

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592908

研究課題名(和文) スキャフォールドフリーによる組織再生のための骨膜細胞ニッチの制御

研究課題名(英文) Niche control of periosteal cells for scaffold-free tissue regeneration

研究代表者

秋山 真理 (AKIYAMA, Mari)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60340618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ骨膜細胞を生体に移植すると骨組織を形成する。さらにこの細胞は、生体移植の前に *in vitro* ですでに多層構造を構成する。当該研究課題の目的は骨膜細胞のニッチ、すなわち微小周辺環境を明らかにすることであった。そのため、まずウシ骨膜細胞の培養上清に含まれるペプチドの測定を行い、断片的に検出されたタンパク質について免疫染色法にて発現を明らかにした結果、骨膜細胞の一部において UACA、EXOSC9、TMX2、ベータ チューブリン、Fbx14 が存在することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Combination of mass spectrometry and immunohistochemistry revealed UACA, EXOSC9, TMX2, beta Tubulin, Fbx14 were expressed in the partial cell layer of bovine periosteal cells. However, mass spectrometry alone could not detect these non-collagenous proteins. The author's paper, "Identification of UACA, EXOSC9, and TMX2 in bovine periosteal cells by mass spectrometry and immunohistochemistry", was published in Analytical and Bioanalytical Chemistry in April 2014.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯科理工学

1. 研究開始当初の背景

1) ウシ骨膜細胞の骨再生能はすでに明らかになっていた。研究代表者の従来の研究では、以下の事を報告していた。

スキヤフォールドフリーで培養シャーレ上において多層構造を形成する。タイプ1コラーゲンは天然のスキヤフォールドの役割を果たしている。

ウシ骨膜細胞の培養上清をウエスタンブロット法で調べた結果、タイプ1コラーゲン抗体に反応する2本のバンドを検出した。

2) ウシ骨膜細胞内外および培養上清においてタイプ1コラーゲン以外のタンパク質の発現は不明であった。

2. 研究の目的

質量分析法により、ウシ骨膜細胞の特性に關与する非コラーゲン性のタンパク質を同定すること。

3. 研究の方法

1) ウシ骨膜細胞培養上清から可溶性のタンパク質を採取し、2次元電気泳動を行った。骨膜細胞の培養条件をアスコルビン酸あり、なしの2条件とし、アスコルビン酸ありの条件でのみ現れた10個のスポットをゲルから切り出し、質量分析を行った。

2) 培養上清中に一部のペプチドが存在していたタンパク質を候補タンパク質と考え、ウシ骨膜細胞の細胞塊のパラフィン切片を用いて免疫染色により、タンパク質の発現を確認した(図1~6)。

4. 研究成果

1) 培養上清に含まれるタンパク質の中で質量分析のみで同定できたのはタイプ1コラーゲンであった。非コラーゲン性タンパク質はペプチド1本分のアミノ酸配列のみを検出した。

2) 培養上清の測定から得られたのは断片的な情報であると仮定し、細胞塊周囲にfull-lengthのタンパク質が存在する可能性を考え免疫染色を行った結果、非コラーゲン性のタンパク質、UACA(図1)、EXOSC9(図2)、TMX2(図3)、チューブリン、Fbx14の存在を明らかにした。以上の結果から培養上清に含まれているのは、タイプ1コラーゲン以外のタンパク質においては、骨膜細胞に発現しているタンパク質の部分的なアミノ酸配列であり、タンパク質全体は細胞内部あるいは細胞塊周囲に存在することが分かった。培養上清から得られたサンプルを2次元電気泳動し、泳動後のゲルをメンブレンに転写し、ウエスタンブロット法と同様の手法

で抗体を用いてメンブレン上の抗原タンパク質を検出しようと試みたが、タイプ1コラーゲン以外のタンパク質において反応はなかった。その理由は、使用した抗体が培養上清に含まれる部分的なペプチドには結合しなかったためと考えられる。



