

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592999

研究課題名(和文)骨形成タンパク質NELL1による骨・軟骨誘導とその臨床応用

研究課題名(英文)Osteogenic and chondrogenic induction by NELL 1

研究代表者

織田 光夫(Oda, Mitsuo)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：30359492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：NELL1はBMPとは異なり異所性の骨形成は有さず、in vitroでBMPに匹敵する骨誘導能を有する。これまでにラット頭蓋骨欠損と大腿骨欠損モデルでの骨誘導解析の結果、頭蓋骨モデルでは、10 $\mu$ gを投与した際に骨形成が確認されたが、投与量を増加させても骨形成の増加は見られなかった。逆に、投与量の増加は、骨形成を抑制しているかのような所見を得た。また、大腿骨モデルでは、2 $\mu$ gで術後4週で旺盛な骨形成を示した。本研究では、大腿骨欠損モデルに2 $\mu$ g NELL1投与の確認と、0.5、10 $\mu$ gでの結果の確認を行い、臨床応用の可能性を示す。

研究成果の概要(英文)：NELL1 is a secretory protein of about 110 kDa having both six EGF-like sequence and five vWF-C-like sequence. NELL1 does not show the ectopic osteoinduction unlike BMP and has the bone inducibility equal to BMP in vitro. Application of 10 microgram of NELL1 in the rat skull defect model showed the rapid osteogenesis. However, the increase of the NELL1 dose did not enhance the more rapid osteoinduction. In the case of the rat tibia defect model, 2 microgram of NELL1 induced the active bone induction. In this study, we confirm the osteoinducibility of 2 microgram of NELL1 in both models. We also examine the effect of NELL1 at low (0.5 microgram) and high (10 microgram) dose and show the possibility of the clinical application of NELL1.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：NELL 骨誘導 軟骨誘導

## 1. 研究開始当初の背景

新たなタンパク質 NELL1 は 1999 年に大阪大学産業化学研究所生体触媒分野准教授 (当時、現在名古屋大学農学部教授) の黒田俊一がその遺伝子クローニングをし (黒田ら BRRC 265 : 79-86、1999) 片山化学工業株式会社 (大阪) において精製タンパク質として生産されたものである。

NELL1 は EGF 様配列 6 個及び vWF-C 様配列 5 個を併せ持つ約 110kDa の分泌性タンパク質である。N 末端側半分はトロンボスポンジン 1 と類似しているが、同じドメイン構造を有しているタンパク質は他に無く、新しいタンパク質ファミリーに属する。NELL1 は、BMP とは異なり、異所性の骨形成は有さず、異なる経路で作用し、しかも In vitro において BMP に匹敵する骨誘導能を有するタンパク質であり、かつリガンドリセプター系や細胞内シグナル伝達系の研究材料としても興味深い物質である。

申請者らは、黒田の依頼により、In vivo での NELL1 骨形成能を検証すべく、精製タンパク質の供給を受け、

ラット頭蓋骨欠損モデルとラット大腿骨欠損モデルでの骨誘導用解析を行った。その結果、頭蓋骨欠損モデルでは、10 $\mu$ g を投与した際に骨形成が確認されたが、20、50、100  $\mu$ g と投与量を増加させても骨形成の増加はなく、逆に、投与量の増加は、骨形成を抑制しているかのような所見さえ見られた。大腿骨欠損モデルでは、術後 4 週で欠損部にとどまらない旺盛な骨形成を示した。

タンパク質の投与量を増加させるために、濃縮の依頼を繰り返している過程で、原因不明の効能低下が長期間生じた。平成 22 年度になり、タンパク質産生細胞の変更その他により、効能の回復された新たなタンパク質の供給が、名古屋大学により再開された。再確認の意味で、新たに供給されたタンパク質 5  $\mu$ g を大腿骨欠損モデルに投与し、術後 4 週で軟

骨内骨化の像が散見された。頭蓋骨欠損モデルでは、軟骨の存在は確認されなかった。

## 2. 研究の目的

大腿骨欠損モデルに 5  $\mu$ g の NELL1 を投与して結果の確認すること、また多量の 10  $\mu$ g での結果の確認を行う。また、申請者は脂肪に BMP2 を投与して、形態をコントロールした誘導骨の作成に成功している (JDR 82 : 581-584、2003) ことから、本手法を用いた NELL1 の効果についても解析を行う。

