

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5月23日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592037
 研究課題名(和文) 誘導カルスATDC5を用いたADAMTS-9の発現と作用の分析と骨再生への応用
 研究課題名(英文) Analysis of expression and role of ADAMTS-9 on induced callus of ATDC5 for application to bone regeneration
 研究代表者
 山合 友一郎 (YAMAAI YUICHIRO)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：00158057

研究成果の概要(和文)：骨再生に応用することを目的に、ATDC5細胞の多分化能を応用して軟骨芽細胞を誘導し、ADAMTS-9やNotchファミリーの作用を分析した。ATDC5をSTK3培地で培養して得られたクラスターは生体における内軟骨性骨化部位に近似していた。ADAMTS-9は細胞増殖に抑制的に働き、Notch1はクラスター形成に抑制的だった。即ち、これらの抗体を培地に添加することで、クラスター形成や、成長に資することが可能と示唆された。

研究成果の概要(英文)：To apply to the bone regeneration, the roles of ADAMTS-9 or Notch family was analyzed by using induced chondroblasts from the pluripotential ATDC5 cells. Clusters obtained from ATDC5 cells cultured in STK3 medium were similar to endochondral ossification sites *in vivo*. ADAMTS-9 acts as inhibitory to cell proliferation and Notch1 was inhibitory to cluster formation. It was suggested that it is possible to contribute to activate the formation and the growth of clusters by using these antibodies in culture.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：ATDC5・ADAMTS-9・Notchファミリー・軟骨芽細胞・誘導培養・クラスター形成

1. 研究開始当初の背景

昨今の高齢化社会の中で疾病や傷害への対応、高度化した運動競技へ対応した医療の

変革が内外で始まっているなかで、治癒の遅延は大きな問題と位置づけられる。申請者は専門分野である人体解剖学もこのような変

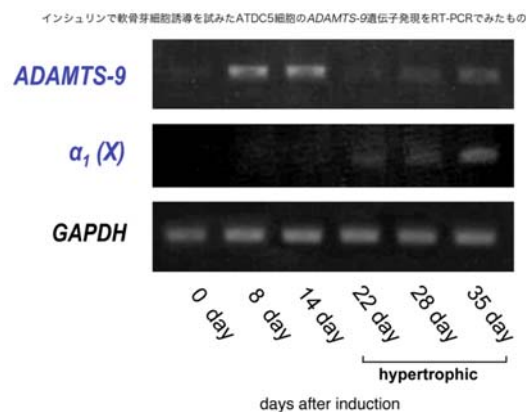
化に機敏に対応すべきとの立場から、骨形成・再生をテーマに取り組んできたが、骨折治癒過程は複雑で実験し辛く、その鍵が何かは未だに不明確である。筆者らはマウスの大腿骨から骨髄由来間葉系幹細胞を取り出して培養し、遺伝子発現や細胞増殖の変化などを分析し、骨折治癒の促進にそれが有用である可能性を見いだしたものの、メカニズムの裏付けは、複雑であるが故にできていない。その複雑さの原因の一つが治癒過程で発現する遺伝子の多様性と考えている。特に、軟骨から骨への置換の際に発現するアグリカナーゼが一種ではなく、多種存在することの意味が不明である。筆者は運動器官の形態形成メカニズムの分析が専門であり、置換骨形成は主たる命題である。また、*in situ* hybridization法の開発やバイオインフォマティクスを用いて院生の指導に携わってきた。骨折治癒過程では一旦形成された軟骨が必ず分解され骨に置換する。実験しやすい培養系を用いてその過程を分析し、医療への応用を考えるのは極めて自然なことである。

また、筆者らは世界に先駆けて内軟骨性骨化因子の一つである、CCNファミリー増殖因子CTGF (CCN2)のクローニングに成功し、骨折治癒過程のようにホメオスタティックな増殖過程でもCTGFが骨化因子として重要な働きをしていることなどを報告してきた (Bone, 31, 2002)。同時に骨折治癒過程においてもカルス由来の軟骨細胞の肥大軟骨細胞分化の際に発現することも報告してきた (JBMM, 22, 2004)。従来、骨形成に関しては軟骨細胞や骨芽細胞の増殖が中心に語られてきたが、それは軟骨基質の分解や吸収なくして起こり得ない。また、石灰化しないと思われていたCbfa1のノックアウトマウスも、個体死にもかかわらず、器官培養をすれば四肢の骨形成が起こり、むしろ野生型との大きな違いは骨髄の血管形成

の遅延や、未分化破骨細胞が予定骨の周囲から実質へ移動しにくい点にあるという印象を持った (未発表)。そこで筆者らは骨形成のポイントを軟骨基質の分解や破骨細胞の動態調節へ移し、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

骨折治癒過程を制御するメカニズムは複雑で、いまだに明確ではない。一方、軟骨分化を誘導したATDC5 疑似カルス細胞は分化の進行に伴い新規のアグリカナーゼと目される ADAMTS-9 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs -9) を 二相性に発現することが示され (下図)



たものの、その意味は不明である。本研究は、この系を用いて内軟骨性骨化におけるADAMTS-9 の二相性発現の意味を追求するとともに、ADAMTS ファミリーの多様性の意味を探ることで、骨再生のバランスメカニズムの一端を解明し骨折治癒の促進に資することを目的としている。

また、ADAMTS-9の二相性発現パターン (これは成長軟骨では増殖軟骨の後期と肥大軟骨細胞層に相当すると考えられる) は、既知のアグリカナーゼであるADAMTS-4 や-5 には見られない特殊性を持っている。本研究では、カルスが置換骨化を経て膜性骨に遷移する過程でのADAMTS-9 の発現と破骨細胞の動態との関係を、疑似カルスを誘導したATDC5 細

胞と破骨細胞との組み合わせ培養を用いて分析すれば、その動態をコントロールする方策の一端が解明され、骨再生の効率化に資することが可能と思われる。また、自由な組み合わせ培養の条件変更、抗体の添加による破骨細胞の分化、遊走への関与の可能性の同定等、多くの知見が得られ、ヒトへの臨床応用へのヒントとなるはずであり、従って本研究は独創的で意義深い結果を得るものと期待される。

3. 研究の方法

(1) ATDC5 細胞の培養：

ATDC5 細胞は 5%FBS 添加 DMEM/F12 glutamax 培地 (Gibco) で継代培養した後、24 穴マルチウェルに移し、無血清培地 STK1 培地 (DS ファーマ、大阪) で培養した。細胞密度が底面の 70% を越えたところで、*in vitro* の骨形成に用いられる STK3 培地 (DS ファーマ、大阪) に換え、所要の日数誘導培養した。

(2) ADAMTS9 等の作用：

STK3 培地に抗 ADAMTS9、抗 Notch1^{~4} (abcam, 1:200~500、タンパク濃度を 2.5 μg/ml で統一) の抗体を添加した。培地は 1 日おきに更新し、サイトシスによる確実な取り込みを期して 5~7 日間培養した後、1% パラフォルムアルデヒドで固定し、マルチウェル中で免疫染色を施した。

(3) ADAMTS9 等の作用の検定：

作用の検定には、①クラスター形成能、②細胞増殖能、③タイプ I コラーゲン産生能、④タイプ II コラーゲン産生能を、抗体染色によって陽性率を算出して行った。用いた抗体は増殖マーカーとして抗 PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) 抗体 (abcam, 1:1000)、細胞分化関連因子の中から、抗コラーゲン α1(I)、α1(II) (abcam, 1:500)、抗 ADAMTS9 (abcam, 1:1000) の抗体

で、DAB 発色した後 CC/Mount (DBS, CA, USA) でコーティングした。検鏡はマルチウェルを裏返してセットし Olympus BX50 を用い、X10 接眼レンズにコードラートを装着し、乱数表に基づき測定した。カウンター染色は施さなかった。

(4) ADAMTS9 のリボプローブを用いた whole mount *in situ* hybridization:

成長長管骨における ADAMTS9 の遺伝子発現部位を確認するため、マウス新生児を用い Dietrich ら (1999) の方法で whole mount *in situ* hybridization を行い、グリセリン透徹後、検鏡した。

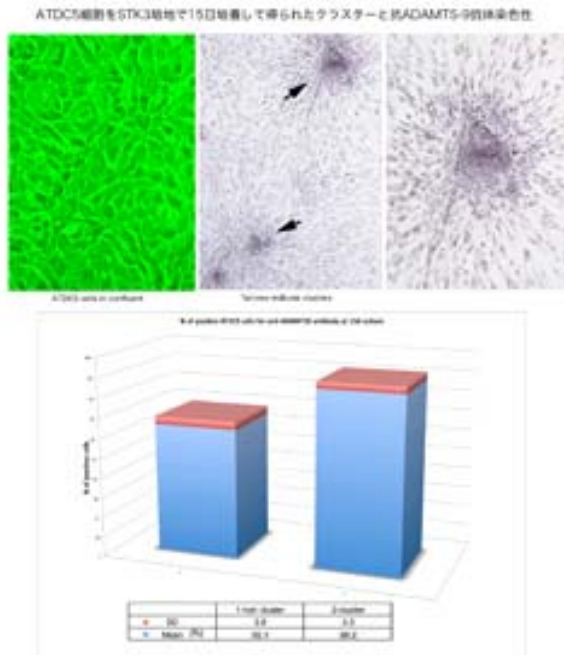
4. 研究成果

(1) Whole mount *in situ* hybridization を用いた、生体における ADAMTS-9 遺伝子発現部位の特定 (下図) : この方法はかつて岡山大学で開発されたものを改変したものである。ア



ンチセンス RNA プローブによって、大腿骨をはじめ、四肢の長管骨の両端の形成部位の遺伝子発現が濃紺に染まって示されている (↑印)。即ち、ADAMTS-9 は内軟骨性骨化部位に発現することが示された。

(2) そこで、軟骨芽細胞形成における役割を分析するため、ATDC5細胞を用いた軟骨芽細胞形成系への適応を検討した。



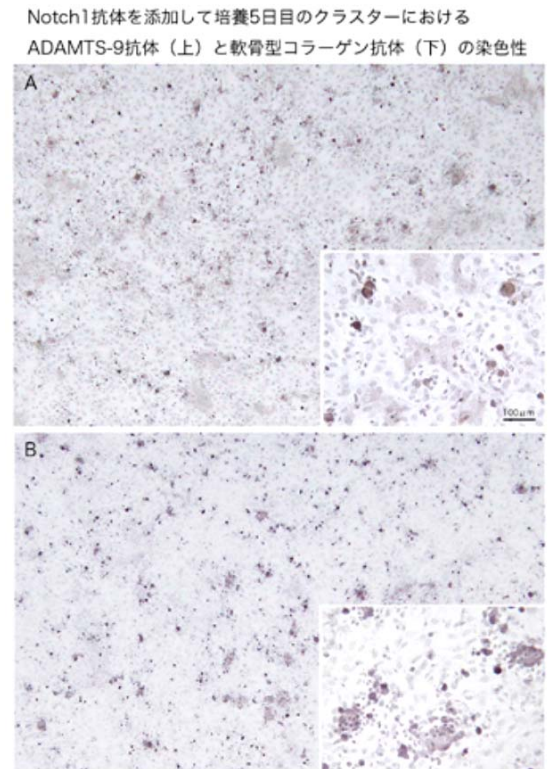
ATDC5をSTK3培地で15日間培養してクラスター（↑印）を形成させ、ADAMTS-9抗体で染色したところ、クラスター部位は非クラスター部位と比較して、有意に染色性が高かった（下のグラフ）。即ち、このクラスターは内軟骨性骨化部位と近似していると考えられた。

(3) 次に、体節分化に重要な役割を持つとされるNotch1~4受容体のクラスターサイズに対する影響を検討するため、培養液に抗Notch1~4受容体の抗体を添加してATDC5を5日間培養し、クラスターの有無、サイズを比較した。



その結果、抗 Notch1 抗体添加群のクラスターのサイズが有意に大きかった。即ち、Notch1 はクラスター形成に対し、抑制的に働いていると推測された。

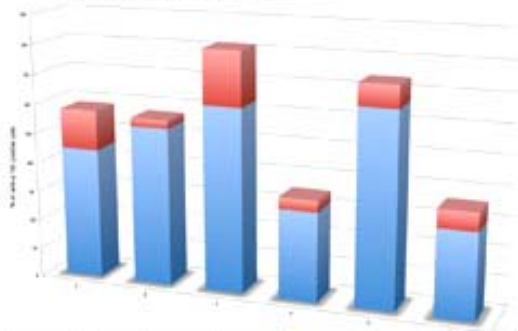
(4) そこで、抗 Notch1 抗体を添加して ATDC5 を 5 日間培養した後、抗 ADAMTS-9 抗体と抗軟骨型コラーゲン typeII 抗体での染色性を比較した。



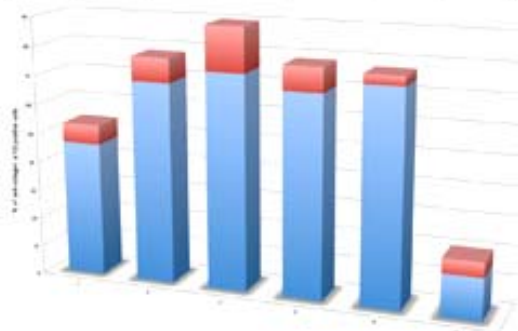
その結果、Notch1 抗体によって形成されたクラスターの細胞はどちらの抗体でも染色されたが、ADAMTS-9 抗体ではクラスター周囲の細胞も染色されていた。つまり、抗 Notch1 抗体添加培養によってクラスター形成が促進された場合でも、ADAMTS-9 の二相性発現は維持されていると考えられた。

(5) 次に、二相性発現をする ADAMTS-9 のコラーゲン形成に対する効果を検討するため、抗 Notch1~4 抗体と抗 ADAMTS-9 抗体をそれぞれ添加して培養し、コラーゲン typeII 抗体と typeI 抗体で染色比較し結果をグラフ化した。

軟骨型コラーゲン（上）と骨型コラーゲン（下）をマーカーにした Notch と ADAMTS-9 の作用の比較



抗体	1-anti-Notch1	2-anti-Notch2	3-anti-Notch3	4-anti-Notch4	5-anti-ADAMTS9	6-untreat
○ 骨型	18.4	2.9	18.9	3.0	7.5	4.2
● 軟骨型 (%)	44.5	53.9	52.6	52.9	66	29.9



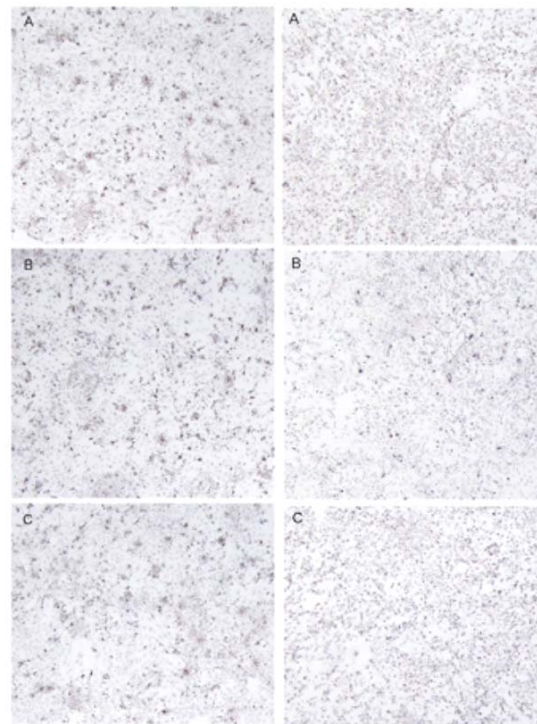
抗体	1-anti-Notch1	2-anti-Notch2	3-anti-Notch3	4-anti-Notch4	5-anti-ADAMTS9	6-untreat
○ 骨型	6.8	6.4	13.8	6.4	3.2	5.1
● 軟骨型 (%)	46.4	55.2	74.2	59.7	73.7	14.7

その結果、最も変化が特徴的であったのは抗 Notch4 抗体添加の場合で、軟骨型コラーゲン (typeII) は有意差が無かったのに骨型コラーゲン (typeI) が有意に増加していた。また、アグリカナーゼでもある ADAMTS-9 抗体の作用を検討するのに、コラーゲンが適切かどうか問題も考えられた。

(6) 次に、クラスター形成に影響がある可能性の見られた Notch1、Notch4 の効果の比較を行った。培養液にそれぞれの抗体を添加し、7 日間培養した後、増殖活性 (PCNA 抗体、A)、ADAMTS-9 抗体 (B)、typeII コラーゲン抗体 (C) で染色した (右側上のグラフ)。

