

## 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 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21591943

研究課題名（和文） 神経系細胞と間葉系細胞の新たな接点の探索

研究課題名（英文） Investigation of new relations between neural and skeletal tissues

研究代表者

樋口 周久（ HIGUCHI CHIKAHISA ）

大阪大学・保健センター・助教

研究者番号：40432421

研究成果の概要（和文）：Netrin-1の骨芽細胞分化に対する作用としては、細胞増殖には大きな影響を与えず、骨芽細胞分化を抑制していることを見出し、Netrin受容体であるUnc5A-Cが恒常的に発現していることを確認した。Schwann細胞株や神経鞘腫より分泌される物質で骨形成に影響するものとして、Nogginを同定し、これが神経組織周囲の骨形成抑制作用の一旦を担っていると推測された。一方、神経系細胞で重要な役割が示されているMEK5-Erk5シグナル伝達系は、骨芽細胞内にも存在し、このシグナル伝達系は骨芽細胞分化抑制働いていることがわかった。

研究成果の概要（英文）：In order to explore new relations between neurological tissue and skeletal tissue, we investigated functions of Netrin-1, which is one of neural axon extension molecules, on osteoblasts. Moreover, we searched out a bone-formation inhibitory protein secreted by neuronal tumor. We demonstrated that Netrin-1 have inhibitory effects of osteoblastic differentiation without proliferative suppression. In addition, we identified one of bone-formation inhibitory factors, Noggin, secreted by neuronal tissues. On the other hand, MEK5-Erk5 signal transduction pathway exists in osteoblasts and it suppresses osteoblastic differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨芽細胞分化・Netrin・Unc5・神経組織・Schwannoma・Noggin・Mek5-Erk5

### 1. 研究開始当初の背景

神経系組織と骨軟骨組織との間には臨床的な経験から何らかの相互作用、特に末梢神経の骨軟骨組織への影響が考えられる。たとえば、分娩麻痺による末梢神経障害では、成長とともに患側の長管骨は健側に比べ短く、細い成長しかなされず、患側上肢は全体にサ

イズが小さいこと、神経線維腫症に合併する片側肥大症は、神経線維腫により四肢が肥大する病態で、長管骨の大きさは健側に比べ大きくなり、また著明な皮下脂肪組織増加を認めること、脳や脊髄損傷後の関節周囲の異所性骨化は神経系組織が骨形成を制御していることを示唆していることなどが挙げられ

る。これらのことを踏まえて、我々は神経系組織で BMP シグナルを修飾する因子が、骨軟骨組織を含む骨格系組織へ何らかの作用をしているとの仮説を立て、その作用を解析することとなった。

## 2. 研究の目的

研究背景で述べたとおり、神経系組織あるいは細胞が骨軟骨組織へ何らかの作用を及ぼしていることが推測されること、特に神経系組織の骨形成抑制の作用があるとの仮説を立て、これらに関係する分泌因子や細胞内シグナル伝達系を見出し、解析することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 神経軸索伸張因子の 1 つである Netrin とその受容体の骨芽細胞機能に対する解析

①間葉系細胞株 (マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 およびマウス骨髄間質細胞株 ST2) における神経系組織発現因子 (Netrin およびその受容体) の発現を RT-PCR 法にて確認

②マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の骨芽細胞分化に対する Netrin-1 の作用を解析

③マウス骨軟骨組織における Netrin-1 の発現を抗 Netrin-1 抗体を用いた免疫染色で解析し、確認

(2) Schwann 細胞および神経系腫瘍から分泌される骨形成抑制因子の同定および解析

①神経系腫瘍が骨形成抑制する臨床的現象から、神経系の発生に重要で高発現が報告されている Noggin に注目し、神経系腫瘍を含む軟部腫瘍におけるその発現を確認

②Schwannoma に注目し、手術で得られた腫瘍組織における Noggin の発現を mRNA およびタンパクレベルでの発現を確認

③Schwannoma からの抽出物質による骨芽細胞分化への作用の解析

(3) 神経系細胞で重要な役割が示されている MEK5-Erk5 シグナル伝達系の骨芽細胞における機能の解析

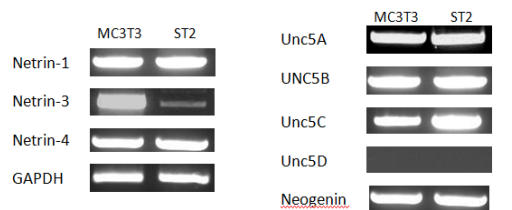
①マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 および筋芽細胞株 C2C12 における MEK5-Erk5 シグナル伝達系の存在の確認

② MEK5-Erk5 シグナル伝達系の骨芽細胞増殖および分化への作用の解析 (MEK5 阻害剤による)。

## 4. 研究成果

(1) 神経軸索伸張因子の 1 つである Netrin とその受容体の骨芽細胞機能に対する解析

①MC3T3-E1 および ST2 における Netrin およびその受容体である Unc5 の発現を RT-PCR 法で確認したところ、(図 1) で示す通り、

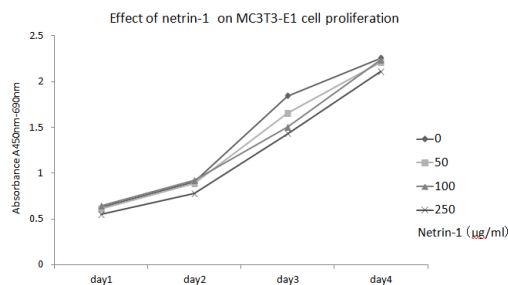


Expression of Netrins and Netrin receptors in mesenchymal cell lines

(図 1)

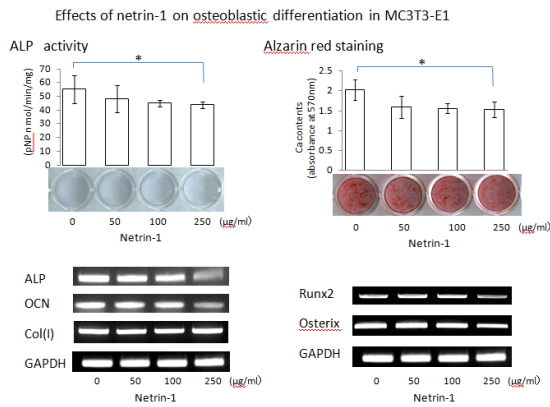
両間葉系細胞株において Netrin-1, 3, 4 および Unc5A, B, C の発現を認めた。一方、Unc5D の発現は見られなかった。また、その発現の経時的変化を MC3T3-E1 細胞株の 3 週間の培養で確認したところ、RT-PCR による発現量変化は認めなかった。したがって、これらのタンパクは骨芽細胞を含む間葉系細胞では、恒常的に発現していることが示唆された。

②Netrin-1 の骨芽細胞増殖および分化への作用を解析したところ、MC3TE-E1 細胞の増殖には影響を及ぼさなかった (図 2)。



(図 2)

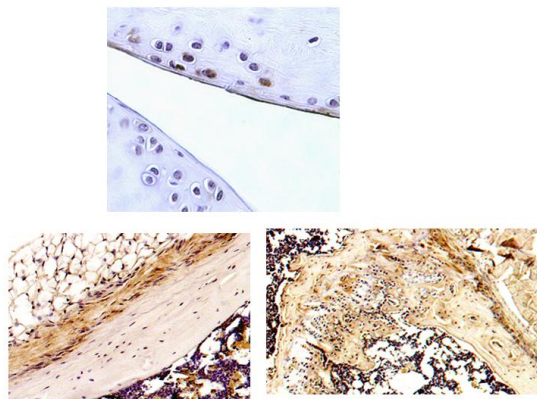
一方、MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化への Netrin-1 の作用を、アルカリフォスファターゼ活性測定、細胞外基質石灰化 (アリザリンレッド染色) 測定、オステオカルシンおよび骨芽細胞分化に重要な転写因子である Runx2 およびオステリックスの RT-PCR による発現変化にて確認した。Netrin-1 は高濃度 (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の培養液への添加にて、アルカリフォスファターゼ活性の抑制および細胞外基質石灰化抑制の作用を示した。これら結果と相関するように RT-PCR にて、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、Runx2 およびオステリックスの mRNA 発現の低下を認めた (図 3)。



(図 3)

これらの結果から、Netrin-1 は骨芽細胞増殖には影響せずに、骨芽細胞分化を抑制する作用を有すると考えられた。

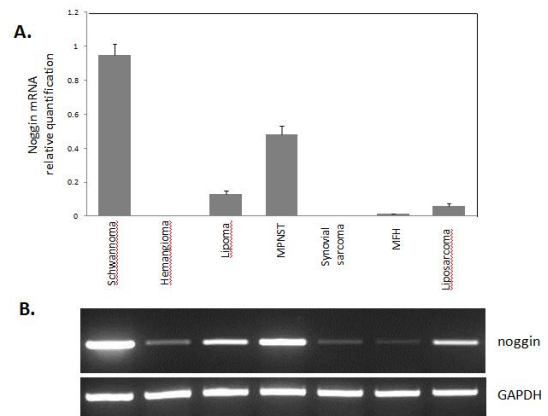
③生体内の骨格組織における Netrin-1 の作用を確認するために、その発現の局在を確認したところ、(図 4) で示す通り、関節軟骨表層の肥大軟骨細胞に軽度存在を認めた。また、外骨膜の細胞およびその基質にも Netrin-1 の存在を認めた。骨髄内の骨芽細胞様細胞にも発現を認めた。骨軟骨組織以外には、筋肉内にもその発現を認め、これは筋芽細胞に発現しているというこれまでの報告に矛盾しない結果であった。



(図 4)

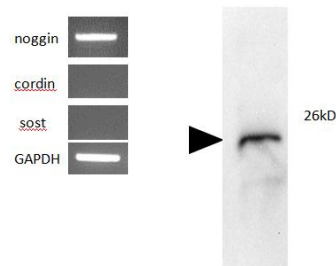
(2) Schwannoma における Noggin の発現およびその骨芽細胞分化抑制に対する解析

①まず、軟部腫瘍での Noggin 発現を RT-PCR 法にて確認したところ、Schwannoma および MPNST (悪性末梢神経鞘腫) で lipoma (脂肪腫) や hemangioma (血管腫)、synovial sarcoma (滑膜肉腫) など、他の軟部腫瘍に比べて Noggin の高発現を認めた (図 5)。



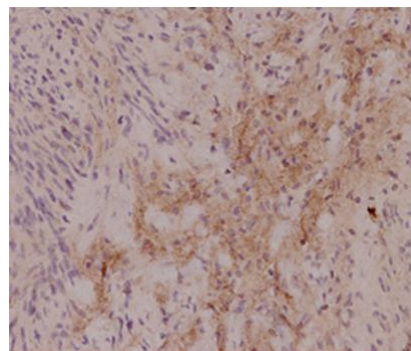
(図 5)

②Noggin を最も発現していた Schwannoma について、その DNA および抽出物質を採取し、RT-PCR およびウエスタンブロット法にてその mRNA 発現およびタンパク発現を確認したところ、それら発現を確認した (図 6)。



(図 6)

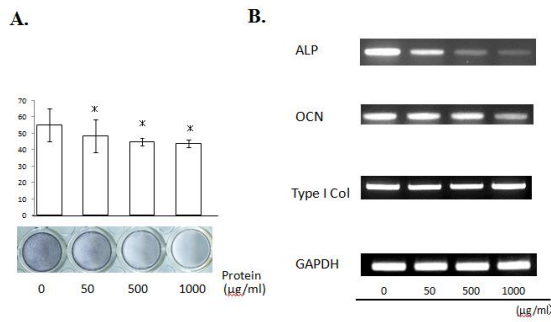
さらに腫瘍組織切片に抗 Noggin 抗体による免疫染色で、腫瘍内に Noggin の存在を示唆する結果が得られた (図 7)。これらより、神経系腫瘍では骨形成タンパク (BMP) シグナルを抑制する Noggin が発現していることが確認された。



(図 7)

③さらに、Schwannoma が分泌している Noggin が骨形成を抑制することを Schwannoma の抽出物質を含む培地で MC3T3-E1 骨芽細胞分化への作用をみることで確認した。予想通り、Schwannoma 抽出物質は骨芽細胞分化のマー

カーであるアルカリフォスファターゼ活性の低下をもたらし、またオステオカルシン mRNA 発現の低下ももたらした (図 8)。



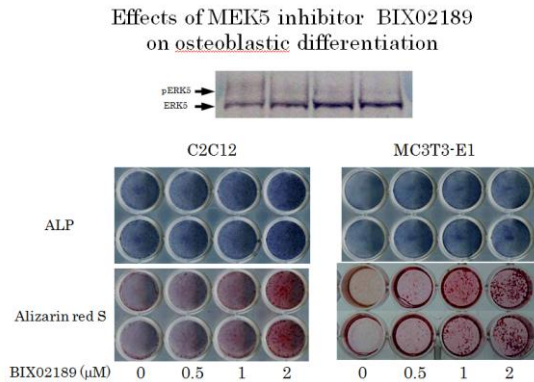
(図 8)

これにより、神経系組織・腫瘍は骨形成抑制作用を引き起こす一因に Noggin が考えられた。

(3) 神経系細胞で重要な役割が示されている MEK5-Erk5 シグナル伝達系の骨芽細胞における機能の解析

① マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 および筋芽細胞株 C2C12 における MEK5-Erk5 シグナル伝達系の存在はウエスタンブロット法により MEK5 および Erk5 タンパクの存在で確認した。

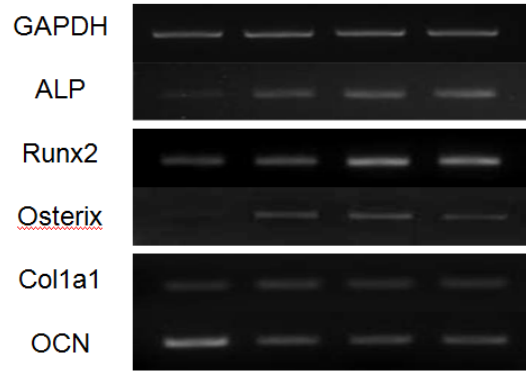
② MEK5-Erk5 シグナル伝達系の骨芽細胞増殖および分化への作用は、MEK5 阻害剤としてすでに報告されている BIX02189 を使用して行った。BIX02189 による Erk5 リン酸化が濃度依存的に抑制されていることを確認し、MC3T3-E1 の骨芽細胞分化および C2C12 に BMP 添加による骨芽細胞分化の系で MEK5 阻害剤の効果をアルカリフォスファターゼ染色および細胞外基質石灰化 (アリザリンレッド染色) を検討した。BIX02189 は濃度依存的にそれぞれの染色の増強に作用し、骨芽細胞分化促進作用があると考えられた (図 9)。



(図 9)

さらに、MC3T3-E1 の骨芽細胞分化において、

RT-PCR 法にて骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現を確認したところ、アルカリフォスファターゼ (ALP)、Runx2、オステリックスは BIX02189 濃度依存的に発現上昇を認め、一方オステオカルシン (OCN) は減少を認めた (図 10)。これらの結果は、MEK5-Erk5 シグナル伝達系は骨芽細胞分化を抑制している可能性を示唆していた。



(図 10)

## 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)

[学会発表] (計 3 件)

① 金子恵子、樋口周久、吉田清志、吉川秀樹、Netrin-1 の骨芽細胞分化に対する影響、第 26 回日本整形外科基礎学術集会、2011 年 10 月 20 日、前橋市

② 金子恵子、樋口周久、吉田清志、吉川秀樹、Netrin-1 suppresses osteoblastic differentiation. 第 25 回 SICOT (Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie) Triennial World Congress、2011 年 9 月 6-9 日、プラハ・チェコ共和国

③ 金子恵子、樋口周久、吉田清志、吉川秀樹、Netrin-1 の骨芽細胞分化に対する影響、第 29 回日本骨代謝学会、2011 年 7 月 28 日、大阪市

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 周久 (HIGUCHI CHIKAHISA)  
大阪大学・保健センター・助教  
研究者番号：40432421

(2) 連携研究者

田中 啓之 (TANAKA HIROYUKI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00432542