

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463113

研究課題名(和文) 成長軟骨細胞が自ら産生する分泌性蛋白質による分化制御

研究課題名(英文) Screening of secretion proteins in mouse growth plate chondrocytes

研究代表者

日高 聖 (HIDAKA, Kiyoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10389421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：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をSST-REX法によって試み、マウス肋軟骨成長板軟骨から約70種のシグナル配列を有する分泌蛋白および膜蛋白質を同定した。この中から硬組織形成との関連が示されているIGFBP5およびFGFR5に注目し、IGFBP5は増殖軟骨細胞に、FGFR5は増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞にかけてそれぞれ特異的に発現していることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：In present study, we attempted to identify growth plate chondrocyte-derived secretory factors using an efficient signal sequence trap (SST) method. An SST library from mouse rib cartilage growth plate cDNA was constructed and screened. We focused on secreted protein IGFBP5 and membrane protein FGFR5 among more than 70 of proteins identified by the screening. Then we found that these were expressed at specific stage during the chondrocyte differentiation stage. IGFBP5 was highly expressed on proliferating chondrocytes, and FGFR5 was on the middle of proliferating/hypertrophic stage.

研究分野：小児歯科学

キーワード：軟骨細胞分化 分泌性蛋白質 IGFBP5 FGFR5

## 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り、したがって小児の成長・発育にとって根幹をなす生命活動である。ここで、成長板軟骨とは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こと、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こと、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/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考えた。この仮説を踏まえ、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研究を設計した。

## 2. 研究の目的

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、*in vivo*・*in vitro* 両面からの評価を加えるべく以下の実験を試みた。

- (1) 成長軟骨細胞分泌性蛋白質因子の同定 (SST-REX 法)
- (2) 候補因子 (IGFBP5, FGFR5 を含む) の成長板軟骨 (*in vivo*) での発現評価
- (3) 軟骨前駆細胞株 ATDC5 (*in vitro* 軟骨細胞分化モデル) を用いた発現評価

## 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クセス系により評価できるため、分泌性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。

### 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)<sup>+</sup> 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 パッケージ細胞に導入し、レトロウイルスライブラリを得た

### (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。

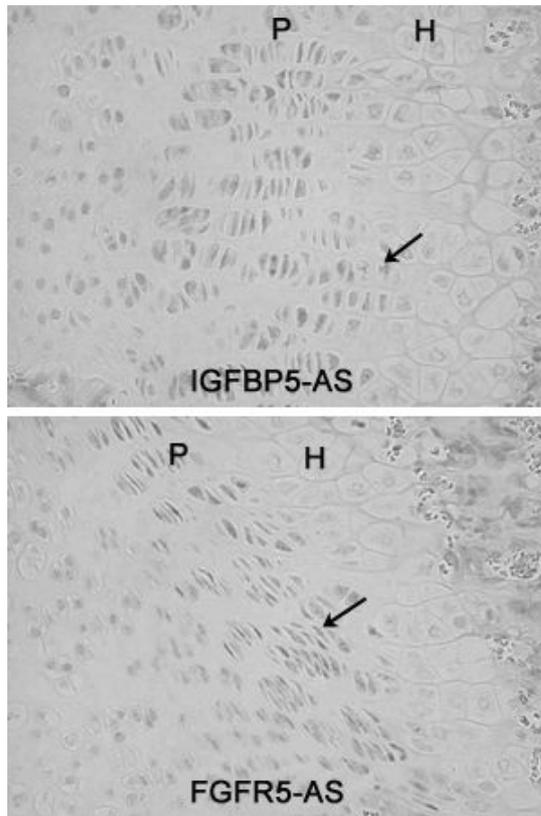
### (3) 軟骨細胞分化モデル ATDC5 細胞を用いた発現評価

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。

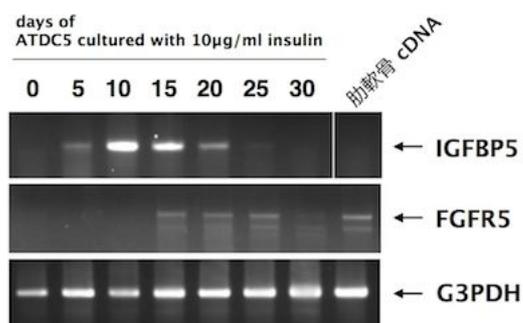
## 4. 研究成果

マウス肋軟骨成長板軟骨より 313 クローンを単離し、約 70 種の分泌蛋白および膜蛋白質を同定した。この中から硬組織形成との関連が示されている Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) および Fibroblast growth factor receptor 5 (FGFR5)

に注目し、*in situ* hybridization 解析によって、IGFBP5 は増殖軟骨細胞 (P) に、FGFR5 は増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞 (P~H) にかけてそれぞれ特異的に発現していることを突き止めた【図 1】。さらに、軟骨細胞分化モデル細胞株 ATDC5 より抽出した RNA を用いた RT-PCR 解析によって、同様の発現パターンを確認した【図 2】。



【図 1】



【図 2】

##### 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 6 件)

1. Asai E, Yamamoto M, Ueda K, Waguri S: Spatiotemporal alterations of autophagy marker LC3 in rat skin fibroblasts during wound healing process. *Fukushima J Med Sci* 17;64(1): 15-22, 2018 (査読有)
2. Kondo Y, Nishimata H, Hidaka K, Hasuwa T, Moriuchi H, Fujiwara T, Hoshino T: Draft genome sequence of a clinical isolate of *Streptococcus Mutans* strain HM. *Genome Announc*, 5(33): doi:10.1128/genomeA.00826-17, 2017 (査読有)
3. 日高 聖、藤原 卓「どうしていますか？第一大臼歯の近心偏位と遠心移動」*小児歯科臨床* 22(9):66-71, 2017(査読無)
4. Endoh T, Yamamoto M: Effect of motivative music on cycling exercise. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 5(6): 421, 2016 (査読有)
5. 日高 聖「家族性に出現する歯の形成障害」*デンタルダイヤモンド* 40(16):19-20, 2015 (査読無)
6. Uemura T, Yamamoto M, Kametaka A, Sou YS, Yabashi A, Yamada A, Annoh H, Kametaka S, Komatsu M, Waguri S: A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane. *Mol Cell Biol* 34(9):1695-1706, 2014 (査読有)

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 日高 聖、今泉三枝：0 歳からはじめる歯科、成育歯科医療研究会第 21 回徹底討論会、神戸市、2018.2.14-15
2. 日高 聖、岡本篤剛、藤原 卓：クラウンディスタルシュー装着後に小

- 児歯科専門医が管理継続し良好な永久歯列を獲得しえた2例、第35回日本小児歯科学会九州地方会大会および総会、佐賀県佐賀市、2017.11.19
3. 佐藤恭子、釜崎陽子、西口美由季、日高 聖、藤原 卓：がん診療拠点病院における小児科と小児歯科の医療連携 第55回日本小児歯科学会大会、福岡県北九州市、2017.5.25-26 小児歯誌 55(2):219, 2017
  4. Kondo Y, Motomura Y, Murayama K, Nishimata H, Nishida K, Imamura K, Satoh K, Hidaka K, Kamasaki K, Nishiguchi M, Hoshino T, Fujiwara T: Construction of New Risk Predictive Model based on Machine Learning Method. 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia, Tokyo, Japan, 2016.5.26-28 {The Japanese Journal of Pediatric Dentistry 54 (2) p.244, 2016}
  5. Shimura K, Nagai T, Seto Y, Fukuhara S, Yamamoto M, Waguri S, Nagao M: Determination of a charge-variant pattern of recombinant erythropoietin using a unified affinity chromatography-cief device. 32nd International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis, Niagara-on-the-Lake, ON, Canada, 2016.4.3-7
  6. Endoh T, Yamamoto M: Effect of motivative music on cycling exercise. The 71th Japanese Society of Physical Fitness and Sports Medicine, Morioka, Iwate, Japan, 2016.9.23-25
  7. 西田佳世、近藤好夫、西俣はるか、今村圭吾、佐藤恭子、日高 聖、釜崎陽子、西口美由季、星野倫範、齋藤 幹、山崎要一、朝田芳信、八若保孝、苅部洋行、新谷誠康、早崎治明、藤原 卓：子どものこころと身体を見守り支援する大規模データ収集とリスク予測モデル構築の試み、第33回日本小児歯科学会九州地方会大会および総会、福岡、2015.11.15
  8. 河井真理、日高 聖、切石健輔、倉田眞治、讃岐拓郎、野上朋之、鮎瀬てるみ、吉田治志、久松徳子、小野成美、田上直美、鮎瀬卓郎：Hotz床印象採得時の経皮的動脈血酸素飽和度の変化、第32回日本障害者歯科学会学術大会、名古屋、2015.11.6-8
  9. 釜崎陽子、星野倫範、田上直美、西口美由季、佐藤恭子、日高 聖、近藤好夫、西俣はるか、今村圭吾、西田佳世、藤原 卓：自閉症スペクトラム障害児の歯科治療に対する適応性に関する後方視的検討、第32回日本障害者歯科学会学術大会、名古屋、2015.11.6-8
  10. 永井千晴、植村武文、山本雅哉、澤田直樹、竹之下誠一、和栗聡：Functional analyses of dipeptidase-1 (DPEP1) using a colon / gastric cancer-derived cell line, HCC56. 第120回日本解剖学会総会全国学術集会・第92回日本生理学会大会 神戸、2015.3.21-23
  11. 植村武文、山本雅哉、安納弘道、小松雅明、和栗聡：オートファジー隔離膜の形成過程に関する新規細管集合体、第56回日本組織細胞化学会総会・学術集会、大阪、2015.10.3-4
  12. 志村清仁、長井俊彦、瀬戸善一、福原修一、山本雅哉、和栗 聡、永尾雅哉：APCEによる組換えエリスロポイエチンの等電点パター

- ン決定、第 35 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、岡山、2015.10.15
13. 釜崎陽子, 日高 聖, 佐藤恭子, 西口美由季, 西俣はるか, 佐々木康成, 星野倫範, 藤原 卓: 当院小児歯科外来における摂食嚥下患者の実態調査, 第 31 回日本障害者歯科学会学術大会, 宮城, 2014.11.14-16
  14. 西俣はるか, 河井真理, 近藤好夫, 佐藤恭子, 日高 聖, 齋藤 幹, 釜崎陽子, 西口美由季, 倉田眞治, 星野倫範, 鮎瀬卓郎, 藤原 卓: 過去 6 年間の全身麻酔下歯科治療の実態調査, 第 31 回日本障害者歯科学会学術大会, 宮城, 2014.11.14-16
  15. 日高 聖 「他科との連携で成育歯科の特性を活かす」シンポジウム S・子どもが主体の連携から考える I 期治療の可能性と限界、第 19 回成育歯科医療研究会大会、大阪府大阪市、2014.9.3-4
  16. Hidaka K, Hoshino T, Fujiwara T: Morphologic variation and origin of Streptococcus mutans isolated from a child with infective endocarditis. The 9th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia 2014, Singapore, 2014.8.22-24
  17. 植村武文, 山本雅哉, 亀高愛, 曾友深, 矢橋あつ子, 山田茜, 亀高諭, 小松雅明, 和栗聡: オートファジー隔離膜の形成過程には小胞体由来細管集合体が関与する、第 14 回日本蛋白質科学会年会、横浜、2014.6.25-27
  18. 植村武文, 山本雅哉, 亀高愛, 曾友深, 矢橋あつ子, 山田茜, 亀高諭, 小松雅明, 和栗聡: オートファジー隔離膜の形成過程には小胞体由来細管集合体が関与する、第 66 回日本細胞生物学会、奈良、2014.6.11-12
  19. 植村武文, 山本雅哉, 亀高愛, 曾友深, 矢橋あつ子, 山田茜, 亀高諭, 小松雅明, 和栗聡: オートファジー隔離膜の形成過程には小胞体由来細管集合体が関与する、第 119 回日本解剖学会全国学術集会、栃木、2014.3.27-29
  20. Waguri S, Uemura T, Yamamoto M, Kametaka A, Sou Y, Yabashi A, Yamada A, Annoh H, Kametaka S, Komatsu M: A cluster of isolation membrane-associated tubules represents a part of omegasome during final steps of autophagosome formation. 2014 Annual Meeting of American Society of Cell Biology, Philadelphia, PA, 2014.12.6-10
- 〔図書〕(計 3 件)
1. 日高 聖: 「哺乳障害」医学書院、今日の治療指針、2019 (in press)
  2. 桑名俊一、山本雅哉: 理工図書、コメディカル専門基礎科目シリーズ・生理学、2016、第 12 章 pp.283-302
  3. 和栗聡、植村武文、山本雅哉、矢橋あつ子: 「哺乳類オートファジー関連オルガネラの電子顕微鏡観察」日本顕微鏡学会、顕微鏡、2014, pp.118-123
- 〔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 (HIDAKA, Kiyoshi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
助教  
研究者番号：10389421

### (2) 研究分担者

山本 雅哉 (YAMAMOTO, Masaya)  
植草学園大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：20446115

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし