

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592333

研究課題名（和文） 骨形成におけるシスタチンCと結合タンパクの相互作用と機能解析

研究課題名（英文） Screening of Cystatin C binding protein and effect on osteoblasts

研究代表者

山座 孝義（Yamaza, Takayoshi）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：80304814

研究成果の概要（和文）：

Cystatin Cは分子量11kDaの非糖鎖性の一本鎖のポリペプチドで、全身の有核細胞で産生され、細胞外に分泌されるシスタチンCは、唾液や乳汁、尿、脳脊髄液に多く分布しており、生体内でのシステインプロテアーゼの活性を調節することで知られている。私たちはCystatin Cが骨芽細胞に作用し、硬組織形成を促進することを見出したことから、そのメカニズム解明のためにCystatin C結合タンパクを酵母Two-hybrid系でスクリーニングし、その候補としてS100Bとの相互作用を見出した。本研究ではCystatin CとS100Bとの結合の特異性の確認、さらに結合へのカルシウム依存性、結合部位を確認した。

研究成果の概要（英文）：

Cystatin C is a natural cysteine proteinase inhibitor that expresses ubiquitously in the body. It is secreted into the extracellular space and is abundant in cerebrospinal fluid, saliva, and milk. We previously found that Cystatin C stimulates the differentiation of osteoblasts, and induces mineralization and bone formation. To elucidate this mechanism, we used yeast two-hybrid screening to identify the interacting protein with Cystatin C. S100B was one of the candidate proteins which exhibited strong binding in the system. We confirmed the specificity of interaction of Cystatin C and S100B in the brain and bones by co-immunoprecipitation assay and yeast two-hybrid analysis. We found that the binding is dependent on calcium concentration and the c-terminal of Cystatin C is the necessary site for the binding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：Cystatin C, マウス、骨、Yeast Two hybrid

1. 研究開始当初の背景

シスタチンCは、分子量 11kDa の非糖鎖性の一本鎖のポリペプチドで、タンパク分解酵素であるシステインプロテアーゼインヒビターの一つとして知られている。細胞外に分泌されるシスタチンCは、唾液や乳汁・尿・脳脊髄液にも多く含まれている。近年、シスタチンCがES細胞から神経幹細胞への分化を促進することや、海馬の細胞の増殖因子として働くとの報告もある。骨については、シスタチンCが破骨細胞の骨吸収能を抑制することや、破骨細胞の分化を抑制すること、骨芽細胞様細胞の MC3T3-E1 細胞において培養中期と後期でシスタチンCの mRNA が上昇することが報告されている。私たちは、シスタチンCが培養骨芽細胞の分化を促進し、骨形成マーカーの発現を上昇させることや、硬組織形成を促進することを発表している。そこでシスタチンCの作用機序を知ることを目的として結合タンパクの探索を行った。

2. 研究の目的

酵母 Two-hybrid システムでシスタチンCと結合候補タンパクとして見出された S100B との相互作用はシスタチンCに特異的なものであるのかを明らかにする。さらに、in vivo での骨における発現と相互作用を調べる。また S100B とシスタチンCとの結合部位を同定する。

3. 研究の方法

マウスのシスタチンC全長 cDNA あるいはその deletion mutant を作製し、bait (釣

り餌) として用いた。

実験には Clontech 社の Matchmaker™ Two-Hybrid System を用いた。Bait コンストラクトは、pLexA Vector に EcoRI と XhoI の制限酵素サイトを用いて subcloning した。その後 DNA シーケンスにより塩基配列が設計どおりであることを確認した。GAL4 転写活性化領域をコードするベクター pB42AD に S100B をクローニングした。そしてあらかじめ pLacZ により形質転換をさせた酵母株 EGY48 に pLexA と pB42AD を導入してアミノ酸選択培地で培養を行った。

シスタチンCの deletion mutant と CST 融合タンパクの発現ベクターも作製し、プルダウンアッセイにより S100B との相互作用に必要な部位を同定した。

S100B はカルシウム結合タンパクであることが知られていることから、結合アッセイをカルシウム存在下あるいは非存在下で行った。

培養骨芽細胞あるいは間葉系幹細胞へのシスタチンC添加による影響を調べるため、定量的 PCR を行い、骨形成マーカーの発現レベルを比較した。

4. 研究成果

シスタチンCと S100B の結合は in vivo 環境下においても確認できた。さらに、その結合にはシスタチンCのC末端が必須であることがわかった。またシスタチンスーパーファミリーの他のタンパクとは S100B は結合しなかった。

骨組織における S100B 蛋白の発現は脳組織に

比較すると少ないことやシスタチンCに結合する蛋白が他にもあることから、S100B 蛋白へ結合しているシスタチンCは容易に同定できたが、シスタチンCに結合するS100Bを同定するのは困難であった。S100Bがカルシウム結合蛋白であることから、相互作用におけるカルシウムなど2価イオンの存在の影響を比較した。そして、pull down assayにおいて、その結合にカルシウムの存在が必要であることが示唆された。

