

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510255

研究課題名(和文) NELL1タンパク質を用いた骨組織再生治療法の基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of the technology for bone tissue regeneration using NELL1 protein

研究代表者

新美 友章 (Niimi, Tomoaki)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：30377791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)： 頭蓋骨縫合早期癒合症患者の骨癒合部位で高発現している遺伝子として発見されたNELL1は、骨形成を促進する作用をもつことから骨再生治療への応用が期待されるが、NELL1の受容体およびそのシグナル伝達機構はよくわかっていない。本研究では、NELL1受容体の探索およびシグナル伝達機構の解明に取り組み、インテグリンがNELL1の細胞接着活性を担う受容体として機能し、骨分化シグナルを活性化することを見出した。

研究成果の概要(英文)： The NELL1 gene was originally identified in craniosynostosis patients as being specifically upregulated within prematurely fusing sutures. Because of its potent osteoinductive activity, NELL1 protein may be useful for bone regeneration therapy. However, there is little knowledge regarding NELL1 receptors and NELL1-mediated signaling pathways. In this study, we demonstrated that NELL1 promoted osteoblastic cell adhesion through cell-binding sites localized to the C-terminal region of NELL1. We also identified integrin $\alpha 1$ as the major cellular receptor necessary for cell adhesion onto NELL1 and the focal adhesion kinase (FAK)-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is involved in NELL1 signaling.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：骨分化 細胞接着 再生医療

1. 研究開始当初の背景

骨関連疾患の骨組織再生治療では、おもに生体吸収性材料を担体として、骨形成因子; bone morphogenetic protein (BMP)等を利用した治療法が試みられているが、効果や費用の点で十分とはいえず、新たな骨再生治療法の開発が望まれている。ヒト頭蓋骨縫合早期癒合症患者の骨癒合部位で高発現している遺伝子として発見された *NELL1* は、分子量約 140 k の分泌タンパク質をコードしており、種々のモデル系を用いた動物実験において特異的に骨分化を促進することが知られているが、*NELL1* の細胞膜受容体および骨分化に関わるシグナル伝達機構の詳細はわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、*NELL1* および *NELL1* 受容体の機能を応用した骨組織再生治療法の基盤技術の確立を目的として、(1) *NELL1* 受容体の探索および同定、(2) *NELL1* の骨分化シグナル伝達経路の解明、(3) *NELL1* タンパク質の機能領域の解析等を行った。

3. 研究の方法

(1) *NELL1* タンパク質との結合性を指標にした受容体スクリーニングを実施するとともに、*NELL1* の N 末端側に、ラミニンやコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク質に見られる LG ドメインがあることから、それらの細胞膜受容体であるインテグリンサブユニットと *NELL1* との相互作用を解析した。

(2) マウス間葉系細胞株である C3H10T1/2 細胞の *NELL1* タンパク質に対する応答能を指標にして、*NELL1* の骨分化シグナル伝達経路を解析した。

(3) *NELL1* タンパク質が有する複数のドメイン構造のうち、多量体形成に関わるコイルドコイル構造に注目して、*NELL1* の多量体形成機構と、それに伴う細胞接着活性について解析した。

4. 研究成果

(1) *NELL1* 受容体のスクリーニングを行うにあたり、最初に *NELL1* タンパク質の大量発現系の構築を行った。*NELL1* は複数のドメイン構造からなる巨大糖タンパク質であることから、大腸菌や酵母でなく、哺乳動物細胞を用いたタンパク質発現系が必要である。我々は、組換えタンパク質の一過性発現で定評のある invitrogen 社の Freestyle 293 expression system を利用して、*NELL1* タンパク質の発現ベクターをヒト胎児腎臓由来細胞株である 293-F 細胞に導入し、G418 で選択することにより安定形質発現株を樹立した。293-F 細胞は浮遊状態で培養可能であり、無血清培地で増殖することから、1 週間ほど培養した培養上清から簡単に *NELL1* タンパク質を精製することに成功した。発現効率は、

最高で 4 mg/L 培地に達し、組換え *NELL1* タンパク質は C3H10T1/2 細胞に対して骨分化誘導活性を示した。これにより、*NELL1* タンパク質を研究用に大量供給することが可能になった。

