寄与する可能性が高いと思われる Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) 分子に注目した。Santa Cruz Biotechnology 社より特異的抗体を購入し、免疫組織学的染色を行ったところ、マウス脛骨骨端成長軟骨において IGFBP5 蛋白質が増殖軟骨細胞層に特異的に発現していることが明らかとなった (data not shown)。*in situ* ハイブリダイゼーション法による解析と合わせて、現在さらなる詳細な解析を継続中である。

(3) 軟骨細胞分化モデル ATDC5 細胞を用いた発現評価

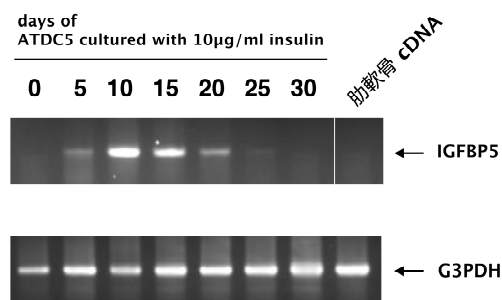
ATDC5 細胞は、マウス胎性腫瘍由来細胞株 AT805 より軟骨前駆細胞としての性質を保持している細胞としてクローニングされた細胞株である。10 $\mu\text{g/ml}$ のインスリン存在下で培養すると、高率に軟骨分化が誘導される。ATDC5 細胞は、通常の継代時には線維芽細胞様の形態を呈して旺盛に増殖するが、コンフルエントに達すると接触阻害により増殖を停止する。しかし、インスリン存在下で培養と、コンフルエント後に特有の細胞凝集領域が出現し、この領域から軟骨細胞が出現して、ついには培養皿全面にアルシアンブルーにより染色される多数の軟骨結節が形成されるようになる。ATDC5 細胞は通常の継代時には I 型コラーゲン遺伝子を発現しており、II 型コラーゲン遺伝子は発現していない。しかし軟骨結節の形成と平行して、軟骨細胞分化マーカー遺伝子の一つである II 型コラーゲン遺伝子の発現が認められ、さらに肥大軟骨細胞へと分化して X 型コラーゲンを発現するようになり、ついには石灰化する。すなわち、ATDC5 細胞によって骨形成においてみられ

る軟骨細胞の分化の全ての段階をシミュレートすることができるモデルとして有効である (図 4)。



【図 4】

この ATDC5 細胞を用いて、各培養段階の細胞から total RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR 法により IGFBP5 の発現を評価したところ、分化誘導以前はほとんど認められなかったものが (図 5 day 0)、培養後 10-15 日目をピークとして発現が上昇していることが明らかとなった (図 5)。



【図 5】

これは骨端成長軟骨の増殖細胞層に相当する分化段階で発現が上昇していることを示しており、(2)で得られた *in vivo* での発現と同じ結果を示すものであった。

以上の結果について、現在論文発表のための原稿を執筆中である。また、精製 IGFBP5

リコンビナント蛋白質を調製し、種々の濃度で培地に直接添加して、その分化におよぼす影響を現在検定しているところである。その際、ATDC5 細胞の分化過程の中で IGFBP5 蛋白質の添加/不添加条件を変化させ、分化過程における経時的な機能解析を試みている。その結果、(2)で得られた *in vivo* で発現分布との詳細な対比較が可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1. Koshita M, Hidaka K, Ueno H, Yamamoto Y, Sukuki H Properties of acetylcholine-induced hyperpolarization in smooth muscle cells of the mouse mesenteric artery *J Smooth Muscle Res* 43(6):219-227, 2007 (査読・有)

〔学会発表〕 (計 6 件)

1. 佐々木康成、釜崎陽子、日高 聖、藤原卓「合併症を有するダウン症患者における出生後早期の歯科的管理の一例」第 26 回日本小児歯科学会九州地方会大会および総会、沖縄市、2008.11.23
2. 日高 聖、佐々木康成、釜崎陽子、西口美由季、久保田香代子、藤原卓「院内連携による生後 8 か月健診を通じた早期からの歯科的管理の取り組み」第 46 回日本小児歯科学会大会、さいたま市、2008.6.12-13
3. 釜崎陽子、日高 聖、西口美由季、久保田一見、藤原卓「Hyper-IgE 症候群の一例について」第 46 回日本小児歯科学会大会、さいたま市、2008.6.12-13
4. 星野倫範、久保田一見、釜崎陽子、西口美由季、齋藤幹、佐藤恭子、日高 聖、小西郁理、近藤好夫、佐々木康成、細矢由美子、藤原卓「過去三年間の全身麻酔下歯科治療の動向調査」第 46 回日本小児歯科学会大会、さいたま市、2008.6.12-13

5. Kiyoshi Hidaka, Taku Fujiwara
Angiopoietin/Tie2 signaling-dependent
formation of vasculogenic mimicry and
tumor growth of N417 human lung
cancer cells 第49回歯科基礎医学会
学術大会ならびに総会、札幌市、
2007.8.30-31
6. Kiyoshi Hidaka, Song-Ju Yang, Hikaru
Ueno Angiopoietin/Tie2
signaling-dependent vascular-like
formation and tumor growth The 5th
Korea-Japan Conference on Cellular
Signaling for Young Scientists, Gyeongju,
Korea, 2007.7.9-11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日高 聖 (KIYOSHI HIDAKA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10389421

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし