

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861671

研究課題名(和文)Vwc2-likeによる石灰化促進メカニズムの解明と臨床応用に関する研究。

研究課題名(英文)Study on elucidation of calcification promoting mechanism by Vwc2-like and clinical application of Vwc2-like

研究代表者

大山 巖雄(OHYAMA, Yoshio)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：30451975

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): Vwc2タンパク質存在下で72時間培養した野生型マウス初代骨芽細胞及びMC3T3-E1細胞のALP活性が非存在下でのものと比較して有意に上昇した。また、MC3T3-E1細胞において3週間Vwc2タンパク質存在下で培養すると、非存在下で培養したものと比較して有意に石灰化の亢進が見られた。さらに、Vwc2タンパク質存在下に培養したマウス初代細胞から採取したmRNAにおいて骨芽細胞分化マーカーの発現が有意に上昇していた。in vivoの実験においてもNegative Control群と比較してVwc2群での有意な骨形成の亢進が見られ、石灰化速度の有意な上昇を認めた。

研究成果の概要(英文): The ALP activity of mouse primary osteoblasts and MC3T3-E1 cells cultured for 72 hours in the presence of Vwc2 protein was significantly increased compared with that in the absence. In addition, when MC3T3-E1 cells were cultured in the presence of Vwc2 protein for 3 weeks, there was a significant increase in mineralization compared with those cultured in the absence. Furthermore, expression of osteoblast differentiation marker was significantly increased in mRNA collected from primary mouse cells cultured in the presence of Vwc2 protein. Even in the in vivo experiments, a significant increase in osteogenesis was observed in the Vwc 2 group as compared with the negative control group, and a significant increase in calcification rate was observed.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨造成 細胞外タンパク質 システインノットプロテイン システインリッチドメイン

1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor- (TGF-)スーパーファミリーは、BMP、TGF-、GDF およびアクチピンを含むサイトカインの総称であり、哺乳類において約 40 種類が報告されている。細胞増殖、細胞死、細胞分化、胎児期の体軸の形成および種々の組織の形成は、TGF- スーパーファミリーのサイトカインによって制御される。これら TGF- スーパーファミリーのタンパク質は、細胞表面上の特異的な受容体に結合し、Smad などのタンパク質のリン酸化を介してシグナルを伝達する。

Bone morphogenetic protein-2(BMP-2)は、in vivo において骨形成誘導する TGF- スーパーファミリーのよく知られた成長因子である。ヒト組換え BMP-2 の臨床使用は、米国食品医薬品局 (FDA) によって 2002 年に承認されて以来、頭蓋顔面再建や骨修復、骨再生手術に使用されている。BMP-2 は侵襲を伴う自家骨移植なしに骨形成を誘導する分子であり、その臨床応用は、画期的な治療として注目されている。しかしながら、大量の BMP-2 の必要性に起因する経済的負担、BMP-2 の適切な保持・徐放の困難さおよび BMP により誘導される炎症反応をはじめとした副作用などの問題によって有効活用されていないのが現状である。

TGF- スーパーファミリーのタンパク質の作用は、Noggin、Chordin、および Follistatin (FS) などのアンタゴニストによって細胞外で制御される。これらのアンタゴニストであるシステインノットプロテイン (CKP) は、TGF- スーパーファミリーに結合するための機構であるシステインリッチドメインを有する。

我々の以前の研究で、2 つの新たな CKP である VWC2 および VWC2-like を、パイオインフォマティクス解析を介して同定した。VWC2 と VWC2-like は構造が類似しており、構造的同

一性は、ヒトで 60%、マウスで 55% である。VWC2-like は 222 アミノ酸から、VWC2 は 325 アミノ酸から成り、どちらも 2 つのシステインリッチドメインを有する。以前の研究では、我々は、VWC2-like が MC3T3-E1 細胞での Osterix 発現を調節することによって石灰化結節形成を促進することを示した。

2. 研究の目的

本研究を開始するにあたり、2 つの分子間の構造に類似性が見られるために、VWC2 にも骨形成促進作用があると仮定した。したがって、本研究では、in vitro および in vivo での基質石灰化に対する VWC2 の単剤使用における作用を解析することを目的とした。

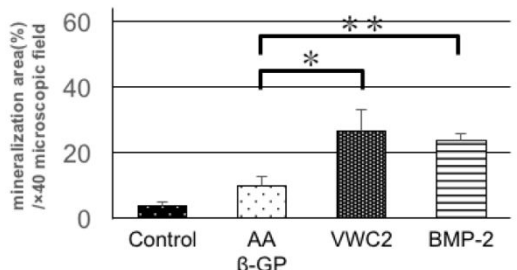
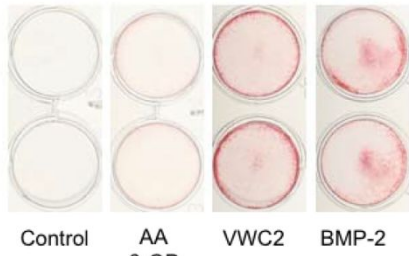
3. 研究の方法

マウス頭蓋骨由来の cell line である、MC3T3-E1 細胞を骨芽細胞へ分化誘導し VWC2 を作用させ、アリザリンレッド S による石灰化小塊の染色、アルカリホスファターゼ活性能試験を行った。

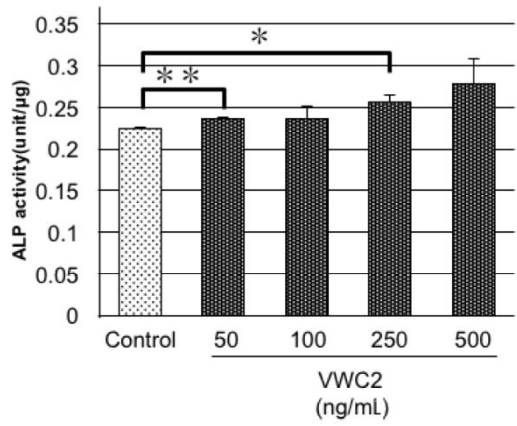
また、生体内での VWC2 による骨形成への関与を確認するために、5 週齢の ICR マウスの頭頂骨に直径 3.5mm の円形の欠損を作り、コラーゲンスポンジに VWC2 を含ませて移植した。欠損部はマイクロ CT にて経時的に観察を行った。さらに、新生骨が形成され始めてから 6 日間ごとに骨に沈着する蛍光物質を注射し、そのラベル間距離を測定して新生骨の石灰化速度を測定した。さらに、マウス新生児頭蓋骨より細胞を酵素処理により抽出し、この細胞に VWC2 を作用させ、real-time PCR にて骨芽細胞分化マーカーの発現を測定、対照群と比較した。

4. 研究成果

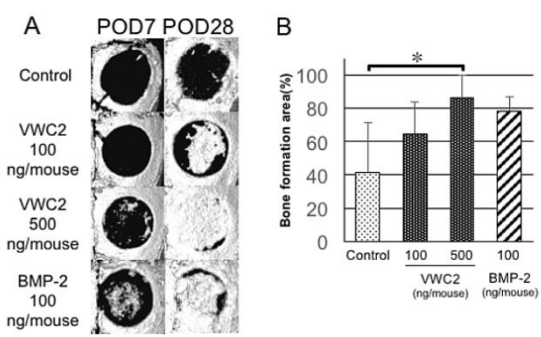
MC3T3-E1 細胞での石灰化試験では、VWC2 処理後 3 週間で、対照群と比較して VWC2 処理群で有意な石灰化結節形成の増加が見られた。



MC3T3-E1 細胞でのアルカリホスファターゼ (ALP) 活性の解析では、VWC2 処理後 3 日での ALP 活性が対照群と比較して有意に上昇していることが判明した。

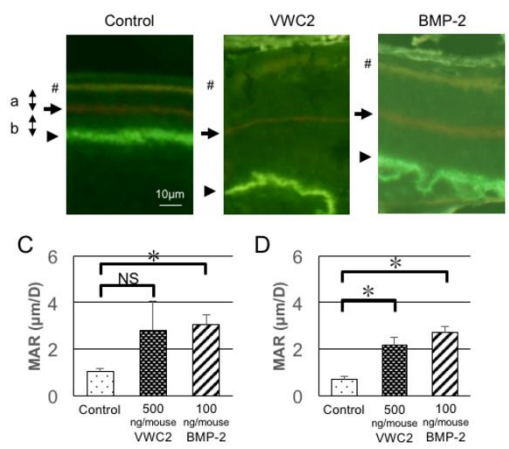


マウス頭蓋骨欠損モデルへの VWC2 の移植実験では、マイクロ CT 解析により欠損部への新生骨添加が観察された。対照群と比較して、VWC2 処理群で欠損部への骨添加面積が有意に大きいことが示された。

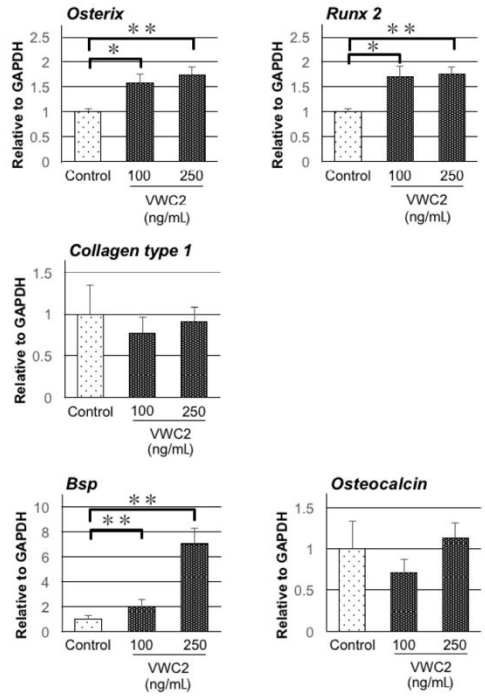


蛍光ラベリングによる骨石灰化速度の測定

では、VWC2 処理後 13-19 日での骨石灰化速度が対照群と比較して有意に速かった。



mouse primary calvaria cell を用いた、real-time PCR による骨芽細胞分化マーカーの発現解析では、VWC2 作用後 24 時間で、初期マーカーである Osterix, Runx2、VWC2 作用後 14 日で、後期マーカーである骨シアロタンパク質 (BSP) の発現が対照群と比較して有意差を持って上昇していた。



本研究では、CKP のメンバーである VWC2 が Osterix および Runx2 の発現の上方制御に関与し、invitro での基質石灰化および invivo での骨形成を促進することを発見した。以前、VWC2 は中枢神経系において発現され、「Brorin」の名称でニューロン分化を促進し、

BMP-2 および 6 によって誘導される ALP 活性ならびに BMP 特異的 Smad1/5/8 のリン酸化を阻害することが報告された。本研究では、ALP 活性および骨形成マーカーの発現が、VWC2 単剤での処理で促進されることを示した。BMP の活性を下げるとの以前の研究では BMP 存在下で、さらに 10%FBS 含有の培地を用いていたが、我々は 1%FBS 含有の培地で BMP 非存在下に MC3T3-E1 細胞を培養した。これらの結果は、VWC2 が、豊富な増殖因子を含む高濃度の FBS の存在下で、BMP による強力な骨分化誘導に対しては抑制的に作用するが、正常条件下では骨形成に促進的に作用することが示唆された。

VWC2 が骨形成の促進に働くメカニズムを 2 つ考察した。1 つ目は、VWC2 が BMP の阻害剤を抑制することにより、骨形成に促進的に働く機序である。Crossvinless 2 (CV2) は VWC2 同様システインリッチドメインを有する Chordin ファミリーの一員であり、BMP の阻害剤の一つである Chordin に結合し、Chordin の BMP2 阻害作用を阻害すると報告されている。VWC2 が CV2 と同様な機序で骨形成を促進する可能性が考えられる。2 つ目は、VWC2 が骨形成を抑制する成長因子の活性を阻害することである。TGF- β およびアクチピンは、TGF- β スーパーファミリーのメンバーであり、骨形成を阻害することが報告されている。FS や性腺ホルモンとして定義されているインヒピンはシステインリッチドメイン様の構造を有しており、アクチピンの機能を抑制し、また骨芽細胞分化を調節することが報告されている。VWC2 も同様に抗骨形成作用を有する TGF- β およびアクチピンのようなタンパク質の活性を阻害する可能性が考えられる。これらの仮説は、今後の研究で詳細に検討する必要がある。

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 7 件)

Tomoki Kanemaru, Yoshio Ohyama, Kazuhiro Aoki, Atsushi Tamura, Nobuhiko Yui, Satoshi Yamaguchi, Yoshiyuki Mochida. Modulation of Matrix Mineralization by von Willebrand Factor C Domain Containing 2 in Vivo and in Vitro. J Oral Tissue Engin. 査読有 Volume 15 (2017) Issue 3 Pages 131-142

Ohyama Y, Lin JH, Govitvattana N, Lin IP, Venkitapathi S, Alamoudi A, Husein D, An C, Hotta H, Kaku M, Mochida Y. FAM20A binds to and regulates FAM20C localization. Sci Rep. 査読有 2016 Jun 13;6:27784.

Badri MK, Zhang H, Ohyama Y, Venkitapathi S, Alamoudi A, Kamiya N, Takeda H, Ray M, Scott G, Tsuji T, Kunieda T, Mishina Y, Mochida Y. Expression of Evc2 in craniofacial tissues and craniofacial bone defects in Evc2 knockout mouse. Arch Oral Biol. 査読有 2016 May 3;68:142-152

Haytham Jaha · Dina Husein · Yoshio Ohyama · Dongliang Xu · Shigeki Suzuki · George T.-J. Huang · Yoshiyuki Mochida. N-terminal Dentin Sialoprotein fragment induces type I collagen production and upregulates dentinogenesis marker expression in osteoblasts. Biochemistry and Biophysics Reports. 査読有 Volume 6, July 2016, Pages 190-196

[学会発表](計 21 件)

金丸 智紀、大山 巖雄、持田 欣幸、田村

篤志、青木 和広、由井 信彦、山口 聰 .
WVC2 タンパク質による骨形成促進メカニ
ズムの解明。第 34 回骨代謝学会学術集会
大阪 2016.7.20-23

金丸 智紀、大山 巖雄、道 泰之、鵜澤 成
一、持田 欣幸、山口 聰。下顎骨及び肩
甲骨から採取したヒト骨芽細胞様細胞の
骨形成能の比較。第 70 回日本口腔科学会
福岡 2016.4.15-17

Yoshio Ohyama, Narikazu Uzawa,
Yasuyuki Michi, Miho Suzuki, Masashi
Yamashiro, Tomoyuki Yano, Kazuki
Hasegawa, Kiyoshi Harada. A
Retrospective Analysis of
Reconstructions after Mandibular
Resection with Condyle Head. The Joint
Meeting of 4th Congress of Asian
Society of Head and Neck Oncology &
39th Annual Meeting of Japan society
for Head and Neck Cancer. Kobe. Japan
Jun 3-6 2015.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大山 巖雄 (OHYAMA, Yoshio)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・非
常勤講師
研究者番号 : 30451975

(4)研究協力者

金丸 智紀 (KANEMARU, Tomoki)