(2) *NELL1* タンパク質の N 末端には細胞外マトリックスタンパク質に多く見られるラミニン G (LG) ドメインが存在することから、細胞外マトリックスタンパク質の代表的な細胞膜受容体であるインテグリンとの結合性について解析した。最初に、*NELL1* タンパク質の細胞接着活性を調べたところ、予想に反して、細胞接着活性は LG ドメインではなく、C 末端側に観察された。しかしながら、この細胞接着活性はインテグリンの細胞接着阻害剤である EDTA により阻害され、各種インテグリンサブユニットの阻害抗体を用いて、細胞接着阻害実験を行ったところ、インテグリン $\alpha 3$ 鎖と $\beta 1$ 鎖の阻害抗体によって細胞接着が阻害されたことから、*NELL1* はインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ を介して細胞に接着することが示唆された。*NELL1* による骨分化過程において、mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナルが活性化されることが知られており、インテグリンを介する細胞接着が focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化を経て、MAPK シグナルを活性化することから、*NELL1* による細胞接着が FAK および MAPK シグナルを活性化するかどうかが調べたところ、*NELL1* の濃度依存的に FAK および MAPK シグナルカスケードの一員である extracellular signal-regulated kinase (ERK) がリン酸化されることが判明した。これらの結果より、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ が *NELL1* の細胞接着活性を担う受容体として機能し、FAK-MAPK 経路を活性化して、骨分化を誘導するシグナル伝達経路が示唆された。

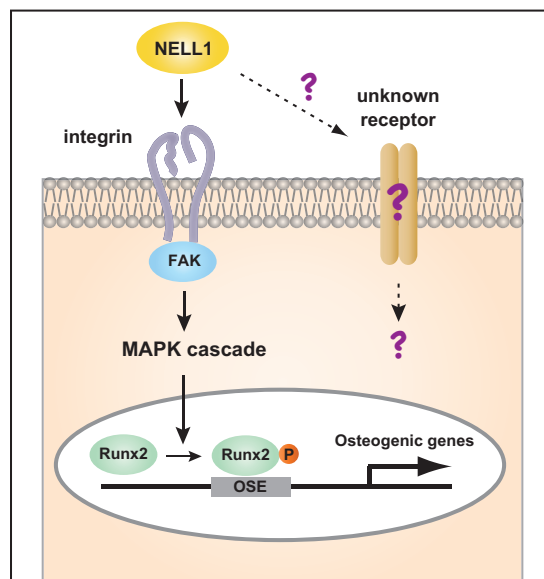


図1 インテグリンを介した *NELL1* のシグナル伝達経路

しかしながら、NELL1 が骨芽細胞に対して特異的に骨形成を促進することを説明するには、インテグリンの他に、骨芽細胞に特異的に発現する別の受容体、あるいはインテグリンの共受容体が存在することが推定される。

(3) NELL1 タンパク質の細胞接着活性における機能領域について、種々の欠失変異体タンパク質を作製して詳細に解析した。その結果、NELL1 の主要な細胞接着活性は、C 末端側の von Willebrand factor type C (VWC) ドメイン内に存在していたが、その領域に既知のインテグリン結合コンセンサス配列は見られなかった。VWC ドメインは5本のジスルフィド結合により、特徴的な立体構造を取ると予想されるが、VWC ドメインの組換えタンパク質に対して還元剤処理によりジスルフィド結合を切断しても、細胞接着活性は維持されていた。しかしながら、NELL1 タンパク質の全長の組換えタンパク質の細胞接着活性は還元剤処理により著しく減少することを発見した。この理由として、NELL1 の細胞接着活性は VWC ドメインの立体構造に依存せず、NELL1 タンパク質のコイルドコイル領域を介した多量体形成に依存すると考え、コイルドコイル近辺のシステイン残基の置換変異体を作製して、NELL1 の多量体構造形成のメカニズムを解明した。この置換変異体を用いた解析から、NELL1 タンパク質のコイルドコイル領域を介した多量体形成に伴うインテグリン結合領域周辺の立体構造の変化が、NELL1 の細胞接着活性に影響することを示した。すなわち、NELL1 の多量体形成が細胞接着活性や、その他の生理活性にとって重要であることを意味する。

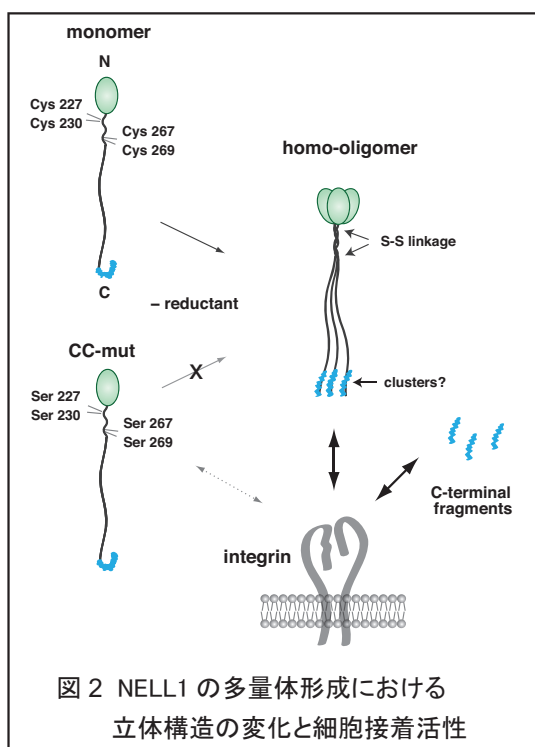


図2 NELL1 の多量体形成における立体構造の変化と細胞接着活性

従って、NELL1 タンパク質を骨再生医療への応用する際は、このような NELL1 タンパク質の活性構造のコンフォメーションを考慮する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Nakamura, Y., Hasebe, A., Takahashi, K., Iijima, M., Yoshimoto, N., Maturana, A. D., Ting, K., Kuroda, S., and Niimi, T. (2014). Oligomerization-induced conformational change in the C-terminal region of *Nel*-like molecule 1 (NELL1) protein is necessary for the efficient mediation of murine MC3T3-E1 cell adhesion and spreading. *J. Biol. Chem.* 289, 9781-9794. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M113.507020.
- ② Shen, J., James, A. W., Chung, J., Lee, K., Zhang, J. B., Ho, S., Lee, K. S., Kim, T. M., Niimi, T., Kuroda, S., Ting, K., and Soo, C. (2012). NELL-1 promotes cell adhesion and differentiation via Integrin β 1. *J. Cell. Biochem.* 113, 3620-3628. 査読有
doi: 10.1002/jcb.24253.
- ③ Hasebe, A., Nakamura, Y., Tashima, H., Takahashi, K., Iijima, M., Yoshimoto, N., Ting, K., Kuroda, S., and Niimi, T. (2012). The C-terminal region of NELL1 mediates osteoblastic cell adhesion through integrin α 3 β 1. *FEBS Lett.* 586, 2500-2506. 査読有
doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.014.
- ④ Hasebe, A., Tashima, H., Ide, T., Iijima, M., Yoshimoto, N., Ting, K., Kuroda, S., and Niimi, T. (2012). Efficient production and characterization of recombinant human NELL1 protein in human embryonic kidney 293-F cells. *Mol. Biotechnol.* 51, 58-66. 査読有
doi: 10.1007/s12033-011-9440-4.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 今井杏理紗、黒田俊一、新美友章：骨分化誘導タンパク質NELL1のヘパリン結合活性の役割、第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月25日、パシフィコ横浜（横浜市）
- ② 高橋謙嘉、黒田俊一、新美友章：骨形成蛋白質NELL1のインテグリンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンを介したシグナル伝達、第46回日本結合組織学会学術大会・第61回マトリックス研究会大会 合同学術集会、平成26年6月6日、愛知県産業労働センター ウィンクあいち（名古屋市）
- ③ Niimi, T., Nakamura, Y., Takahashi, K., and

Kuroda, S. : Identification of cell-binding sites in the C-terminal region of the matricellular protein NELL1. 9th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 平成25年11月26日、香港（中国）

- ④ 中村桜子、黒田俊一、新美友章：骨分化誘導タンパク質NELL1における細胞接着部位の解析、名古屋大学若手女性研究者サイエンスフォーラム、平成25年8月8日、名古屋大学（名古屋市）
- ⑤ 中村桜子、黒田俊一、新美友章：骨分化誘導タンパク質 NELL1 が有する細胞接着活性の解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、平成 25 年 3 月 25 日、東北大学（仙台市）
- ⑥ Hasebe, A., Mayahara, M., Narita, K., Oda, M., Nakamura, M., Kuroda, S., and Niimi, T. : Characterization of bone-inducing protein NELL1 produced by HEK293-F cells. The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology, 平成 24 年 11 月 28 日、名古屋大学（名古屋市）
- ⑦ 新美友章、中村桜子、高橋謙嘉、長谷部愛、黒田俊一：骨分化誘導タンパク質 NELL1 が有する細胞接着活性の解析、第 44 回日本結合組織学会学術大会・第 59 回マトリックス研究会大会 合同学術集会、平成 24 年 6 月 7 日、日本青年館ホテル（東京都新宿区）
- ⑧ 長谷部愛、黒田俊一、新美友章：骨分化誘導タンパク質 NELL1 の多量体化が生理活性に及ぼす影響、日本分子生物学会第 12 回春季シンポジウム、平成 24 年 4 月 25 日、石和温泉慶山（山梨県笛吹市）
- ⑨ 長谷部愛、黒田俊一、新美友章：骨分化誘導タンパク質 NELL1 の多量体形成機構の解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、平成 24 年 3 月 23 日、京都女子大学（京都市）
- ⑩ 新美友章、黒田俊一：新規骨形成タンパク質 NELL1、名古屋大学予防早期医療創成センター 第 2 回ワークショップ、平成 24 年 1 月 31 日、名古屋大学（名古屋市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新美 友章 (NIIMI, Tomoaki)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：30377791

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

黒田 俊一 (KURODA, Shun'ichi)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：60263406