図1 UACA 免疫染色

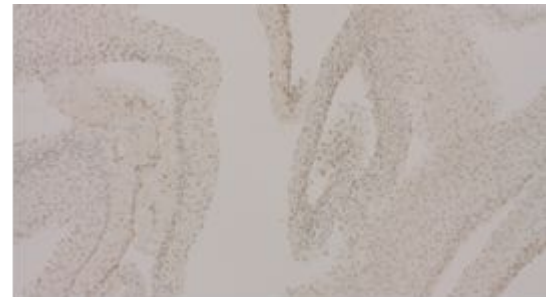


図2 EXOSC9 免疫染色

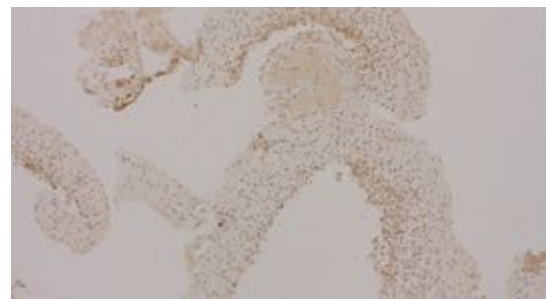


図3 TMX2 免疫染色

3) タイプ3コラーゲンは、質量分析によって培養上清中ではC末端のみを検出したが、細胞塊の免疫染色では、タイプ1コラーゲンと同様に細胞内外全体に存在していた(図4、5)。図6はタイプ1コラーゲンC末端のみに反応する抗体を用いたときの免疫染色の結果である。図4のタイプ1コラーゲン免疫染色の結果と比較すると、図4ではコラーゲンもプロコラーゲンも一様に染まってしまうが、C末端抗体を用いた図6では、プロコラーゲンのみが染まることが分かった。図6において染まっている箇所はタイプ1コラーゲンが合成されて間もない細胞であると考えられる。

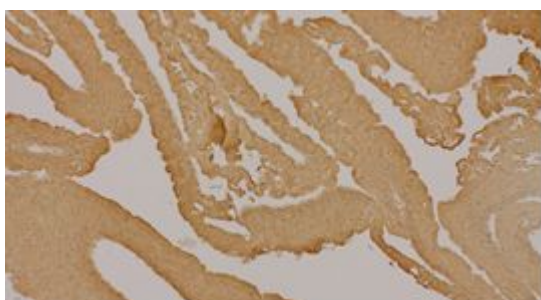


図4 タイプ1コラーゲン免疫染色

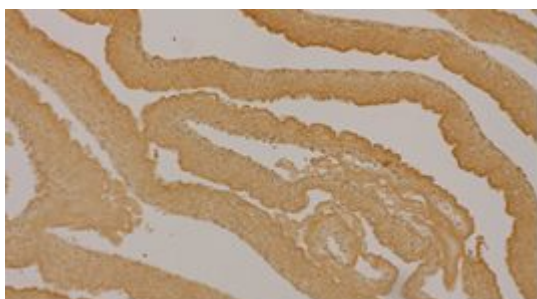


図5 タイプ3コラーゲン免疫染色

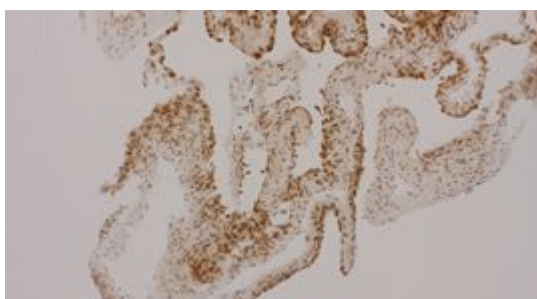


図6 タイプ1コラーゲンC末端免疫染色

4) UACA, EXOSC9, TMX2、 チューブリン、 Fbx14およびタイプ1コラーゲンC末端は培養シャーレ上で多層構造を形成している骨膜細胞の一部の細胞において発現している。したがって、骨膜細胞は大きく2つのタイプの細胞に分けられる。これらのタンパク質が発現している細胞と発現していない細胞である。以上の結果より、当該研究課題で確認したタンパク質の、多層構造形成および骨再生における役割を今後解明する必要がある。

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)

Mari Akiyama, Identification of UACA, EXOSC9 and TMX2 in bovine periosteal cells by mass spectrometry and immunohistochemistry, Analytical and Bioanalytical Chemistry 誌, 査読有, 406巻, 2014年(印刷中)
DOI: 10.1007/s00216-014-7673-3

〔学会発表〕(計5件)

秋山真理、骨膜細胞増殖時における F-box タンパク質の発現、日本口腔組織学会設立 50 周年記念学術大会・総会、2013 年 11 月 24 日、東京都

秋山真理、骨組織再生時に 3 次元構造を形成するタンパク質の解明、第 38 回日本医用マススペクトル学会年会、2013 年 9 月 27 日、神戸市

秋山真理、武田昭二、質量分析による骨膜細胞分泌タンパク質の解析、第 60 回日本歯科理工学会学術講演会、2012 年 10 月 14 日、福岡市

秋山真理、武田昭二、ウシ骨膜細胞による細胞外環境の二次元電気泳動マップ、第 33 回日本バイオマテリアル学会、2011 年 11 月 21 日、京都市

秋山真理、スキャフォールドフリーでの骨形成時における骨膜細胞の分泌タンパク質の解析、第 29 回日本骨代謝学会学術集会、2011 年 7 月 30 日、大阪市

〔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〕

ホームページ等

質量分析によるタンパク質同定サービス

http://www.hssnet.co.jp/2/2_5_a_6.html

北海道システム・サイエンス株式会社のホームページで論文 が参考文献として紹介されている。

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋山 真理 (AKIYAMA, Mari)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：60340618

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし