

## 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 17 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792074

研究課題名（和文）ヘッジホッグ伝達変異に関連する頭蓋底軟骨結合形成不全の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism in aplastic of cranial base synchondrosis through the hedgehog signaling pathway.

研究代表者

落合 隆永（TAKANAGA OCHIAI）

松本歯科大学・歯学部・口腔病理学講座

研究者番号：20410417

研究成果の概要（和文）：

軟骨細胞の分化に重要なインディアンヘッジホッグ伝達異常による軟骨細胞の影響を検討した。インディアンヘッジホッグ伝達経路の異常により、細胞外基質であるヘパラン硫酸プロテオグリカンの産生減少を明らかとした。さらに、細胞外でヘパラン硫酸プロテオグリカンがインディアンヘッジホッグと結合することも明らかとした。これらの結果により軟骨組織内でインディアンヘッジホッグ伝達は細胞外基質の制御を行い、ヘパラン硫酸プロテオグリカンはインディアンヘッジホッグの組織内分布に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We examine that chondrocyte influence due to the abnormal Indian hedgehog pathway which was important to chondrocyte differentiation. We elucidated a production decrease in heparan sulfate proteoglycan which was an extra-celler matrix by the abnormality of the Indian hedgehog pathway. Furthermore, we elucidated that heparan sulfate proteoglycan was combined with an Indian hedgehog protein. These results suggest that heparan sulfate proteoglycan might be controlled in the cartilage differentiation through Indian hedgehog pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 500,000   | 150,000 | 650,000   |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 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・矯正・小児歯科

キーワード：歯科矯正学

## 1. 研究開始当初の背景

頭蓋底軟骨結合は、神経堤細胞または体節細胞に由来する。軟骨結合の形成不全は中顔面の劣成長や不正咬合を惹起するが、その原因分子機構は明らかでない。ヘッジホッグシグナル分子（Hh）は軟骨の発生成長を制御し、

細胞外小器官の一次繊毛が Hh 伝達に関与すると報告され、一次繊毛構成蛋白であるポラリスの欠損マウスを解析し以下の内容を明らかとした。

（1）軟骨細胞での一次繊毛の欠損は、Hh 伝達が障害され増殖の減少と分化の遅延がみ

られた。

(2) 成長板での一次繊毛の欠損は、HS-PGs 機能の抑制に起因する軟骨膜での異所性骨化を惹起した。

(3) 内軟骨性骨化と膜性骨化は、部位特異的に重症度が異なることなどが示唆された。

しかし、一次線毛を介する Hh シグナル伝達異常によって軟骨分化に異常を来たした原因の全容は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 軟骨細胞での一次繊毛欠損により起こる遺伝子群の解析。

軟骨組織では Ihh が組織分化に重要な働きを持つことが知られ、Ihh の細胞内シグナル伝達経路は一次線毛を介して伝達されることも知られている。一次線毛を欠損させることで軟骨細胞での Ihh シグナル伝達異常に伴う遺伝子群を解析し、軟骨組織の細胞外基質であるヘパラン硫酸プロテオグリカンが Ihh シグナルによって制御される可能性を検討した。

(2) 軟骨で産生されるヘパラン硫酸プロテオグリカンが Ihh 機能や軟骨内局在への関与の検討。

軟骨の細胞外基質の一種であるヘパラン硫酸プロテオグリカンファミリーである Perlecan の Domain V には細胞接着や様々な成長因子が結合することが知られている。さらに、Perlecan ノックダウンマウスでは、骨格の形態異常が生じることも報告されている。Hh シグナル伝達異常に起因する Hh の組織内での分布異常の原因を解明するために、Ihh が軟骨組織内で Perlecan と結合する可能性を検討した。

これらにより Hh シグナル伝達異常に伴う軟骨分化の制御機構と軟骨の細胞外基質との関係を分子生物学的に解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 軟骨細胞での一次繊毛欠損により起こる遺伝子群の解析。

①軟骨細胞へ誘導した ATDC5 細胞を用いて Shh リコンビナント蛋白 (500ng/ml) を 24 時間作用させた。ATDC5 細胞より Trizol を用いてフェノールクロロホルム法で total RNA を抽出した。SuperScript™ First-Strand Synthesis System を用いて製品のプロトコールに従い逆転写反応を行い cDNA 合成し実験に用いた。検出遺伝子は、Hh シグナル伝達により制御される Ihh、Patched、Perlecan、Syndecan を通法に従った RT-PCR 法および  $\beta$

-actin を用いて相対定量的にリアルタイム PCR 法で解析した。

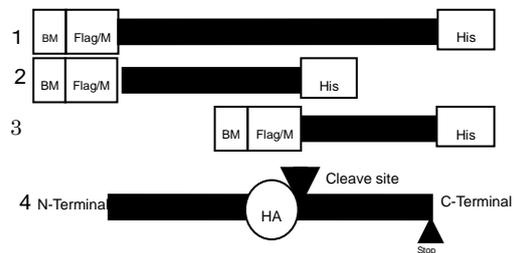
得られた結果を Mann-Whitney U-test にて統計解析を行った。 $P < 0.05$  にて有意差ありとした。

②軟骨細胞へ誘導した ATDC5 細胞を用いて siRNA 法で一次繊毛の構成タンパクであるポラリスを N-TRE™ Nanoparticle siRNA Transfection System を用いてノックダウンさせ、ポラリス抑制軟骨細胞を作製した。ノックダウン細胞より Trizol を用いてフェノールクロロホルム法で total RNA を抽出した。SuperScript™ First-Strand Synthesis System を用いて製品のプロトコールに従い逆転写反応を行い cDNA 合成し実験に用いた。 $\beta$ -actin を用いて相対定量的にリアルタイム PCR 法でポラリスノックダウン細胞と非ノックダウン細胞を用いて Ihh、Patched、Perlecan、Syndecan を解析した。

得られた結果を Mann-Whitney U-test にて統計解析を行った。 $P < 0.05$  にて有意差ありとした。

(2) 軟骨で産生されるヘパラン硫酸プロテオグリカンが Ihh 機能や軟骨内局在への関与の検討。

### ①リコンビナント蛋白質の作製



Ihh と Perlecan Domain V の遺伝子配列を有する発現ベクター (pcDNA3.1 His/Myc B) を作製した (図 1)。Ihh には HA タグを Perleca

図 1 作製した Perlecan と Ihh

1: Perlecan : Domain V

2: Perlecan : Domain VLG1/2

3: Perlecan : Domain VLG3

4: Ihh full length

には FLAG のタグを付与した。発現ベクターを ATDC5 細胞に導入し Ihh と Perlecan 蛋白質を人工的に作製した。

②Ihh とヘパラン硫酸プロテオグリカンの結合の検討

①にて作製した Ihh と Perlecan Domain V の蛋白を 4℃で 12 時間反応させた後に Flag

タグで免疫沈降を行い、HA を一次抗体とする Western Blotting 法で Ihh と Perlecan の結合性を確認した。コントロールには、Perlecan Domain V を除いて免疫沈降を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 軟骨細胞での一次繊毛欠損により起こる遺伝子群の解析。

① Shh 添加により Ihh、Patched、Perlecan、Syndecan3 の発現が増加した (図 2)。Hh シグナル伝達により Ihh や Patched の発現が上昇することが知られている。今回の実験においても同様の傾向が認められ実験系や細胞の反応に異常は見られなかった。本研究における検索対象であるヘパラン硫酸プロテオグリカンは、Shh シグナル伝達によって発現が上昇することが見出された。Shh は軟骨細胞の分化や軟骨組織の成長発育だけでなく細胞外基質の制御にも関与する可能性が示唆された。

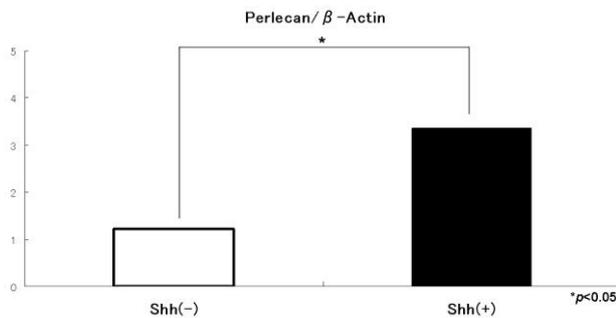


図 2 Shh により Perlecan の発現が誘導された。

② Hh 伝達経路を障害することで起こる遺伝子群の解析

一次線毛構成タンパクをノックダウンすることで Hh 伝達経路を遮断することにより Ihh、Patched、Perlecan の発現が減少した (図 3)。Hh シグナル伝達を抑制することで、直接 Hh シグナルによって制御されている遺伝子群が明らかとなった。細胞外基質の一種である Perlecan の有意な発現減少が確認された。Hh は、細胞外基質の制御に関与する可能性が示唆された。

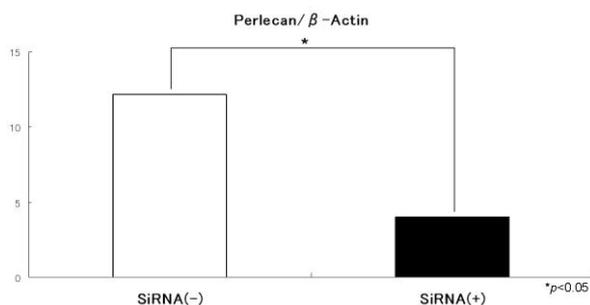
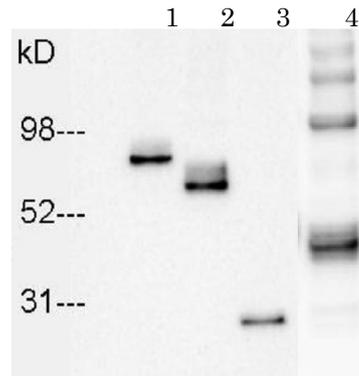


図 3 ポラリスノックダウン細胞における Perlecan の発現減少

(2) 軟骨で産生されるヘパラン硫酸プロテオグリカンが Ihh 機能や軟骨内局在への関与の検討。

人工的に作製した Perlecan の Domain V、LG1/2、LG3 および Ihh タンパク質を Western Blotting 法で確認した。Domain V は 85kD、LG1/2 は 60kD、LG3 は 25kD、Ihh は 50kD に発現が確認できた (図 4)。



図

#### 4 リコンビナント蛋白の発現

- 1: Perlecan Domain V
- 2: Perlecan Domain V LG1/2
- 3: Perlecan Domain V LG3
- 4: Ihh

② Ihh とヘパラン硫酸プロテオグリカンの結合の検討

Ihh と Perlecan Domain V を反応させた後に免疫沈降を行ったのは、HA 抗体による Western Blotting 法で 50kD に陽性所見を認めた。しかし、Perlecan Domain V を除いた検体では陽性所見は確認されなかった。免疫沈降法の結果より Perlecan Domain V と Ihh が結合することが明らかとなった。Perlecan は細胞外で軟骨細胞の分化調節や Ihh の輸送に関与する可能性が示唆された。



図 5 免疫沈降の結果

- 1: コントロール
- 2: Ihh と Perlecan Domain V

Hh シグナルによって細胞外基質である Perlecan の制御が行われていることを明ら

かとした。さらに Perlecan の Domeain V と結合することも明らかとなった。軟骨組織で Ihh が細胞外基質を制御し、さらに産生された Perlecan と結合することで組織内での Ihh 分布を制御する可能性が示唆された。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

落合隆永 (Takanaga Ochiai)

松本歯科大学・歯学部・口腔病理学講座・助教

研究者番号：2041047