

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月20日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791422

研究課題名（和文）サイトカインLECT2の軟骨細胞に対する作用機序の解析

研究課題名（英文）Effects of LECT2 on chondrocyte differentiation

研究代表者

奥村 彰規（OKUMURA AKINORI）

独立行政法人国立国際医療研究センター・臓器障害研究部・上級研究員

研究者番号：90392357

研究成果の概要（和文）：サイトカインLECT2について、軟骨細胞に対してどのような作用をおぼよすかを、Lect2ノックアウト（Lect2-KO）マウスおよび軟骨前駆細胞株を使って探索した。全身の骨形態学的解析および大腿骨の病理切片を作製し成長板軟骨の形態学的観測を行った結果、軟骨細胞の分化に差異が認められた。軟骨前駆細胞株の分化誘導時に、LECT2がどのように作用するかをDNAマイクロアレイで解析した結果、軟骨細胞分化に作用する因子を調整する可能性が見出された。これらから、LECT2が軟骨細胞の分化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Regulatory mechanisms of chondrocyte differentiation in the growth plate are still not fully understood. In this study, we analyzed effects of LECT2 on growth plate chondrocyte differentiation using Lect2-deficient mice and a prechondrocytic cell line. Histological analysis revealed that Lect2-KO mice have slightly abnormal growth plate structure. DNA microarray analysis shows that addition of LECT2 leads to changes in factors of chondrocyte differentiation in prechondrocytic cell line. These results suggest that LECT2 might participate in the differentiation of growth plate chondrocyte.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨・軟骨代謝学、LECT2、成長板軟骨

1. 研究開始当初の背景

サイトカインLECT2（Leukocyte cell-derived chemotaxin 2）は、Yamagoeらにより、ヒト好中球走化性因子として報告された。このLECT2は、脊椎動物で保存されており、

哺乳類では肝細胞で特異的に産生され、血中に分泌されている。また、同時期にHirakiらによりin vitroで軟骨細胞の増殖促進作用やプロテオグリカン生成促進作用があり軟骨基質中に蓄積しているタンパク質とし

て LECT2 が chondromodulin-II として報告された。また、骨芽細胞増殖促進活性を持つとの報告もある。

長管骨の成長は、成長板軟骨の軟骨細胞に重要な役割があり、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞へと分化・成熟する過程が必要となる。軟骨無形成症や骨端症は、この成長板軟骨のメカニズムが破綻したり損傷を受けたりして起こる。これらの原因・発症機序について、これまで多くの研究がなされ、徐々に明らかになりつつあるものの、より効果的な治療法の確立のためには、さらなる研究が必要である。これら軟骨細胞の分化過程は、サイトカインなどが作用して厳密に制御されている。LECT2 は、肝細胞で特異的に産生され、血中に分泌されているサイトカインであり、上述のように軟骨細胞の増殖促進因子でもある。肝細胞由来の分泌タンパクのいくつかは、肝臓増殖因子 HGF をはじめ、軟骨細胞の増殖促進作用やプロテオグリカン生成促進作用が知られており、慢性肝疾患の合併症として起こる骨・軟骨疾患への関与も指摘されている。LECT2 も同様、肝臓と骨・軟骨組織を仲介する因子と考えられ、このタンパクの軟骨細胞に作用する機序を解明することは、肝疾患に伴う軟骨疾患の病態解明や、治療応用に役立つはずである。しかし、LECT2 が、軟骨細胞の分化に作用するか、そしてその機序は一切不明である。

研究代表者らは、これまで様々な生理活性を持つと考えられる LECT2 についてその機能を解析しており、生体内での機能を調べるために LECT2 遺伝子欠損 (Lect2-KO) マウスを作製している。

2. 研究の目的

最終目標として、成長板軟骨細胞に着目した骨端症をはじめとする軟骨関連疾患の発症メカニズム及び治療法の開発に応用したい。そのために、本研究では、Lect2-KO マウスおよび培養軟骨前駆細胞を用いて、LECT2 の軟骨形成に対する作用メカニズムを解析することで、軟骨細胞分化の新しい制御機構を明らかにすることを目的とした。また、同時に生理活性を持つ LECT2 がどのような高次構造となっているかを明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 軟 X 線フォトグラフィ

生後 45 日目の C57BL6/J 背景の野生型メスマウスおよび Lect2-KO メスマウス、生後 48 日目の BALB/c 背景の野生型オスマウスおよび Lect2-KO オスマウスを軟 X 線を SOFRON type SR0-M50 で、25 kV、2.5 mA、2 分間撮

影し、骨形態学的観察を行った。

(2) 透明骨格標本

生後 1 日目の BALB/c 背景の野生型マウスおよび Lect2-KO マウスで軟骨をアルシアンブルー 8GX、硬骨をアリザリンレッドで染色して透明骨格標本を作製した。

LECT2 の骨・軟骨形成に対する作用メカニズムを解析するために、全身骨格と、詳細な解析を行うために、病理切片を作製し、野生型マウスと Lect2-KO マウスで全体の骨・軟骨形成の違いを調べた。

(3) 病理切片作製

1, 2, 4 週齢の BALB/c 背景の野生型マウスおよび Lect2-KO マウスから大腿骨を摘出し、EDTA 脱灰したのちに組織切片を作製した。H&E 染色またはサフラニン O 染色を行い局所的な解析を行った。

(4) Lect2 処理した培養軟骨前駆細胞のトランスクリプトーム解析

培養細胞に LECT2 を添加し、細胞分化に及ぼす影響についてアルシアンブルー染色をして比較した。軟骨前駆細胞株に、CHO 細胞由来のマウスリコンビナント LECT2 を作用させて 6 時間後の RNA を調製し、アジレント社製の DNA マイクロアレイで網羅的に遺伝子の発現を調べた。遺伝子発現のデータ解析は GeneSpringGX で解析を行った。得られた変量データについて、生理機能解析およびネットワーク解析は、分子間ネットワーク/パスウェイ解析データベース Ingenuity Pathway Analysis で行った。

(5) LECT2 の高次構造解析

CHO 細胞よりマウスおよびヒトリコンビナント LECT2 を精製した。ジスルフィド結合解析は、それぞれ、システイン還元・非還元の状態でのヨード酢酸処理を行い、トリプシン消化または Asp-N 消化を行ったのちにマトリックス支援レーザー脱離イオン化法によるマスマスペクトロメトリー解析を行った。金属イオンの結合確認は、エレクトロスプレーイオン化法によるマスマスペクトロメトリー解析およびエックス線吸収微細構造分析により解析した。

4. 研究成果

(1) Lect2-KO マウスによる軟骨形成の作用解析

① 軟 X 線による全身骨格の評価

6 週齢の C57BL6/J および BALB/c 背景の Lect2-KO マウスについて、軟 X 線写真撮影を行い、全身骨格に異常が見られるかどうかを検討した。その結果、いずれのマウス背景・

性別でも全身骨格に大きな差異は認められなかった (図 1)。



図 1. 生後 4 5 日目の軟 X 線写真像

② 透明骨格標本による全身骨格の観察

生後 1 日目の BALB/c 背景の野生型および Lect2-KO マウスで軟骨をアルシアンブルー、硬骨をアリザリンレッドで染色して透明骨格標本を作製し、全身骨格に異常が見られるかどうかを検討した。その結果、図 2 のように大きな差異は認められなかった (図中の Lect2-KO にある肋骨などの変化は作製により生じた artifact)。

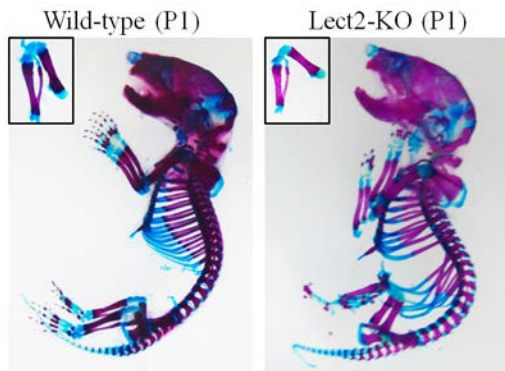


図 2. 生後 1 日目の透明骨格標本。左上に大腿骨と脛骨のみを示す。

③ 大腿骨の病理切片による観察

1、2、4、6 週齢の野生型および Lect2-KO マウス大腿骨より組織切片を作製した。組織学的解析から、Lect2-KO マウスでは成長板軟骨細胞において特に 2 および 4 週齢において肥大軟骨細胞への分化・成熟に異常が見られることが判明した (図 3)。

これらの知見から、LECT2 を介した軟骨細胞の分化・成熟に関与する機構が存在することが確認できた。ただし、この変化は病理切片による観察でも 6 週齢までに差がほとんど見られなくなり、軟 X 線フotグラフィーや透明骨格標本などの巨視的な観察では確認できず、他のなんらかの因子により骨・軟骨形成が補われている可能性が考えられた。

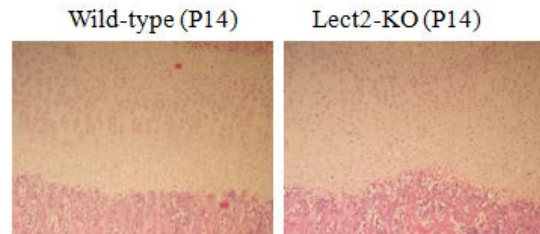


図 3. 生後 14 日目の成長板軟骨の様子 (H&E 染色像)

(2) 培養細胞を用いた遺伝子発現解析

軟骨前駆細胞株の分化誘導時に、CHO 細胞由来のマウスリコンビナント LECT2 を作用させて 6 時間の RNA を調製し DNA マイクロアレイ解析を行った。変動がみられた遺伝子群について、どの転写因子の制御を受けているか調べることで、添加した LECT2 のシグナル伝達の最終ポイントを探した。全体の変化は少ないながらも 1.5 倍以上の変動を見せた遺伝子群の中に、軟骨細胞の分化・成熟に関与する遺伝子も含まれていた。パスウェイ解析より、これらの遺伝子は特定の転写因子の調節を受けている可能性が見出された (図 4)。

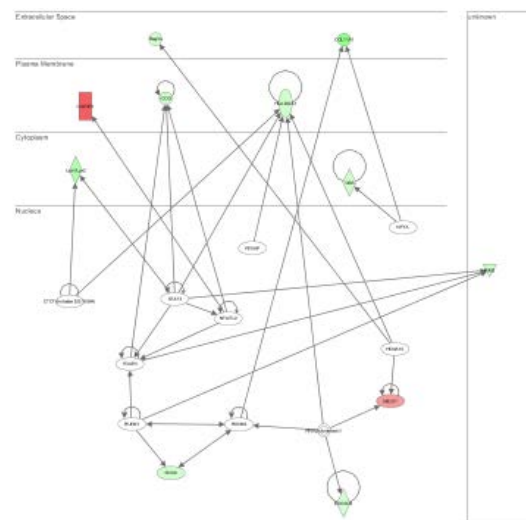


図 4. 軟骨前駆細胞の分化誘導時に LECT2 を添加した際に変動する主要遺伝子群とそれらを制御する転写因子の関連図

2009年12月2-4日

(3) LECT2の機能に関する構造解析

培養細胞を用いた解析を行う中で、活性が安定しないケースが生じたため、LECT2のタンパク化学的解析を行うこととした。

① LECT2のジスルフィド結合解析

マウスおよびヒトLECT2を、システイン還元・非還元状態でマトリックス支援レーザー脱離イオン化法によるマスマスペクトロメトリ解析を行った結果、LECT2の中にあるシステイン残基6つが3つのジスルフィド結合(Cys25-Cys60, Cys36-Cys41, Cys99-Cys142)を形成していることがわかり、全部の結合様式が決定できた。

② LECT2の金属イオン結合解析

LECT2はアミノ酸配列の相同性から亜鉛イオンを活性中心にもつタンパク質であるペプチダーゼM23のグループに分類されている。しかしLECT2が亜鉛イオンを結合するかどうかは不明であった。そこで、LECT2の生理活性の探索の一環として、亜鉛イオン結合タンパク質であるか否かをエレクトロスプレーイオン化法によるマスマスペクトロメトリ解析およびエックス線吸収微細構造分析により解析した。その結果、LECT2は亜鉛結合タンパク質であることを明らかとした。

今後の研究では、これら特性に注意を払い、失活しないような条件下でLECT2の活性測定を行う必要性を見出した。

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)

- (1) Akinori Okumura, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Tomoya Okabe, Yuki Hashimoto, Katsuyoshi Nakazato, Hideaki Ohno, Yoshitsugu Miyazaki, Satoshi Yamagoe, "Identification and assignment of three disulfide bonds in mammalian leukocyte cell-derived chemotaxin 2 by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry" *BioScience Trends* **3**, 139-143 (2009)、査読有
<http://www.biosciencetrends.com/getabstract.php?vol=3&issue=4&spage=139>

[学会発表] (計1件)

- (1) 奥村 彰規、大川原 明子、山越 智 "ガラクトサミン/LPS 肝障害モデルを用いたLECT2の機能解析" 第39回日本免疫学会総会・学術集会、大阪国際会議場(大阪)、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 彰規 (OKUMURA AKINORI)

独立行政法人国立国際医療研究センター・臓器障害研究部・上級研究員

研究者番号: 90392357