

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670142

研究課題名(和文)新規骨芽細胞膜受容体の探索および機能解析

研究課題名(英文)Screen to identify an osteoblast membrane receptor and its functional analysis

研究代表者

古川 貴久(Furukawa, Takahisa)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：50260609

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):我々は軟骨細胞の分化を制御する新規遺伝子の探索を行い、骨芽細胞に発現する1回膜貫通蛋白質のObifと軟骨に高い発現を示すCfm2を同定した。Cfm2の相同遺伝子Cfm1とのCfmダブル欠損マウスを作製した。このCfm欠損マウスでは、椎間板や椎体の軟骨細胞数が著しく減少していた。さらに、Cfm蛋白質とFilamin蛋白質が相互作用することや、Filamin-Smad3複合体の形成にCfmが必要であることを見出した。Filamin Bの遺伝子変異は、様々な先天性骨疾患を引き起こすことが知られている。本研究は将来的に先天性骨系疾患の診断法や治療法の開発の一助となる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文):Osteoporosis is one of the most important theme to be solved in a rapidly aging society. We screened genes regulating chondrocyte differentiation, and identified Obif, a single transmembrane protein, and Cfm2, which is highly expressed in proliferating and prehypertrophic chondrocytes. We generated Cfm1/Cfm2 double-knockout (Cfm DKO) mice. The number of cartilaginous cells in intervertebral discs is remarkably reduced, and chondrocytes are moderately reduced in Cfm DKO mice. In addition to interaction between Cfm and Filamin proteins, we showed that Cfm is required for the interaction between Flnb and Smad3. Multiple lines of evidence reported mutational congenital anomalies of Flnb including autosomal recessive spondylocarpotarsal syndrome, autosomal dominant boomerang dysplasia, Larsen syndrome, and atelosteogenesis I and III phenotypes. This study is expected to accelerate the development of novel diagnosis and cure methods for congenital skeletal malformation in the future.

研究分野：神経発生学

キーワード：Obif 骨芽細胞 軟骨細胞 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症の克服は高齢化社会での大きな課題のひとつである。しかし現在の骨粗鬆症治療薬は間接的に骨量を増加させる破骨細胞の骨吸収機能抑制薬が主である。最も高い有効性を示す骨粗鬆症薬であるビスフォスフォネート製剤は、間接的に骨量を増加させる破骨細胞の骨吸収機能抑制薬である。また、副作用として顎骨壊死を生じることや近年米国食品医薬品局 (FDA) が同薬剤の長期使用患者で非定型大腿骨骨折リスクの可能性があることが発表されている。骨基質産生細胞である骨芽細胞の機能を直接的に亢進させる薬剤は、広く利用されるまでには至っていない。したがって骨基質産生細胞である骨芽細胞の機能を直接的に亢進させる薬剤の開発が望まれている。

2. 研究の目的

我々は骨芽細胞の分化・成熟に関わる新規遺伝子の探索を行い骨芽細胞分化誘導蛋白質 Obif (Osteoblast induction factor) を見出した。Obif ノックアウト (KO) マウスの作製・解析から長管骨骨量が野生型と比較して約 30% も減少することを確認した。Obif は細胞膜局在蛋白質でありその細胞外領域のみでも骨芽細胞の分化・成熟を促すことから Obif 受容体の存在が示唆された。本研究ではこの未知受容体蛋白質の同定および機能解析を行い、新規骨粗鬆症治療薬の開発に寄与することを目的とする。さらに我々は、骨格系を構成する重要な細胞要素である軟骨細胞の分化を制御する新規遺伝子の探索も並行して行う。

3. 研究の方法

Obif 受容体蛋白質のスクリーニングを実施する。一次スクリーニングとして、前骨芽細胞株 MC3T3 細胞の分化誘導細胞より経時的に RNA を抽出し、マイクロアレイ法により Obif と同様な発現パターンを示す膜蛋白質を選定

する。二次スクリーニングとして、in situ ハイブリダイゼーション法による発現パターン分析を計画している。いくつかの発生段階のマウス胚での in situ ハイブリダイゼーション法により Obif と空間的・時間的に相似を示す遺伝子を選定する。また、免疫細胞染色法による細胞内局在解析も予定している三次スクリーニングとして、骨芽細胞分化誘導能の評価を計画している。初代骨芽細胞株および MC3T3 細胞に Obif 受容体候補蛋白質を過剰発現あるいはノックダウンを行い、骨芽細胞の分化誘導能を ALP 法ならびにカルシウム化合物測定法等により評価する。同定し蛋白質をコードするノックアウトマウスの作製を行い、当該蛋白質の機能解析を行う。ノックアウトマウスを用いて、Von kossa 骨染色、コラーゲン線維染色および骨芽細胞マーカー等による組織学的検討、同マウスの長管骨から得た初代骨芽細胞における増殖マーカーおよびアポトーシスマーカーによる検討を行う。

また我々は、軟骨細胞の分化を制御する新規遺伝子の探索を行うため、ATDC5 (マウス軟骨様細胞株) を材料としてマイクロアレイ分析を実施した。分化誘導前後の ATDC5 の遺伝子発現プロファイルを比較して、131 個を候補遺伝子として抽出した。その中で軟骨細胞の発生において機能未知の遺伝子の発現を、発生期のマウス軟骨を用いて in situ ハイブリダイゼーション法により解析した。

4. 研究成果

我々は、Obif 受容体の 1 次スクリーニングとして、マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の分化誘導細胞より経時的に RNA を抽出し、アフィメトリクスおよびアジレント社製のマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を実施した。アノテーション解析により Obif と同様な発現パターンを示す膜蛋白質から Obif 受容体候補遺伝子の選定を行った。いくつかの発生段階のマウス胚での in situ ハイブリダイゼーシ

ョン法によりObifと空間的・時間的に相似を示す遺伝子を選定することができた。

マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 に Obif を過剰発現すると分化が促進され、バイオミネラル化の著明な亢進をみた。Obif に対する siRNA を MC3T3-E1 株で恒常的に発現させることによって、骨芽細胞の分化は抑制され、バイオミネラル化は著明に抑制された。次いで、生体における骨形成能の確認のために Obif-KO マウスを作製・解析した。Obif-KO マウスはコントロールマウスと比較して、8 週齢では骨量、骨梁連結数、骨梁幅および皮質骨厚においては有意に減少し、一方骨梁間隔においては有意に増加した。また免疫染色法の結果から Obif の細胞内局在は形質膜であること、Obif はその細胞外領域のみでも骨芽細胞に分化・成熟を促すこと、in vitro での Obif ノックダウン実験の骨芽細胞に対する著明な分化・成熟抑制作用が認められた。

我々は、マウス増殖軟骨細胞層および前肥大軟骨細胞層に高い発現を示す Cfm2 に着目した。Cfm2 の生物学的な機能解析を行うために、Cfm2 ノックアウトマウスを作製し解析したところ、野生型と比較して有意な変化は認められなかった。Cfm2 にはパラログである Cfm1 が存在することから、我々は Cfm1 の発現について解析した結果、Cfm2 と同様にマウス増殖軟骨細胞層および前肥大軟骨細胞層に高い発現を示すことを見出した。そこで我々は、Cfm2 ノックアウトマウスに顕著な変異が見られないのは、Cfm1 による機能補償によるものと推測して、Cfm1 および Cfm2 のダブルノックアウト(DKO)マウスを作製した。この Cfm DKO マウスは、出生後に側彎症および後彎症を示し、この表現系は Filamin B 欠損マウスの表現系に相似していた。In situ ハイブリダイゼーション法により、Cfm DKO マウスの骨格異常は、軟骨細胞の早期分化によることを見出した。さらに Cfm DKO マウス

では野生型マウスと比較して、椎間板の軟骨性細胞数および椎体の成長軟骨の軟骨細胞数が著しく減少しており、同部位におけるアポトーシス陽性細胞数が有意に増加していた。次いで、初代軟骨細胞における免疫沈降法により、Cfm 蛋白質と Filamin 蛋白質が相互作用することだけではなく、Filamin-Smad3 複合体の形成には Cfm が必要であることを見出した。さらに我々は、Cfm DKO マウスの初代軟骨細胞では野生型と比較してアクチン線維束の形成が少なく、細胞の表面積が小さくかつ核の長軸長が短いことを見出した。以上の結果から、我々は本研究において Cfm1 と Cfm2 は Filamin と複合体を形成して軟骨性細胞におけるアクチン細胞骨格に必須の分子であることを示した。主要な骨格蛋白質である Filamin B の遺伝子変異は、アテロオステオジェネシス I 型と III 型、ブーメラン異形成、ラーセン症候群及び脊椎手根骨足根骨癒合症候群などの先天性骨系統疾患を引き起こすことが知られている。本研究が将来的にこのような先天性骨系疾患の診断法や治療法の開発につながることを期待される。

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 1 件)

Mizunashi K, Kanamoto T, Moriishi T, Muranishi Y, Miyazaki T, Terada K, Omori Y, Ito M, Komori T & Furukawa T, Filamin-interacting proteins, Cfm1 and Cfm2, are essential for the formation of cartilaginous skeletal elements. Human Molecular Genetics, 査読有, vol123, 2014, 2953-67
doi: 10.1093/hmg/ddu007.

〔学会発表〕(計 1 件)

水橋孝治、金本隆司、森石武史、村西由紀、宮崎敏博、寺田晃士、大森義裕、伊東昌子、小守壽文、古川貴久、Cfm は軟骨性細胞の分化制御に必須の分子である、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.protein.osaka-u.ac.jp/furukawa_lab/

6．研究組織
(1)研究代表者
古川 貴久 (FURUKAWA, Takahisa)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：50260609