

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23792222  
 研究課題名（和文） 骨組織におけるEphA4の機能解明とその骨組織再生医療への応用

研究課題名（英文）Function elucidation of EphA4 in the osseous tissue and application to the osseous tissue regenerative medicine

研究代表者

黒田 知沙（KURODA CHISA）  
 岡山大学・岡山大学病院・助教  
 研究者番号：40581096

研究成果の概要（和文）：プロテインチップを用いた網羅的インタラクトーム解析により数多くのタンパク質が候補が上がってきたが、その中でもガレクチン(LGALS)ファミリーの複数のメンバーが特異的であった。ガレクチンとはその名の通り糖に結合する小タンパク質、レクチンに分類される分子群である。10種を超えるメンバーからなるLGALSファミリーであるが、今回実にLGALS-1, 2, 3, 7, 8との結合を示すデータが得られたのである。

研究成果の概要（英文）：Much protein was nominated by the exhaustive interactome analysis using the protein tip, but the plural members of the galectin (LGALS) family were specific in that. It is molecules group classified in small protein, lectin combined with the galectin to sugar according to the name. It was the LGALS family consisting of the members more than ten kinds, but data indicating the combination with LGALS- 1, 2, 3, 7, 8 were provided really this time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：LGALS1,2,3,7,8 Moesin Galectin

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類において、長管骨は軟骨原基として発生し、内軟骨性骨形成を経て成長を遂げて骨格を形成するとともに、造血臓器としての骨髄も作り上げる。その過程では間葉系、血球系のさまざまな細胞が種々のサイトカイン、成長因子とその受容体を介して情報交換を行っている。申請者らは以前の研究で、ヒト軟骨細胞株 HCS-2/8 細胞に発現するチロシンキナーゼ型受容体の一つとして EphA4 を見出した。Eph は体節形成、細胞移動、臓器形成、心脈管形成などさまざまなところで重要な働きをする分子だが、その機能に関し

てはいまだ不明の点が多く残されている。そして Eph ファミリーメンバーの中でも EphA4 は比較的最近になって注目されはじめた分子であり、神経領域での研究は比較的進んでいるが、骨、軟骨組織における機能は未だわかっていない。EphA4 はチロシンキナーゼ型受容体であり、膜を一回貫通する分子で、細胞外にリガンド結合領域と2つのフィブロネクチン・タイプIIIリピートを持ち、細胞内にはチロシンキナーゼ活性ドメインを持ち、また自らも特定の部位でリン酸化される。EphA4 は以前の研究で、チロシンキナーゼ型レセプターの、キナーゼドメイン領域の

cDNA を増幅するプライマーを用いた、RT-PCR クローニングの結果、ヒト軟骨細胞様 HCS-2/8 細胞上に存在するチロシンキナーゼ型レセプターの一つとして検出された。EphA4 は比較的最近になって注目されはじめた分子であり、神経領域での研究は比較的進んでいるが、骨、軟骨における分布状況や機能は未だわかっていない。よって軟骨組織、関連細胞株での EphA4 の発現、分布の解明をおこなった。結果、マウス成長板の免疫染色では EphA4 は、肥大軟骨細胞層、および骨周囲の細胞に局在しており、成長板軟骨初代培養細胞の分化過程では、EphA4 の遺伝子発現は CCN2 遺伝子の発現ピーク後、すなわち分化の最終段階(肥大化期)で急上昇が見られ、In vitro の実験において、EphA4 の遺伝子発現は、軟骨細胞様細胞株(HCS-2/8)より骨芽細胞様細胞株(SaOS-2)で高く、一方、子宮頸癌細胞株(HeLa)では発現していなかった。EphA4 の機能を調べるため、骨芽細胞様細胞株(SaOS-2)で EphA4 遺伝子をノックダウンするとオステオカルシン遺伝子の発現は低下し、ALPase 活性も低下した。骨芽細胞様細胞株(SaOS-2)において EphA4 は細胞質のみでなく核内への集積が見られ、核小体とは別の部位に局在した。これらの知見は、EphA4 が骨形成に重要な役割を果たすことを初めて明らかにするとともに EphA4 の新たなシグナリング経路の存在の可能性を示唆している。よって、長管骨に限らず、他の視点からも EphA4 を調べていくこととする。

## 2. 研究の目的

EphA4 はチロシンキナーゼ型細胞表面受容体分子であり、その特異的リガンドとしては ephrinB2 や ephrinA2 などが知られている。しかしながら、骨を形成する成長板軟骨細胞や骨芽細胞表面に存在する EphA4 に結合し、リガンドとして機能する分子はいまだ明らかにはなっていない。また機能面でも、骨芽細胞による骨基質石灰化に重要であるという前述の事実以外には、まったく情報がないのが現状である。

(1)長管骨組織における EphA4 のリガンドの探索

リガンドの最有力候補はもちろん既知の ephrin 分子であるので、これらについては組織における遺伝子発現、分布の解析を行うとともに、骨・軟骨成長板組織での存在を確認されたものについては EphA4 との分子間相互作用をさまざまな方法で解析する。具体的にはリコンビナントタンパク質を用いた固相結合アッセイ、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) などを組み合わせて用いる。

また ephrin 以外にもリガンドとして機能する分子がある可能性もあるので、プロテインチップを用いた網羅的スクリーニングを行

い EphA4 と相互作用する新たな分子の探索も並行して行う。

## 3. 研究の方法

① 正常骨・軟骨組織標本の作製と免疫染色による既知 EphA4 リガンドの産生・分布の解析

マウスを用い、生後 1 週における膝関節組織を摘出固定、EDTA による脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行い、厚さ 7 $\mu$ m の連続切片を作製する。続いて切片に ephrinB5 をはじめとする既知リガンドに対する抗体を作用させ、これらの存否と分布を EphA4 と比較検討する。例えば ephrinB5 と EphA4 が隣り合う細胞層で差別的に存在が確認された場合、神経組織で確認されているように EphA4 シグナルが、相互反発力の発生による細胞の適正な「住み分け」や「成長方向の限定」に役割を果たしている可能性が強く示唆される。

② 初代細胞培養系とリアルタイム-RT-PCR 法によるリガンド産生の確認

マウス肋軟骨ならびに頭蓋骨よりコラゲナーゼ処理により分離回収した軟骨細胞、および骨芽細胞を in vitro で培養しつつ分化を誘導し、各段階で RNA を抽出する。抽出した RNA を逆転写し、LightCycler システムで上記の既知リガンド遺伝子の発現を、分化段階ごとに定量化して EphA4 のそれと比較する。本実験は①の結果の裏付けを得るのに適切であり、また使用する抗体の質によって①で安定した結果が得られない場合でも情報が得られるという利点がある。

③ リガンドと EphA4 の分子間相互作用の解析

①②で特定されたリガンドに対して、EphA4 との直接の結合を固相結合アッセイ法、およびピアコア装置を用いた SPR 解析により評価する。とりわけ SPR 法による解析では、結合の動的平衡を定量的に比較解析できるので、機能的リガンドの特定に有用な情報が得られる見込みである。

④ リガンド結合により EphA4 を介して活性化される細胞内シグナルの解析

ここまでの研究で特定されたリガンドについてはリコンビナントタンパク質を準備し、②の培養系に添加することにより EphA4 自身や、その下流に位置すると思われるシグナル伝達分子の活性化を、主としてリン酸化分子特異的抗体を用いたウエスタンブロットング法で解析する。

⑤ プロテインアレイによる EphA4 に対する未知リガンドの探索と解析

EphA4 のリガンドは既知のものだけとは当然限らないので、プロテインアレイを用いて未知リガンドを網羅的に探索する。幸い EphA4 のリコンビナントタンパク質は既に

準備できているので、適切なアレイを用いてスクリーニングを行うだけである程度の情報が得られよう。ここで新たな候補に挙げられた分子に対しても、上記の解析を順に適用する。

#### ⑥ トランスジェニックマウス作成用ベクターの構築

骨、および軟骨細胞特異的に作動するプロモーターとして、オステオカルシンならびにII型コラーゲン遺伝子のものを選び、それによって EphA4 遺伝子を駆動するプラスミドを構築する。構築後、軟骨細胞様 HCS-2/8 細胞や骨芽細胞様 SaOs-2 細胞に一過性に導入し、実際に遺伝子が駆動されるかを確認しておく。

#### ⑦ マイクロアレイ

invitrogen 社製 ProtoArray® による網羅的分子間 (タンパク質間) 相互作用解析を行った。網羅的なタンパク質間相互作用解析データは、高密度タンパク質アレイである

”ProtoArray®” (invitrogen 社製) を利用した。ProtoArray® は、5' -GST 融合タンパク質として発現された完全長 (GenBank) オープンリーディングフレームの広範囲にわたるコレクションを包含している。

ProtoArray® Human Protein MicroArray v5.0 はニトロセルロースコートしたスライドガラス上に、約 9,400 種類の複数の遺伝子ファミリーに由来するタンパク質 (“Druggable” ターゲット, キナーゼ, 転写因子, 膜関連, 細胞シグナル伝達, 代謝関連など) を網羅している。アレイ上のタンパク質の大半は、invitrogen 社 Ultimate ORF クローンで発現させたタンパク質由来である。全翻訳領域アミノ酸配列がレファレンス配列と一致することを確認済みである。ネイティブ構造及び固有機能を保持するため、タンパク質はバキュロウイルス系で発現され、ネイティブな条件下で精製している。

ProtoArray® を利用することにより、たった一度の実験にて、数千種類のタンパク質に対する相互作用解析データを得ることが出来た。これにより、既知及び新規のタンパク質間相互作用が明らかとなり、シグナル伝達経路・薬物標的の発見・疾患関連経路のマッピングなどの解析が可能となった。

#### 1. サンプルのビオチン標識及び品質チェック

QC チェックを通過したタンパク質をビオチン標識する。その後、得られたビオチン化サンプルの QC チェックを行う。

#### 2. ProtoArray (Control array) を用いたハイブリダイゼーション

QC チェックを通過したビオチン化タンパク質 (又は、V5/FLAG/HA/His タグ付タンパク質) を、コントロールアレイ上にアプライして、ハイブリダイゼーションを行う。洗浄後、

AlexaFluor647 標識ストレプトアビジン (又は、AlexaFluor647 標識 V5 抗体/HA 抗体/FLAG 抗体) を添加し、洗浄・乾燥させる。この際、解析不可能と考えられる様な、必要以上にバックグラウンドがあがる現象が起こらないことを確認する。ハイブリダイゼーション画像結果に問題があると判断した場合、ハイブリダイゼーションに用いるサンプルの量を調整する。

#### 3. ProtoArray を用いたハイブリダイゼーション

アレイを用いてハイブリダイゼーションを行なう。

4. スキャンニング・データ解析 (数値化) ハイブリダイゼーション後のアレイを、GenePix®4000B にて読み取り、画像ファイルを作成する。得られた画像から、解析ソフトウェアにより、各スポットのシグナル強度を数値データに変換する。

#### 4. 研究成果

予定していた研究は途中のものが多い中、ハイブリダイゼーション後のアレイを解析にてデータを変換した結果、以下 18 因子が検出された。

1. Homo sapiens cortactin (CTTN), transcript variant 2, mRNA→Src
2. Homo sapiens RNase MRP/RNase P protein-like (POP5), mRNA→リボヌクレアーゼ
3. Homo sapiens nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1), transcript variant 1, mRNA→オーファン受容体
4. Homo sapiens docking protein 1, 62kDa (downstream of tyrosine kinase 1) (DOK1), mRNA→p62kD Downstream protein
5. FAM120B → family with sequence similarity 120B; dJ894D12.1; PGCC1; KIAA0183; KIAA1838
6. Homosapiens6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase4 (PFKFB4), mRNA 6PF-2-K/Fru-2,6-P2ASE -type isozym testis e
7. PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC388528 (LOC388528), mRNA
8. Homo sapiens enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial (ECHS1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA  
→エノイル - CoA ヒドラターゼ
9. Homo sapiens family with sequence similarity 126, member B (FAM126B), mRNA
10. Homo sapiens PTK2 protein tyrosine kinase 2, mRNA (cDNA clone MGC:34721 IMAGE:4999680), complete cds
11. Homo sapiens hypothetical protein MGC10744 (MGC10744), mRNA→膜貫通蛋白質

13. Homo sapiens RAB20, member RAS oncogene family (RAB20), mRNA→ras 癌遺伝子
14. Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 150, mRNA (cDNA clone MGC:46502 IMAGE:5228515), complete cds
15. Homo sapiens RUN domain containing 3B, mRNA (cDNA clone MGC:26655 IMAGE:4793693), complete cds
16. Homo sapiens FtsJ homolog 1 (E. coli) (FTSJ1), mRNA→ribosomal RNA
17. Homo sapiens zinc finger CCCH-type, antiviral 1-like (ZC3HAV1L), mRNA→zinc finger
18. Homo sapiens betaine-homocysteine methyltransferase 2 (BHMT2), mRNA→ベタイン・ホモシステイン-S-メチル基転移酵素

これらは Eph レセプターがチロシンキナーゼレセプターであるとともに、ドメイン構造を呈しているということを示唆したに過ぎない。他 9479 因子検出された中で興味深い因子が発見されたので以下にまとめた。

(1) 成長板軟骨細胞上に発現する EphA4 のリガンド分子の探索

申請者らは以前の研究で、受容体型チロシンキナーゼである EphA4 が成長板軟骨細胞、特に肥大軟骨細胞から産生されていることを明らかにした、そして同分子が骨形成に重要であることも既に見出していたので、今回は EphA4 に結合するリガンドを探索した。プロテインチップを用いた網羅的インタクトーム解析により数多くのタンパク質が候補に上がってきたが、その中でもガレクチン (LGALS) ファミリーの複数のメンバーには特に目を引かれた。ガレクチンとはその名の通り糖に結合する小タンパク質、レクチンに分類される分子群である。ガレクチンファミリーは糖認識ドメイン (CRDs) を有する  $\beta$ -Gal 結合レクチンで構成されるタンパク質で、哺乳動物では 12 種のアイソタイプが知られている。一般に、可溶性で金属要求性がない。発現場所は細胞質内にとどまらず、核、細胞表面、細胞外マトリックスと様々で、ガレクチン分子の種類、組織、時期によって異なる。共通機能としては、細胞表面や細胞外マトリックスにおける N-アセチルガラクトサミンを介した架橋構造の構築がある。一方で赤血球凝集活性も併せ持っていて、その凝集能はこの分子が 2 価の糖に結合するという特性に起因している。このファミリーに属する分子はいずれも細胞の接着、輸送、極性、走化性、発生、分化、形態形成そしてアポトーシスといった種々の現象に関与している。ガレクチンファミリーは、自己免疫疾患やアレルギー反応、炎症、腫瘍転移、そして動脈硬化や糖尿病のカギを握る新規マーカーとして近年注目されている。10 種を超えるメンバーから

なる LGALS ファミリーであるが、今回実に LGALS-1, 2, 3, 7, 8 との結合を示すデータが得られたのである。中でも LGALS-1 に関しては、ノックアウトマウスで末梢神経の神経突起伸張異常が認められるなど、神経発生で重要な役割を果たす EphA4 との関連が強く推察された。

(2) LGALS-1 の軟骨細胞における産生の解析

そこで、正常肥大軟骨細胞と増殖軟骨細胞をそれぞれ単離し、トランスクリプトーム解析により mRNA 発現を網羅的に解析したところ、どちらの軟骨細胞でも LGALS-1 が発現していることが明らかになった。また興味深いことに、LGALS-1 の発現は肥大軟骨細胞でより強かった。この所見は 2008 年の報告 (Marsich et al., 2008) に一致し、当該論文には LGALS-1 は軟骨細胞の肥大化を促進したとの記載もある。以上の知見を申請者が過去に得た所見と総合すれば、LGALS-1 と EphA4 のリガンド・レセプター相互作用が、内軟骨性骨形成に重要な役割を演じていることが強く推察されよう。

ガレクチン-1 は、血管細胞、脳神経細胞の分裂を促進し、神経線維の再生を促進すること、ガレクチン-2 と心筋梗塞の発症の関連性やガレクチン-7 に腫瘍増殖抑制効果が存在することが報告されている Eph のリガンドである ephrinB2 が血管新生に関係すると報告されており、ガレクチンと類似する点が多くみられる。申請者の以前の研究で内軟骨性骨化間の EphA4 と ephrinA2 リガンドの異なった発現パターンより、成長板構造を組織する際の層状構造の形成に、神経組織で報告されている Eph 分子を介するリガンドからの、いわゆるフォワードシグナルの関与を示唆した。この層状構造の形成にガレクチンが関与している可能性が出てきたため、今後ガレクチンの正常肥大軟骨層、増殖軟骨細胞層での発現と Eph の発現の比較を検討したい。EphA4 のこの新しい機能は、今まで報告されている EphA4 分子によって調節されるフォワードシグナル経路を介した機能と全く異なるので、造骨細胞におけるこの機能が、EphA4 の核内移行による新たなシグナリング経路を介して行われていることも示唆した。よって以上のことより EphA4 の骨組織における新たな機能の可能性を示唆した。

## 5. 主な発表論文等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

黒田 知沙 (KURODA CHISA)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：40581096