培養骨芽細胞あるいは間葉系幹細胞へのシスタチンC添加により、骨形成マーカーの変化を定量PCRにより検索し、Runx2(runt-related gene2), beta-catenin, アルカリフォスファターゼ, などの発現が上昇していることが確認された。

以上のことから、シスタチンCが生体内でもS100Bと結合している事が示唆され、その相互作用はカルシウム依存であることがわかった。それら相互作用が骨形成に与える影響については、今回の実験系では明らかには示すことができなかった。

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)

[学会発表] (計 件)
Characterization of stem cells isolated from cryopreserved exfoliated deciduous teeth
馬蘭、山座孝義、牧野友祐、山座治義、園田総一郎、増田啓太郎、久木田敏夫、野中和明
第53回歯科基礎医学会
2011年10月02日
岐阜

乳歯凍結保存法がヒト乳歯幹細胞の免疫調節能に与える影響について

山座孝義、牧野友祐、山座治義、馬蘭、園田総一郎、増田啓太郎、野中和明、久木田敏夫
第53回歯科基礎医学会

2011年10月02日

岐阜

ヒト過剰歯由来幹細胞の免疫細胞療法について

牧野友祐、山座孝義、山座治義、馬蘭、園田総一郎、城戸瑞穂、野中和明、寺田善博、久木田敏夫

第53回歯科基礎医学会

2011年10月02日

公開

岐阜

歯の幹細胞を応用した免疫細胞療法的再生医療

山座孝義

サテライトシンポジウム3 第53回歯科基礎医学会

2011年09月30日

岐阜

Influence of cryopreservation on the properties of stem cells isolated from cryopreserved exfoliated deciduous teeth

Lan Ma, Haruyoshi Yamaza, Yusuke Makino, Guangtai Song, Toshio Kukita, Kazuaki Nonaka, Takayoshi Yamaza

International Symposium Shaping the future of craniofacial sciences and therapeutics

2011年08月20日

Beijin, China

歯は幹細胞の隠れ家か？

山座孝義

大阪歯科大学 エンジョイミーティングの
会

2011年06月22日

大阪

Immunomodulatory Properties of Stem Cells
from Human Supernumerary Teeth.

Y. MAKINO, T. YAMAZA, H. YAMAZA, K. AKIYAMA,
M. KIDO, K. NONAKA, Y. TERADA, S. SHI, and
T. KUKITA.

89th IADR General Session & Exhibition of
IADR

2011年03月

San Diego, USA

歯の幹細胞の基礎と応用

山座孝義

平成22年度「歯学連携ネットワークを活用
した口腔からQOL向上を目指す研究」再生工
学カテゴリー第2回研究集会

2010年12月02日

広島

小児の上顎正中過剰埋伏歯の歯髓由来間葉
系幹細胞の単離とその免疫調節能の解析

牧野友祐、山座孝義、山座治義、城戸瑞穂、
野中和明、寺田善博、久木田敏夫

第52回歯科基礎医学会

2010年09月20日

東京

全身性エリトマトーデスに対する乳歯歯髓
幹細胞の再生医療学的応用

山座孝義、山座治義、牧野友祐、城戸瑞穂、
野中和明、久木田敏夫

第52回歯科基礎医学会

2010年09月

東京

Immunotherapy with stem cells isolated
from human baby teeth

Takayoshi Yamaza

The 21st Fukuoka International Symposium
On Pediatric/Maternal-Child Health
Research

2010年07月21日

Fukuoka, Japan

骨髄間葉系幹細胞によるニッチ構築と生体
制御

山座孝義

第115回日本解剖学会総会シンポジウム「顎
顔面発生研究の新規展開：若手研究者の発想
とねらい」

2010年03月30日

盛岡

Immunomodulatory Properties of Stem Cells
from Human Exfoliated Deciduous Teeth

Takayoshi Yamaza

The 5th International Symposium on "Dental
and Craniofacial Morphogenesis and Tissue
Regeneration; A View from Stem Cell
Research"

2010年02月05日

Fukuoka, Japan

Mouse Mandible Contains Distinctive
Mesenchymal Stem Cells

Takayoshi Yamaza, Haruyoshi Yamaza,
Guangwen Ren, Kentaro Akiyama, Chider Chen,
Yufeng Shi, Kazuaki Nonaka, Songtao Shi
The 32th Annual Meeting of Society of

Craniofacial Genetics, SCG Symposium Hot
Topic in the Topics, New Breakthroughs in
Craniofacial Genetics

2009年10月20日

Honolulu, USA

マウス顎骨由来間葉系幹細胞の単離と特性
解析

山座孝義, 山座治義, 野中和明, 城戸瑞穂

第51回歯科基礎医学会

2009年09月

新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山座孝義 (YAMAZA TAKAYOSHI)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号: 80304814

(2) 研究分担者

・城戸瑞穂 (KIDO MIZUHO)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号: 60253457

・渡邊敏之 (WATANABE TOSHIYUKI)

九州大学・歯学研究院・学術研究員

研究者番号: 70367522

・大崎康吉 (OSAKI YASUYOSHI)

九州大学・大学院・歯学研究院・講師

研究者番号: 70117076