## 3. 研究の方法

8 週齢の雄性 Wistar 系ラットを使用した。

### ・ラット大腿骨欠損モデル

Wistar ラット大腿骨を 5mm の範囲で区域切除。チタンプレートを用いて固定。骨欠損部に NELL1 2  $\mu$ g をコラーゲンスポンジに含浸させて挿入した。

各時期に試料を採取し、4%パラフォルムアルデヒドで固定し、microCT 解析を行った後、試料は 10% EDTA で脱灰、脱水、透徹、パラフィン包埋、切片作成、染色し、光学顕微鏡で観察を行った。

### ・脂肪組織内での NELL1 の効果

下腹部皮下脂肪に血管を付けたまま遊離し、シリコン内に封入した。その際、NELL1 2  $\mu$ g をコラーゲンスポンジに含浸させて挿入した。時期毎に試料を採取し、一部はパラフィン包埋し、光学顕微鏡による観察を行った。他は透過型電子顕微鏡による観察のために通常通り EPON 812 に包埋した。超薄切片を作成し、HITACHI H7600 で観察を行った。

## 4. 研究成果

### ・ラット大腿骨欠損モデル

10  $\mu$ g、20  $\mu$ g 挿入群では骨の新生を認めなかった。5  $\mu$ g 挿入群では、経時的に骨の新生が認められた。CT 観察の結果、5  $\mu$ g 挿入群では、術後 2 週 (図 1) と比較して術後 4 週 (図 2) では形成される骨量が増加傾向を示し、また、骨体積の計測の結果は有意な形成量の増加 (図 3) を示した。

組織学的解析の結果、術後 2 週では、骨新

生は軟骨性骨化により行われていることが示された(図 4)。術後 4 週では骨端部付近に骨形成は無く(図 5)、骨端板周囲に海綿状の新生骨形成と、その増殖起点となる軟骨板が見られた(図 6)。また創傷部位には顕著な炎症反応は認められなかった。

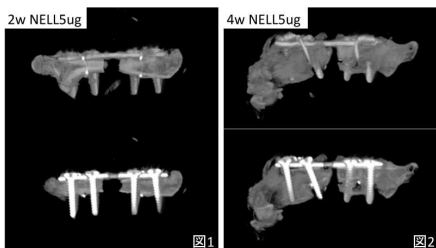


図 1

図 2

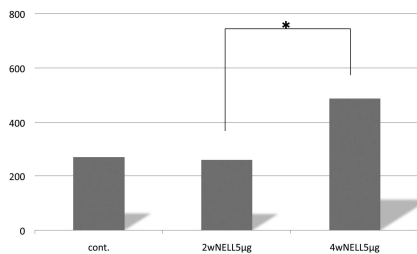


図 3

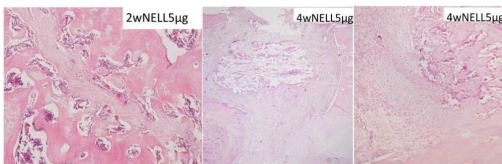


図 4

図 5

図 6

#### ・脂肪組織内での NELL1 の効果

光学顕微鏡による観察(図 7)では、NELL1 非添加群(control)では脂肪組織に構造的変化は認められない。一方、NELL1 添加群では、2 週後に上皮細胞様の細胞集団が数多く認められた。また、その細胞集団内には脂肪滴が認められた。更に、細胞集団の内部に管腔様構造の認められる場合もあった。

透過型電子顕微鏡による解析では、管腔内に電子密度高い物質が認められた(図 8a)。細胞内に電子密度高い顆粒の存在が認められた。周囲の結合組織との境界には矢印で示すように基底膜が存在した(図 8b)。細胞間には矢印で示すように細胞間結合装置が認められ、細胞内に電子密度の高い顆粒構造が

数多く認められた(図 8c)。細胞内の脂肪滴の周囲に電子密度の高い顆粒が集積していた(図 8d)。その部位を強拡大で観察すると、矢印で示すように脂肪滴の電子密度が増し、顆粒になっていくと思われる所見が認められた(図 8e)。

考察：

#### ・ラット大腿骨欠損モデル

これまで、頭蓋骨欠損修復による皮質骨のみの検定であった in vitro 骨修復能測定を、海綿骨・皮質骨が共存することより臨床実態に近い骨形成を検討することが出来た。海綿骨修復像は骨端板の軟骨を介して行われており、これまでの BMP による膜性骨化とは全く異なることが示された。また、BMP 投与時と異なり、過度な炎症反応を惹起しないことも確認された。NELL1 による新生骨誘導が濃度依存性でないことについては、現在のところ不明である。また、今後、担体の種類、ならびに他の骨形成因子との併用による骨新生の解析が必要である。

#### ・脂肪組織内での NELL1 の効果

zonula adhesion と基底膜の存在から、NELL1 は脂肪組織細胞の上皮細胞への分化、すなわち、間葉—上皮移行を誘導することが示唆された。上皮細胞内には大型の脂肪滴が含まれていることから、脂肪細胞の MET の可能性が強く示唆された。また、管腔内分泌物の性状は不明であるが、誘導上皮細胞内の脂肪滴由来である可能性も示された。

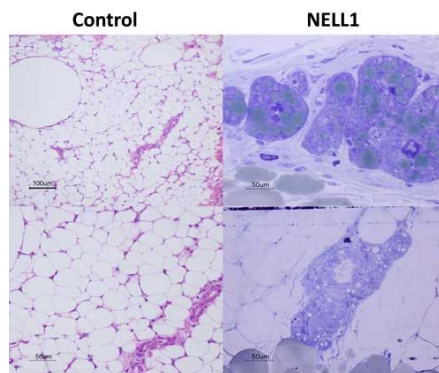


図 7

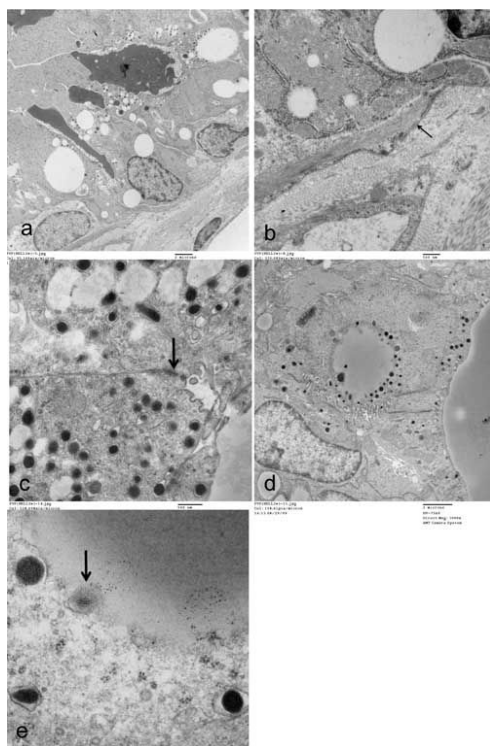


図 8

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 13 件)