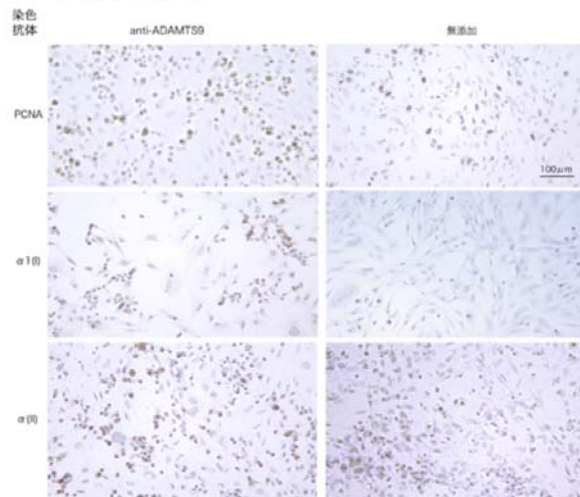
その結果、クラスターは Notch1 抗体添加群に顕著に形成されたが、細胞増殖活性には大差は無かった。差が大きかったのは、Notch1 抗体添加群で軟骨型コラーゲンの染色性が高く、Notch4 抗体添加群で低かったことであった。

Notch1抗体(左)とNotch4抗体(右)を添加した培地で7日間培養し、増殖活性(A)、ADAMTS-9(B)、軟骨型コラーゲン(C)抗体での染色性の比較



(7) 次に、ADAMTS-9 の効果を確認するため、抗 ADAMTS-9 抗体を添加して 5 日間培養し、細胞増殖活性 (PCNA)、骨型コラーゲン ($\alpha 1(I)$)、軟骨型コラーゲン ($\alpha 1(II)$) の抗体で染色し、無添加群と比較した。

ADAMTS-9抗体を添加して5日間培養し、増殖活性、骨型コラーゲン、軟骨型コラーゲンの抗体の染色性を比較した。



その結果、ADAMTS-9 抗体を添加すると、増殖活性と骨型コラーゲンの染色性が高まり、軟骨型コラーゲンは変化しなかった。

これらの結果から、ATDC5 を STK3 で培養し

て得られるクラスターは内軟骨性骨化部位に近似していること、クラスター形成は Notch1 抗体を添加することで促進されること、促進して得られたクラスターは上述のクラスターとほぼ同一であること、ADAMTS-9 抗体の添加で、増殖活性が上昇することなどが判明したものの、これらの結果を裏付けるための遺伝子レベルでの分析には至らなかった。今後は独自のプライマーを設計し、リアルタイム RT-PCR による分析、種々の合成 RNA などを用いた簡易的ノックアウトなどを用いて iPS 細胞を用いた軟骨芽細胞の迅速な形成に資するように、工夫を重ねたい。

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 山合友一朗、ラット脛骨骨折治癒時の Notch と PCNA 発現細胞の分布、J. Oral Biosci., 査読無、53 巻 sup.、2011、190

[学会発表] (計 3 件)

- ① 発表者 (代表) 名: 山合友一朗、
発表標題: 抗 ADAMTS-9 と抗 Notch1^{~4} 抗体による ATDC5 細胞の type-I, -II コラーゲン発現と増殖活性変化、
学会等名: 日本解剖学会第 118 回総会、
発表年月日: 2013 年 3 月 28 日~30 日、
発表場所: かがわ国際会議場
- ② 発表者 (代表) 名: 山合友一朗、
発表標題: ATDC5 細胞の軟骨細胞分化誘導時の Notch1^{~4}、PCNA の発現、
学会等名: 日本解剖学会第 117 回総会、
発表年月日: 2012 年 3 月 27 日~29 日、
発表場所: 山梨大学
- ③ 発表者 (代表) 名: 山合友一朗、
発表標題: ラット脛骨骨折治癒時の Notch と PCNA 発現細胞の分布、
学会等名: 歯科基礎医学会第 53 回総会、
発表年月日: 2011 年 9 月 30 日~10 月 2 日、
発表場所: 長良川国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山合 友一朗 (YAMAAI YUICHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号: 00158057

(2) 研究分担者

水川 展吉 (MIZUKAWA NOBUYOSHI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号: 00263608

(3) 連携研究者