

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592748

研究課題名(和文) pH調節タンパク質による硬組織形成細胞分化制御機構の解明と再生医学への応用

研究課題名(英文) Regulation of differentiation of hard-tissue-constituting cells by pH regulating proteins. Clarification of the mechanism and its application for regenerative medicine.

研究代表者

上條 竜太郎(Kamijo, Ryutaro)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：70233939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のpH調節タンパク質の中でも、軟骨細胞に発現する炭酸脱水酵素9型(CA9)と骨芽細胞に発現するモノカルボン酸輸送体-1(MCT1)の細胞分化における役割を解析した。CA9の発現はマウス成長板の増殖軟骨細胞層で高く、肥大軟骨細胞層では低かった。培養軟骨細胞でのCA9の発現抑制は肥大化分化を促進したことから、CA9は肥大化分化を抑制すると考えられた。マウス骨芽細胞におけるMCT1の発現抑制はアルカリフォスファターゼ(ALP)の発現抑制をもたらし、MCT1の基質である乳酸はALP発現を上昇させた。さらに、MCT1は骨形成因子-2刺激後のSmad1/5/8のリン酸化と核移行を正に制御した。

研究成果の概要(英文)：We found that carbonic anhydrase-9 (CA9) is expressed in mouse chondrocytes and monocarboxylate transporter-1 (MCT1) in osteoblasts, respectively. Hence we investigated the roles of CA9 and MCT1 in differentiation of chondrocytes and osteoblasts, respectively. CA9 was expressed in proliferating but not in hypertrophic chondrocytes in the growth plates of mice. Suppression of CA9 expression by its siRNA induced the hypertrophic differentiation in mouse primary chondrocytes, indicating that CA9 has a role to suppress hypertrophic differentiation of chondrocytes. Suppression of the expression of MCT1 in mouse osteoblasts induced lowered expression of alkaline phosphatase (ALP), while lactate, an MCT1 substrate, augmented the expression of ALP in osteoblasts. We also found that MCT1 positively regulates phosphorylation and nuclear translocation of Smad1/5/8 in osteoblasts after stimulation by bone morphogenetic protein-2.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：pH 骨芽細胞 軟骨細胞 炭酸脱水酵素 モノカルボン酸輸送体

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の細胞内 pH は中性付近の極めて狭い範囲に維持されている。pH は様々なタンパク質の機能を変化させるため、pH の変化は細胞の活動性に大きな影響を及ぼす。そのため、細胞には細胞内 pH の恒常性を保つための pH 調節タンパク質が複数存在する。

代表的な pH 調節タンパク質として、炭酸脱水酵素(CA)とモノカルボン酸輸送体(MCT)が挙げられる。我々はすでに、エナメル芽細胞の CA2 を阻害すると、細胞内 pH が上昇し、細胞分化が抑制されること(J Cell Physiol 225: 709-19, 2010)およびインターロイキン-1 刺激後の軟骨細胞における活性酸素産生酵素 NOX2 の発現および細胞死に MCT1 の活性が必須であることを見出していた(J Biol Chem 286: 14744-52, 2011)。

2. 研究の目的

細胞内 pH 調節に関わる因子の中で、CA と MCT に着目し、軟骨細胞および骨芽細胞の分化・増殖に及ぼす、これら pH 調節タンパク質の役割を解析することを目的とした。具体的には、軟骨細胞および骨芽細胞の分化過程における CA と MCT のサブタイプの発現を明らかにし、それらのサブタイプの細胞分化過程での役割を遺伝子ノックダウンなどにより解明することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス初代培養軟骨細胞および同骨芽細胞における CA および MCT サブタイプの遺伝子発現を RT-PCR 法等により解析した。

軟骨に発現が認められた CA アイソザイム(CA9)のマウス成長板軟骨における発現をレーザーマイクロダイセクション-リアルタイム PCR 法ならびに免疫組織化学的に解析した。培養軟骨細胞の CA9 の発現を siRNA による遺伝子ノックダウンによる軟骨細胞分化マーカーの発現の変動を解析した。

骨芽細胞に高発現していた MCT サブタイプ(MCT1)の骨芽細胞分化におけるについて、マウス初代培養骨芽細胞および C2C12 筋芽細胞の骨芽細胞分化系で MCT1 遺伝子を siRNA によりノックダウンし、分化マーカーの発現を解析した。さらに、MCT1 の基質のひとつである乳酸を培養系に添加し、その骨芽細胞分化に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

初代培養マウス軟骨細胞およびマウス軟骨細胞様 ATDC5 細胞は CA アイソザイムのひとつで、細胞膜結合型の CA9 を発現していることが分かった。CA9 が軟骨細胞の分化になんらかの役割があるかどうかを検討するため、静止軟骨細胞から増殖軟骨細胞を経て肥大軟骨細胞への分化が観察される新生マウス脛骨成長板における CA9 の発現を免疫組織化学的に観察したところ、CA9 は静止軟骨細胞から増殖軟骨細胞にかけて発現していた

が、肥大軟骨細胞層では発現が消失していた。そこで、レーザーマイクロダイセクションにて成長板の各部位の試料を採取し、リアルタイム PCR にて CA9 遺伝子の発現を定量的に評価した結果、CA9 タンパク質の発現変化が遺伝子発現レベルで調節されていることが明らかとなった。肥大軟骨細胞での CA9 発現の著しい低下の持つ意味を考察するため、成長板における増殖軟骨細胞と同様の分化度を持つ初代培養マウス肋軟骨細胞に CA9 遺伝子の siRNA を導入したところ、肥大軟骨細胞のマーカーである X 型コラーゲン遺伝子の発現が強く誘導され、逆にアグリカン遺伝子の発現およびプロテオグリカンの産生は有意に低下したことから、CA9 は軟骨細胞の肥大化分化を抑制する因子であると考えられた。一方、CA9 の発現抑制は軟骨細胞の増殖に大きな影響を及ぼさなかった。これらの発見を PLoS ONE 誌に報告した (PLoS ONE 8(2): e56984, 2013)。

マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を骨形成因子-2 (BMP2) で刺激したところ、MCT1、MCT9、MCT14 が分化程度に関わらず発現しており、中でも MCT1 は高発現していた。MCT1 は、細胞膜やミトコンドリア内膜に分布し、乳酸やピルビン酸を pH 依存的に双方向に輸送する。そこで MCT1 が骨芽細胞分化における役割を解析するため、マウス頭蓋骨由来の初代培養軟骨細胞および骨芽細胞分化系として良く知られている C2C12 細胞に MCT1 の siRNA を導入した。MCT1 の遺伝子発現を抑制した細胞では、BMP2 刺激によって誘導されるアルカリホスファターゼ(ALP)の発現が強く抑制された。さらに、MCT1 siRNA を導入した C2C12 細胞では、BMP2 刺激後の Smad1/5/8 のリン酸化と核内移行が抑制された。そこで、MCT1 の基質のひとつである乳酸を培養系に添加したところ、BMP2 刺激後の ALP 陽性細胞数は、乳酸の濃度に依存して増加した。以上より、MCT1 を介した乳酸の膜輸送は BMP2 依存的な骨芽細胞分化を正に制御すると考えられた。

これまで、CA9 や MCT1 は細胞の pH 調節を担うタンパク質群の構成因子と認識されてきたが、本研究により、これらのタンパク質には、遺伝子発現の調節とそれに基づく細胞分化の制御という、まったく新しい機能があらることが明らかとなった。

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22件)

1. Akiyama T, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Takami M, Hoshino M, Imamura T, Maruyama T, Suzawa T, Kohda T, Tanaka K, Baba K, Kamijo R. Porphyromonas gingivalis-derived lysine gingipain enhances osteoclast differentiation induced by tumor necrosis factor- α and