1. Tsuzurahara F, Soeta S, Kawawa T, Baba K, Nakamura M: The role of macrophages for the disappearance of Meckel's cartilage during development in mice. *Acta Histochem* 113:194-200, 2011
2. Otsuka H, Yagi H, Endo Y, Nonaka N, Nakamura M: Kupffer cells support extramedullary erythropoiesis induced by nitrogen-containing bisphosphonate in splenectomized mice. *Cell Immunol* 271:197-204, 2011
3. Yu Z, Otsuka H, Yamaguchi K, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S, Nakamura M, Endo Y: Roles of platelets and macrophages in the protective effects of lipopolysaccharide against concanavalin A-induced murine hepatitis. *Biochim Biophys Acta*. 1812:1069-1079, 2011
4. Iwasaki K, Otsuka H, Yanagisawa N, Hisamitsu H, Manabe A, Nonaka N, Nakamura M: In situ proliferation and differentiation of macrophages in dental pulp. *Cell Tissue Res*. 346:99-109, 2011
5. Ikeda-Isogai M, Ohtsuka T, Baba K, Nonaka N, Nakamura M: Calcified tissue formation of subcutaneously transplanted mouse dental pulp. *Acta Histochem* 114:55-61, 2012
6. Takito J, Nakamura M, Yoda M, Tohmonda T, Uchikawa S, Horiuchi K, Toyama Y, Chiba K: The transient appearance of zipper-like actin superstructures during the fusion of osteoclasts. *J Cell Sci* 125:662-672, 2012
7. Tsukamoto Y, Usui M, Yamamoto G, Takagi Y, Tachikawa T, Yamamoto M, Nakamura M: The role of the junctional epithelium in periodontal innate defense and homeostasis. *J Periodont Res* 47: 750-757, 2012
8. Takito J, Nakamura M: Linked precursors via the zipper-like structure or the filopodium during the secondary fusion of osteoclasts. *Communicative & Integrative Biology* 5: 450-454, 2012
9. Nonaka N, Farr SA, Nakamachi T, Morley JE, Nakamura M, Shioda S, Banks WA: Intranasal administration of PACAP: Uptake by brain and regional brain targeting with cyclodextrins. *Peptide* 36: 168-175, 2012
10. Hidaka M, Nakamura M, Ohmichi Y, Itoh J, Fukuzawa K, Masuko T, Yagi H: Involvement of intestinal intraepithelial lymphocytes in turnover of intestinal epithelial cells -Morphological and functional alterations due to daily administration of FK506-. *Cell Immunol* 276:124-133, 2012
11. Nakajima K, Tagaya A, Otonari-Yamamoto M, Seki K, Araki K, Sano T, Okano T, Nakamura M: Composition of the blood supply in the sublingual and submandibular spaces and its relationship to the lateral lingual foramen of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 117: e32-e38, 2014

12. Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murase R, Yamamoto K, Tanaka S, Sakanaka M, Nakamura M, Nishito Y, Kawana M, Kambe N, Ikeda K, Taguchi R, Nakamizo S, Kabashima K, Gelb MH, Arita M, Yokomizo T, Nakamura M, Watanabe K, Hirai H, Nakamura M, Okayama Y, Ra C, Aritake K, Urade Y, Morimoto K, Sugimoto Y, Shimizu T, Narumiya S, Hara S, Murakami M: Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. *Nat Immunol* 14: 554-563, 2013

13. Mayahara M, Kataoka R, Arimoto T, Tamaki Y, Yamaguchi N, Watanabe Y, Yamasaki Y, Miyazaki T. Effects of surface roughness and dimorphism on the adhesion of *Candida albicans* to the surface of resins: scanning electron microscope analyses of mode and number of adhesions. *J Investig Clin Dent* (in press)

〔学会発表〕(計 23 件)

1. Nonaka N, Nakamachi T, Shioda S, Nakamura M: Immunohistochemical localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC-1) in mouse major salivary glands. (AAA Annual Meeting at Experimental Biology 2011, Washington DC, April 2011)

2. 野中直子, 中町智哉, 塩田清二, 中村雅典: マウス唾液腺における PACAP レセプターの局在と PACAP 経鼻投与による唾液分泌量の亢進。(第 11 回 日本抗加齢医学会総会, 京都, 2011 年 5 月)

3. 大塚裕忠, 中村雅典: マウスにおける血リンパ節様構造の形成誘導について。(第 23 回日本比較免疫学, 2011 年 8 月)

4. 野中直子, 中村雅典: マウス唾液腺における PACAP レセプターの局在と PACAP の唾液分泌への効果。(第 53 回 歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 岐阜, 2011 年 9 月)

5. 野中直子, 中町智哉, 塩田清二, 中村雅典: マウス唾液腺における PACAP レセプターおよび VIP

レセプターの免疫組織化学的局在と唾液分泌への効果。(第 52 回 日本組織細胞化学会, 金沢, 2011 年 9 月)

6. Nonaka N, Nakamachi T, Shioda S, Nakamura M: Immunohistochemical localizations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptor (PAC1R) in mouse major salivary glands. (第 10 回日中合同組織細胞化学セミナー, 北京, 2011 年 10 月)

7. Otsuka H, Nakamura M: Kupffer cells support hepatic erythropoiesis induced by nitrogen-containing bisphosphonate in splenectomized mice. (American College of Gastroenterology 76<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, October, 2011)

8. 中島 功, 中村雅典: 舌下部とオトガイ下部の動脈ならびに下顎骨舌側に見られる小孔を通る動脈について。(第 65 回 日本人類学会大会, 沖縄, 2011 年 11 月)

9. 野中直子, 中村雅典: マウスおよびヒト唾液腺における PACAP と PAC1R の免疫組織化学的局在。(第 65 回 日本人類学会大会, 沖縄, 2011 年 11 月)

10. 大塚裕忠, 中村雅典: マウス血リンパ節様構造における赤血球造血について。(第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012 年 3 月)

11. 野中直子, 中町智哉, 塩田清二, 中村雅典: マウス唾液腺における PACAP および VIP レセプターの免疫組織化学的局在と PACAP および VIP の鼻投与による唾液分泌への効果。(第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 山梨, 2012 年 3 月)

12. 柴田昌和, 後藤 昇, 後藤 潤, 野中直子, 中村雅典, 塩田清二: 脊髄白質の評価法。(第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 山梨, 2012 年 3 月)

13. Nonaka N, Nakamura M: Immunohistochemical localization of PACAP and VIP receptors in major salivary glands and the effect of PACAP on saliva secretion in mice. *American Association of Anatomists (AAA) Annual*

Meeting at Experimental Biology 2012, San Diego, April 2012

14. 野中直子, 中島 功, 中村雅典, 片岡竜太: 人体解剖学実習におけるグループダイナミックス評価の検討 その1 (第31回日本歯科医学教育学会総会, 2012, 7月, 岡山)

15. 野中直子, 中村雅典: 加齢に伴うマウス唾液腺における PACAP レセプター局在の解析. (第54回歯科基礎医学会学術大会・総会 郡山, 2012年9月)

16. 中納治久, 吉田美智, 藤島昭宏, 中島 功, 高野直樹, 中村雅典, 宮崎 隆, 榎慎太郎: ヒト下顎骨における海綿骨を考慮した大規模動的解析 (第71回日本矯正歯科学会大会, 岩手, 2012年9月)

17. Otsuka H, Nakamura M: Induction of hemal node like structures in mice. (14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry Poster Program 8, August, 2012)

18. Matoba Y, Nonaka N, Imamura E, Nakamura M: Immunohistochemical localization of PACAP and VIP receptors in major salivary glands and the effect of them on saliva secretion in mice. (10th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgeons (ACOMS), Bali-Indonesia, November 2012)

19. Otsuka H, Nakamura M: Simultaneous detection of primitive and definitive erythropoiesis in adult mice. (第41回日本免疫学会総会・学術集会記録集, p128, 2012年12月)

20. 大塚裕忠, 中村雅典: 成体マウスにおける胚子ヘモグロビンの再発現について (第188回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013年3月)

21. 瀧戸 二郎, 中村雅典: 破骨細胞融合時に出現する細胞間アクチン超構造体. (第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013年3月)

22. 野中直子, 中町智哉, 塩田清二, 中村雅典: 加齢に伴うマウス唾液腺における構造機能変化の比較検討. (第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 2013年3月)

23. Nonaka N, Nakamura M: Histological and

immunohistochemical comparison of mouse salivary glands in aging. (91th International Association for Dental Research, Seattle, March 2013)

〔図書〕(計 2件)

1. Nakamura M, Otsuka H, Yagi H, Yasuo Endo: The Functional Diversity of Kupffer Cells. Handbook of Macrophage: Life Cycle, Functions and Diseases.

NOVA science publishers, 329-344, 2013

2. Nakamura M, Otsuka H, Nonaka N, Yanagisawa N, Yagi H, Endo Y. Extramedullary erythropoiesis in anemia. The New Frontiers in Research for Oral Cancer. MARUZEN PLANET, 117-127, 2013

〔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  
織田 光夫 (ODA MITSUO)  
昭和大学・歯学部・兼任講師  
研究者番号: 30359492

(2) 研究分担者  
中村 雅典 (NAKAMURA MASANORI)  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号: 50180394  
馬谷原 光織 (MAYAHARA MITSUORI)  
昭和大学・歯学部・助教  
研究者番号: 30384184

(3) 連携研究者  
黒田 俊一 (KURODA SHUNICHI)  
名古屋大学・農学部・教授  
研究者番号: 60263406