

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22592038

研究課題名(和文)骨形成過程での細胞外基質の高次立体構造の変化とサイトカインを介した制御機構の解明

研究課題名(英文)Relationship of ECM superstructure and cytokine in the osteogenesis

研究代表者

河井 まりこ(Kawai, Mariko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40379839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外基質の高次立体構造の変化により、その生理的活性が調整される。今回、われわれは細胞外基質であり、基底膜の構成成分であるラミニンの高次立体構造の変化による骨形成過程での制御機構について、その解析を行った。まず、ラミニンの高次立体構造の変化を感受するモノクローナル抗体を作成した。次に細胞レベルにてラミニンの高次立体変化特異的抗体を添加し、骨誘導系細胞培養系にてその変化をみた。さらに個体レベルでの機能を解析するため、マウス頭蓋骨形成過程において、抗体添加し、その作用を解析した。ラミニン高次立体構造の変化は骨形成過程における石灰化過程を制御する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The superstructure of extracellular matrix controls cytokine's activities. In this study, we tried to analyze how laminin super structure effects bone formation through the interaction fgf signaling. We made monoclonal antibodies for laminin super structure and applied them to in vitro and in vivo bone formation models. Our results might conclude that laminin super structure could control bone formation and calcification.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：発生・分化 細胞外基質 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

従来は、主に上皮基底膜の成分として研究されてきた laminin-5 が近年、間葉系組織にも存在し、未分化間葉系細胞の骨誘導能を制御する可能性が高まっている (*Mol Biol Cell*. 2005;16:881-890)。しかし、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を MAPK シグナルを介して促進させるという報告 (*J Cell Biochem*. 2007;100:499-514) と、骨芽細胞への分化には関与せず、軟骨細胞への分化を抑制する (*Exp Cell Res*. 2005;310:256-269, *Stem Cells*. 2006;24:2346-2354) という、細胞レベルでは相反する結果が存在するなど、統一された見解ではない。このような結果を生み出す背景には、laminin-5 が3つの、ならびに鎖から構成される巨大分子であり、さらに、鎖や鎖のプロセッシングによる立体構造の変化に伴い、その生理作用が異なること (*J Biol Chem*. 2000;275:22495-22502 他) があげられる。しかし、従来の研究では laminin-5 の各構成部位の人工タンパクを用いて、その機能を細胞レベルで検討するという方法が採られてきた。よって、ダイナミックな立体構造の変化に伴う生理活性機能の変化を正確に捉えることが困難であった。

2. 研究の目的

BMP は、強力な骨誘導能を有していることから世界中の研究者が骨再生治療への臨床応用を目指している。しかし、未だ広く普及するには至っていない。この背景には、BMP が生体内で拡散しやすいため、適切な担体の併用が必要であること (*J Musculoskeletal Res*. 2002. 河井業績) や、タンパク精製に対するコストの高さなどの問題が存在している。そこで、BMP を遺伝子の状態で生体内にデリバリーし、骨欠損部周囲の細胞の骨再生能を促進することを目指した。ウイルスの毒性や免疫応答の惹起等 (*Gene Ther*. 2004. 河井業績) から、より安全な非ウイルス性ベクターである BMP-2 遺伝子発現ベクター (pCAGGS-BMP-2) を構築し、遺伝子導入効率を高めるために *in vivo* electroporation 法を併用した骨再生法を開発した (*Human Gene Ther*. 2003. 河井業績. 国際特願 2006-511121)。この研究の課題として、プラスミド濃度や *in vivo* electroporation の回数といったパラメーターを変化させても、再生する骨量に大きな変化がみられなかったことがあげられる。そこで、この骨誘導法に対して、再生速度、再生骨量などの制御機能を付与することを試みた。その結果、BMP ヘテロダイマー形成ベクターの構築や BMP ホモダイマーの産生量制御ベクターの構築など、ベクターの遺伝子発現レベルでの制御能の

付与によって、再生骨の速度や量を増加させることに成功した (*BMC Musculoskeletal Disord*. 2006, *BBRC*. 2009 河井業績)。しかし、1つの液性因子の遺伝子発現レベルでの制御機構のみでは限界があり、骨形成速度の加速や形成される骨量の増加といった“正”の制御には成功したものの、臨床応用には、“負”の制御とともに、これらの制御を時空的にコントロールするシステムが必要であると考える。そこで、濃度依存的に BMP の骨誘導能を調節するという現象 (*Bone* 2005;36:399-407) が報告されている FGF と、これらの液性因子をトラップし、必要に応じてリリースするという制御機能を有するとされる細胞外基質 (*Nature Cell Biol*. 2000;2:225-229) に着目した。

3. 研究の方法

- (1) laminin-5 の高次立体構造の変化に対応するモノクローナル抗体の作製
- (2) マウス、ニワトリ顔面骨形成過程における laminin-5 プロセッシング部位ならびに切断酵素 TLD (Tolloid-like metalloproteinases) の発現解析
- (3) *in vitro* での BMP ならびに FGF と laminin-5 との相互作用解析を作製した抗体を用いて行う
- (4) マウス胚への抗体移植と顎顔面骨の表現型の同定
- (5) *Fgfr1* conditional knock out (CKO) マウス胚への抗体移植による頭蓋骨の表現型の同定
- (6) (4), (5) での骨形成過程における経時的 MAPK シグナル関連因子の発現解析

4. 研究成果

- (1) laminin-5 の高次立体構造の変化に対応するモノクローナル抗体



図1 laminin-5 鎖 LG3-4 間特異的抗体

図 1

に示すようにラミニンの高次立体構造の変化に対応する抗体作成に際して、BMP-1 にてプロセッシングする部位を想定し、抗体作成に

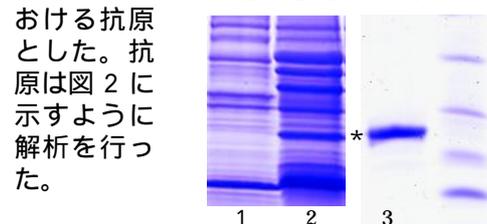


図2 抗原蛋白

における抗原とした。抗原は図2に示すように解析を行った。

(2) *in vitro* での作成抗体を用いた骨誘導での解析

骨誘導培養系での抗体添加による骨誘導能の変化: laminin-5 を添加した培養皿を用いて、マウス未分化間葉系細胞である C3H10T1/2 細胞への BMP ならびに FGF を用いた確立された骨誘導系にて、作製した抗体の添加による骨誘導能の変化を ALP 染色ならびに生化学的に解析を行った。

遺伝子発現解析: 骨関連因子 (ALP, Osteocalcin, Osteopontin, Runx2, Msx, Twist, Dlx5)、FGF シグナル (FGF2, 4, 9, 18, および FGFR1, 2, 3)、BMP シグナル (BMP2, 4, 7 および Noggin, Chordin, Sclerotin などのアンタゴニスト)、 MAPK シグナル (Grb2, Ras, Raf, MEK, ERK) とその抑制因子 (Sef, Spred, Sprouty) の遺伝子発現解析を行った。

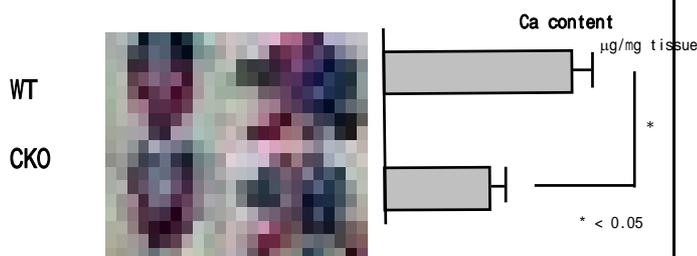
(3) マウス胚への抗体移植と顎顔面骨の表現型の同定

マウス E14.5 の頭蓋部位を取り出し、作製した抗体添加状態で 2 日間器官培養を行い、組織学的解析を行った。

(4) *Fgfr1* conditional knock out (CKO) マウス胚への抗体移植による頭蓋骨の表現型の同定

CKO マウスを用いて、*in utero* 法による抗体移植を行った。E12.5 の段階にて、抗体移植し、E16.5 までの経過を観察した。

CKO マウスの頭蓋形成において石灰化度は WT と比較し、差を認めた。



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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

河井まりこ、山本 敏男. *fgf conditional knock out mice derived chondrogenesis and osteogenesis in the cranial bone formation*. 第 55 回歯科基礎医学会総会・学術集会、2013 年 9 月 20 日～22 日.岡山

[図書](計 0 件)

[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

河井 まりこ (KAWAI MARIKO)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40379839

(2) 研究分担者

十川 紀夫 (SOGAWA NORIO)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30236153

(2) 研究協力者

Dr.Prof. Annette Neubueser
Dr.David herrmann
Freiburug University