- interleukin-1 β , but suppresses that by interleukin-17A. Importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine gingipain. *J. Biol. Chem.* in press (査読有)
doi: 10.1074/jbc.M113.520510.
2. Takahashi M, Suzawa T, Yamada A, Yamaguchi T, Mishima K, Osumi N, Maki K, Kamijo R. Identification of gene expression profile of neural crest-derived cells isolated from submandibular glands of adult mice. 2014. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446:481-486. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.130.
 3. Jang IK, Tanaka R, Wurihan, Suzuki D, Shibata Y, Fujisawa N, Tanimoto Y, Ogura K, Kamijo R, Miyazaki T. Nanomechanical properties and molecular structures of in vitro mineralized tissues on anodically oxidized titanium surfaces. 2014. *Nanomedicine*, 10:629-637. (査読有)
DOI: 10.1016/j.nano.2013.09.007.
 4. Shibata Y, Suzuki D, Wurihan, Yamada A, Maruyama N, Fujisawa N, Kamijo R, Miyazaki T. Lysyl oxidase like-2 reinforces unsatisfactory ossification induced by bone morphogenetic protein-2: relating nanomechanical properties and molecular changes. 2013. *Nanomedicine*, 9:1036-1047. (査読有)
DOI: 10.1016/j.nano.2013.04.008.
 5. Matsumoto T, Yamada A, Suzuki D, Aizawa R, Tsukasaki M, Yamamoto M, Baba K, Kamijo R. BMP-2 induced expression of Alx3 that is a positive regulator of osteoblast differentiation. 2013. *PLOS ONE*, 8:e68774. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0068774.
 6. Maruyama T, Miyamoto Y, Yamamoto G, Yamada A, Yoshimura K, Suzawa T, Takami M, Akiyama T, Hoshino M, Iwasa F, Ikumi N, Tachikawa T, Mishima K, Baba K, Kamijo R. Downregulation of carbonic anhydrase IX promotes Col10a1 expression in chondrocytes. 2013. *PLOS ONE*, 8:e56984. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0056984.
 7. Wang X, Suzawa T, Miyauchi T, Zhao B, Yasuhara R, Anada T, Nakamura M, Suzuki O, Kamijo R. Dentin formation enhanced by synthetic octacalcium phosphate. 2013. *J. Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (査読有)
DOI: 10.1002/term.1669.
 8. Shibuya I, Yoshimura K, Miyamoto Y, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Suzuki D, Ikumi N, Suzuki O, Kamijo R. Octacalcium phosphate suppresses chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. 2013. *Cell and Tissue Research*, 352: 401-412. (査読有)
DOI: 10.1007/s00441-012-1548-8.
 9. Mochizuki A, Takami M, Miyamoto Y, Nakamaki T, Tomoyasu S, Kadono Y, Tanaka S, Inoue T, Kamijo R. Cell adhesion signal is essentially involved in RANK expression for osteoclast differentiation. 2012. *PLOS ONE*, 7: e48795. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0048795.
 10. Iwai-Yoshida M, Shibata Y, Wurihan, Suzuki D, Fujisawa N, Tanimoto Y, Kamijo R, Miyazaki T. Antioxidant and osteogenic properties of anodically oxidized titanium. 2012. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 13:230-236. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.01.016. (査読有)
 11. Tsukasaki M, Yamada A, Yoshimura K, Miyazono A, Yamamoto M, Takami M, Miyamoto Y, Morimura N, Kamijo R. Nephronectin expression is regulated by SMAD signaling in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. 2012. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 425:390-392. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.106.
 12. Suzuki D, Yamada A, Funato S, Takami M, Miyamoto Y, Suzawa T, Kamijo R. BMP2 differentially regulates expression of Gremlin1 and Gremlin2, negative regulators of BMP function, during osteoblast differentiation. 2012. *Calcified Tissue International*, 91:88-96. (査読有)
DOI: 10.1007/s00223-012-9614-5.
 13. Miyamoto A, Takami M, Matsumoto A, Mochizuki A, Yamada T, Tachi K, Shibuya I, Nakamachi T, Shioda S, Baba K, Inoue T, Miyamoto Y, Yim M, Kamijo R. R848, a toll-like receptor 7 agonist, inhibits osteoclast differentiation but not survival or bone-resorbing function of mature osteoclasts. 2012. *Cytotechnology*, 64:331-339. (査読有)
DOI: 10.1007/s10616-012-9442-5.
 14. Aizawa R, Yamada A, Suzuki D, Iimura T, Kassai H, Harada T, Tsukasaki M, Yamamoto G, Tachikawa T, Nakao K, Yamamoto M, Yamaguchi A, Aiba A, Kamijo R. Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development. 2012. *Mechanisms of Development*, 129:38-50. (査読有)
DOI: 10.1016/j.mod.2012.02.002.
 15. Yamamoto M, Kato T, Hotta C, Nishiyama A, Kurotaki D, Yoshinari M, Takami M,

- Ichino M, Nakazawa M, Matsuyama T, Kamijo R, Kitagawa S, Ozato K, Tamura T. Shared and Distinct Functions of the Transcription Factors IRF4 and IRF8 in Myeloid Cell Development. 2011. *PLoS ONE*. e25812. (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0025812.
16. Tsukasaki M, Yamada A, Suzuki D, Aizawa R, Miyazono A, Miyamoto Y, Suzawa T, Takami M, Yoshimura K, Morimura N, Yamamoto M, Kamijo R. Expression of POEM, a positive regulator of osteoblast differentiation, is suppressed by TNF- α . 2011. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410:766-770. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.048.
17. Yoshimura K, Miyamoto Y, Yasuhara R, Maruyama T, Akiyama T, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Tunawaki S, Tachikawa T, Baba K, Kamijo R. Monocarboxylate transporter-1 is involved in activation of nuclear factor κ B and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β . 2011. *J. Biol. Chem.* 286:14744-14752. (査読有)
DOI: 10.1074/jbc.M111.221259.
18. Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, Tsukasaki H, Inoue T, Shintani S, Koike T, Honda Y, Suzuki O, Baba K, Kamijo R. Enhancement of bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation by transforming growth factor b. 2011. *Tissue Engineering*, 17:597-606. (査読有)
DOI: 10.1007/s00441-010-1052-y.
- [学会発表](計41件)
1. Takahashi M, Suzawa T, Yamada A, Maki K, Kamijo R. Characteristic gene expression profile of neural crest-derived cells in adult mouse tissues. American Society for Cell Biology, 2013 Annual Meeting, 2013年12月14日~18日, New Orleans, USA.
2. 吉村健太郎, 宮本洋一, 星野真理江, 宮本尚, 斎藤章大, 船登咲映, 泉田恵理, 榎宏太郎, 山本松男, 馬場一美, 上條竜太郎. Monocarboxylate transporter-1は骨芽細胞におけるアルカリホスファターゼの発現に必要である. 日本口腔組織培養学会設立50周年記念学術大会, 2013年11月23日~24日, 東京.
3. 宮本尚, 宮本洋一, 柴田陽, 上條竜太郎, 榎宏太郎. デキサメタゾン培養骨芽細胞により形成される石灰化物のリン酸含有量と硬さの向上に必要である. 第72回日本矯正歯科学会大会, 2013年10月7日~9日, 松本.
4. 鈴木航, 山田篤, 相澤怜, 鈴木大, 中山睦子, 榎宏太郎, 山本松男, 馬場一美, 上條竜太郎. 低分子量Gタンパク質Cdc42は軟骨形成に必須の遺伝子である. 第55回歯科基礎医学会学術大会, 2013年9月21日~22日, 岡山.
5. Nakayama M, Yamada A, Aizawa R, Isobe T, Suzuki D, Suzuki W, Sato Y, Aiba A, Baba K, Mishima K, Yamamoto M, Maki K, Kamijo R. Cdc42 is crucial for facial and palatal development. 2nd Meeting of the International Association for Dental Research-Asia Pacific Region, 2013年8月21日~23日, Bangkok, Thailand.
6. 森澤絵里, 須澤徹夫, 宮内知彦, 高見正道, 山田篤, 宮本洋一, 林竜平, 西田幸二, 大隅典子, 馬場一美, 上條竜太郎. 毛包内の神経堤由来細胞による象牙芽細胞分化誘導. 第11回日本再生医療学会総会, 2012年6月12日~14日, 横浜.
7. 相澤怜, 山田篤, 鈴木大, 飯村忠浩, 山本剛, 山口朗, 山本松男, 上條竜太郎. 低分子量Gタンパク質Cdc42は四肢形成における軟骨分化と肢芽指間部の細胞死に必須である. 第30回日本骨代謝学会学術集会, 2012年7月19日~21日, 東京.
8. 吉村健太郎, 宮本洋一, 星野真理江, 秋山智人, 塚崎雅之, 山田篤, 高見正道, 須澤徹夫, 馬場一美, 上條竜太郎. Monocarboxylate transporter-1はBMP-2刺激後のSmad1のリン酸化に関与することで骨芽細胞分化を正に制御する. 第30回日本骨代謝学会学術集会, 2012年7月19日~21日, 東京.
9. Matsumoto A, Takami M, Miyamoto A, Tachi K, Suzawa T, Baba K, Kamijo R. LPS inhibits ectopic bone formation induced by BMP-2 plus TGF-beta1 in mice. ASBMR 2012 Annual Meeting, 2012年10月12日~15日, Minneapolis, MN, USA.
10. 宮内知彦, 須澤徹夫, 小野美樹, 林竜平, 西田幸二, 榎宏太郎, 上條竜太郎, 馬場一美. 毛包から純化した神経堤細胞による象牙芽細胞への分化誘導. 日本歯科補綴学会第120回記念学術大会, 2011年5月20日~22日, 広島.
11. Akiyama T, Miyamoto Y, Yamada A, Takami M, Yoshimura K, Yasuhara R, Tachikawa T, Baba K, Kamijo R. Dual effects of lysine-specific gingipain on inflammatory osteoclastogenesis. The Joint International Meeting Sponsored by The Jpn. Soc. for Interferon and Cytokine Research, May 25-27, 2011, Osaka.
12. Yoshimura K, Miyamoto Y, Yasuhara R, Maruyama T, Akiyama T, Yamada A, Takami

M, Suzawa T, Tsunawaki S, Tachikawa T, Baba K, Kamijo R. Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse chondrocyte-like ATDC5 cells exposed to interleukin-1 β ; via late phase activation of NF- κ B and expression of phagocyte-type NADPH-oxidase. The Joint International Meeting Sponsored by The Jpn. Soc. for Interferon and Cytokine Research, May 25-27, 2011. Osaka

13. 宮本阿礼, 高見正道, 宮本洋一, 山田 篤, 望月文子, 井上富雄, 上條竜太郎. 二本鎖 RNA アナログはインターフェロン/STAT1 経路を介して破骨細胞分化を抑制し骨粗鬆症モデル動物の骨量を増加させる. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 2011 年 7 月 28~30 日大阪
14. 吉村健太郎, 宮本洋一, 塚崎雅之, 山田 篤, 秋山智人, 馬場一美, 上條竜太郎. Monocarboxylate transporter-1 は骨芽細胞分化を正に制御する. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28~30 日, 大阪.
15. 小野美樹, 高見正道, 須澤徹夫, 山田 篤, 宮内知彦, 馬場一美, 中村雅典, 榎宏太郎, 上條竜太郎. 神経堤由来細胞を用いた顎顔面再建方法確立のための基礎的研究. 第 70 回東京矯正歯科学会記念大会, 2011 年 7 月 20 日~21 日, 東京.
16. Miyamoto A, Takami M, Miyamoto Y, Yamada A, Yim M, Tamura T, Kamijo R. Double stranded RNA increases bone mass in osteoporosis model mice by inhibiting osteoclastogenesis via interferon- β /STAT1 pathway. IOF-ANZBMR, September 4-8, 2011, Gold Coast, Australia.
17. 相澤 怜, 山田 篤, 鈴木 大, 塚崎雅之, 山本 剛, 飯村忠浩, 山口 朗, 山本松男, 上條竜太郎. Cdc42 は四肢形成における軟骨形成と肢芽指間域のアポトーシスを制御する. 第 53 回歯科基礎医学学会学術大会 2011 年 9 月 30 日~10 月 2 日, 岐阜.

〔図書〕(計 3 件)

1. 吉村健太郎, 宮本洋一, 上條竜太郎. 株式会社エヌ・ディー・エス, アインチェイジシリーズ 3 骨研究最前線, 2013.
2. Takami M, Miyamoto A, Matsumoto A, Mochizuki A, Tachi K, Baba K, Inoue T, Mijung Y, Shibuya I, Zhao B, Kamijo R. Maruzen Planet, The New Frontiers in Research for Oral Cancer, 2012.
3. 上條竜太郎. クインテッセンス出版, 骨の再生医学・再生医療~効果的骨再生をめざして~. 臨床家のための矯正イヤーブック '11, 2011.

〔その他〕

昭和大学歯学部口腔生化学講座ホームページ : <http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上條 竜太郎 (KAMIJO, Ryutaro)

昭和大学歯学部口腔生化学講座・教授

研究者番号 : 70233939

(2) 研究分担者

片桐 岳信 (KATAGIRI, Takenobu)

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター病

態生理部門・教授

研究者番号 : 80245830

宮本 洋一 (MIYAMOTO, Yoichi)

昭和大学歯学部口腔生化学講座・准教授

研究者番号 : 20295132

山田 篤 (YAMADA, Atsushi)

昭和大学歯学部口腔生化学講座・講師

研究者番号 : 50407558