

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 4月27日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21792086

研究課題名（和文）：成長軟骨細胞が産生する分泌性蛋白質および膜蛋白質による軟骨細胞分化機構の解明

研究課題名（英文）：Regulation of growth-plate chondrocyte differentiation by self-produced secreted and membrane proteins

研究代表者

日高 聖 (HIDAKA KIYOSHI)

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（和文）：

成長軟骨細胞自身が産生する分泌性蛋白質因子による分化調節メカニズムを解明するため、成長軟骨細胞が発現しているシグナル配列を有する蛋白質因子の網羅的同定・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、分泌性蛋白質因子IGFBP5 (Insulin-like growth factor binding protein 5) および膜蛋白質因子FGFR5 (Fibroblast growth factor receptor 5) に注目し、これら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。

研究成果の概要（英文）：

This is the study to screen proteins with signal sequence at their N-terminus produced by growth-plate chondrocytes to find key molecules to regulate chondrocyte differentiation by autocrine/paracrine mechanisms. More than 70 of secreted and membrane proteins were identified by SST-REX method. We focused on secreted protein IGFBP5 and membrane protein FGFR5, and found that these proteins were expressed at specific stage during the differentiation *in vivo* and *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

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

成長板軟骨とは 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、成長板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

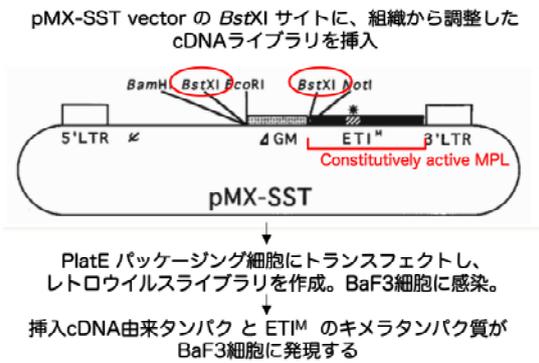
- (1) 成長軟骨細胞分泌性蛋白質因子の同定

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

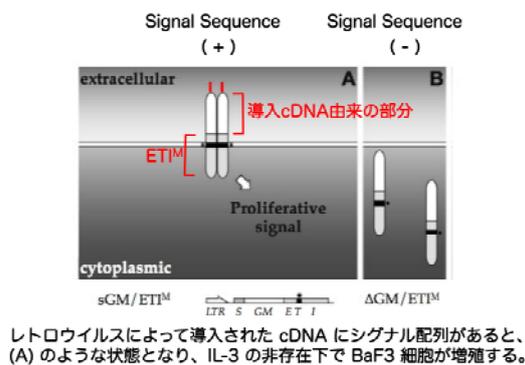
れたcDNAを pMX-SSTベクターのBstXIサイトにサブクローンして成長軟骨cDNAライブラリを作製した。これをPlatEパッケージング細胞に導入し、レトロウイルスライブラリを得た(図1)。



(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)。このIL-3非存在下で増殖する細胞株を単離・継代した。



(図2)

③ 導入cDNAの増幅とシーケンス

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塩基配列をシーケンスし、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、分泌性蛋白質因子IGFBP5および膜蛋白質因子FGFR5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。

(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およびFGFR5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、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。

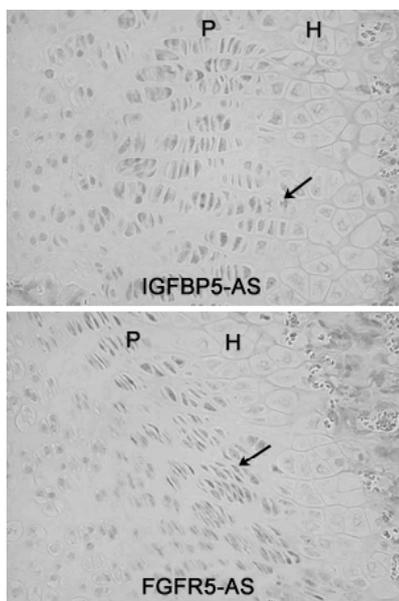
また、mRNAライブラリはマウスの肋軟骨から調製していたため、この中にはtype 1やtype 2 collagenのmRNAが多く含まれることが予想された。そこで、あらかじめ設計していたprimer setを用いてPCR法で増幅したところ、193株のtype 1 α2 chainと82株のtype 2 α1 chainが検出された。これらを除外

してシーケンスを行った結果、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。

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。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。

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分泌性蛋白質因子 Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) と、膜蛋白質因子 FGFR5 (Fibroblast growth factor receptor 5) に注目した。2週齢マウス脛骨骨端成長軟骨を試料として用いた *in situ* ハイブリダイゼーション解析によって、IGFBP5は増殖軟骨細胞 (P) に、またFGFR5は肥大軟骨細胞 (H) にそれぞれ特異的に発現していることを突き止めた (図3)。



(図3)

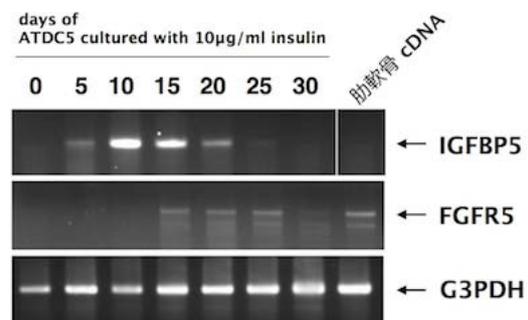
また、同様の組織切片を用いて免疫組織学

的染色を行ったところ、いずれの蛋白質発現も *in situ* ハイブリダイゼーション解析と同様の発現パターンを示していることが明らかとなった (data not shown)。

(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 µg/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。

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 および FGFR5 の発現を評価したところ、分化誘導以前の線維芽細胞様の状態ではほとんど認められなかったものが (図5 day 0)、IGFBP5は培養10-15日目を、FGFR5は培養15-25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4)。



(図4)

これは、それぞれ骨端成長軟骨の増殖細胞層 (培養10-15日)・肥大軟骨細胞層 (培養20-25日)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* での発現解析と同じ結果を示すものであった。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kamasaki Y, Hidaka K, Nishiguchi M, Fujiwara T Dental management of a pediatric patient with hyperimmunoglobulin E syndrome: A case report. *J Dent for Children*, 2012, in press
2. Sasaki Y, Kamasaki Y, Hidaka K, Fujiwara T Promotion of growth and development in a Down syndrome infant with complications. *Pediatr Int*, 52: 653-656, 2010
3. 日高 聖「低位乳歯に伴う埋伏上顎小臼歯を牽引した症例」日本歯科評論 70(9), 75-82, 2010
4. 日高 聖、藤原 卓「外傷歯の処置と予防について」デンタルダイヤモンド 35(11), 58-63, 2010
5. Hasuwa T, Hidaka K, Yanagihara K, Ohkusu K Two cases of infective endocarditis confirming the importance of oral care and hygiene. *Nagasaki Igakkai Zasshi* 84:32-36, 2009

[学会発表] (計 14 件)

1. 西口美由季、釜崎陽子、佐藤恭子、星野倫範、日高 聖、藤原 卓「先天性胆道閉鎖症術後患者に多数の埋伏過剰歯が認められた 1 例」第 49 回日本小児歯科学会大会、岩手県盛岡市、2011.11
2. 日高 聖「歯科外傷データベースの構築 ～虐待発見への応用をめざして」シンポジウム・子どもの事故と小児歯科、第 29 回小児歯科学会九州地方会大会、福岡県北九州市 2011.10
3. 飯島静子、藤村裕治、吉松昌子、日高 聖、藤原 卓、吉田教明、平野明喜「長崎大学病院矯正歯科における口唇裂、口蓋裂患者の実態調査」第 35 回日本口蓋裂学会総

会・学術集会、新潟県新潟市、2011.5

4. 細矢由美子、日高 聖、藤原 卓「歯質を変色させない乳歯齲蝕進行抑制法の開発 (第一報)」平成 22 年度日本小児歯科学会秋季大会、福島県郡山市、2010.12
5. 日高 聖、藤原 卓「口唇口蓋裂児に対する集学的治療と歯科的管理」2010 年度長崎小児歯科臨床医学会年次集会、長崎市、2010.9
6. 日高 聖、西口美由季、釜崎陽子、佐々木康成、藤原 卓「小児白血病加療中に多発性う蝕を呈したペットボトル症候群の一例」第 48 回日本小児歯科学会大会、名古屋市、2010.5
7. 釜崎陽子、西口美由季、日高 聖、佐々木康成、久保田香代子、藤原卓「生後 8 か月健診を通じた早期からの小児歯科的管理について (第 2 報)」第 48 回日本小児歯科学会大会、名古屋市、2010.5
8. 西口美由季、佐藤恭子、日高 聖、釜崎陽子、星野倫範、藤原 卓「頭蓋骨硬化症を伴う線条骨症 Osteopathia striata with cranial sclerosis の一例」第 48 回日本小児歯科学会大会、名古屋市、2010.5
9. 日高 聖「安全知識循環型社会構築のための歯科外傷サーベイランス」成育歯科医療研究会第 13 回徹底討論会、神戸市、2010.2
10. 日高 聖、佐々木康成、小西郁理、藤原 卓「島原養護学校における歯科保健活動の取り組みと成果」第 27 回日本小児歯科学会九州地方会大会および総会、北九州市、2009.11
11. 小西郁理、近藤好夫、斎藤 幹、佐藤恭子、日高 聖、西口美由季、釜崎陽子、佐々木康成、星野倫範、細矢由美子、藤原 卓「歯の衛生週間イベント RD テストによるカリエスリスク調査」第 27 回日本小児歯科学会九州地方会大会およ

- び総会、北九州市、2009.11
12. 日高 聖、福田英輝、西田佳史、本村陽一、山中龍宏、藤原 卓「安全知識循環型社会構築のための歯科外傷サーベイランス」2009年度長崎小児歯科臨床医会年次集会、長崎市、2009.9
13. 日高 聖、佐々木康成、飯島静子、芝崎龍典、吉田教明、藤原 卓、平野明喜「口唇口蓋裂に対するPNAM治療の効果および予後についての研究」第33回日本口蓋裂学会総会・学術集会、東京、2009.5
14. 西口美由季、佐藤恭子、釜崎陽子、星野倫範、日高 聖、藤原 卓「乳歯過剰歯と永久歯の発育異常を有した1例」小児歯科学雑誌47(2):304、第47回日本小児歯科学会大会、大阪、2009.5.14

〔図書〕(計1件)

1. 加藤有三、吉田教明、日高 聖 ら著者計20名「Dental Chairside Communication in English and Japanese」医歯薬出版、pp. 52-59, 2011

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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

山本雅哉 (MASAYA YAMAMOTO)

福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20446115