

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792488

研究課題名（和文）

細胞外マトリックスタンパク質 POEM の発現制御ならびに骨形成における機能解析

研究課題名（英文）

Expression and function in bone formation of extracellular matrix protein POEM

研究代表者

宮園 あがさ (Miyazono Agasa)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00514936

研究成果の概要（和文）：

細胞外マトリックスタンパク質 POEM(pre-osteoblast epidermal growth factor-like repeat protein with meprin, A5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase  $\mu$  domain) の骨芽細胞における遺伝子発現が  $\text{TNF-}\alpha$  によって抑制されることを見出した。また、その制御は  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  経路を介して行われていることがわかった。また、 $\text{TGF-}\beta$  によっても POEM の著しい発現抑制が認められるが、この発現制御が Smad 経路を介しているということが明らかになった。

研究成果の概要(英文): POEM(pre-osteoblast epidermal growth factor-like repeat protein with meprin, A5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase  $\mu$  domain) gene expression was suppressed by  $\text{TNF-}\alpha$  via  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Previously, we reported that  $\text{TGF-}\beta$  also suppressed POEM gene expression via ERK1/2 and JNK. Furthermore, we showed that POEM expression suppressed by  $\text{TGF-}\beta$  via smad2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)細胞外マトリックスタンパク質 POEM について

POEM は EGF 様繰り返し構造 (EGF リピート) を有するタンパク質として、正常マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞から単離同定された分泌型タンパク質である [Morimura N *et al.* *J.Biol.Chem.* 276(45):42172-42181(2001)]。

5 つの EGF リピート、インテグリンと相互に作用する RGD 配列および強力な細胞接着力を有する MAM(meprin, A5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase  $\mu$ ) ドメインから構成されており、細胞-細胞間あるいは、細胞-細胞外マトリックス間の相互作用に重要な役割を担っていると考えられている。

### (2)生体における POEM の機能について

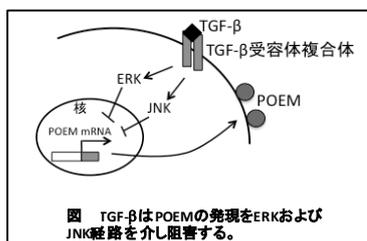
POEM は骨芽細胞以外にも、様々な組織で発現していることがわかっており、特に新生マウスの腎臓において、 $\alpha_8\beta_1$  インテグリンと結合するタンパク質 (Nephronectin) としても同定されている。ノックアウトマウスにおいては、腎臓の初期発生に重要な役割を担っていることが報告されている [Linton JM *et al.* *Development.* 134(13):2501-2509(2007)]。

このように、POEM は、様々な組織や器官の形成や機能に関わっていることが示唆される。

### (3)本研究に至った背景

申請者はこれまでに、POEM が骨形成にどのように関与しているか検討する過程で、以下の実験結果を得ている。

①TGF- $\beta$  は骨芽細胞において強力に POEM の発現を抑制した。



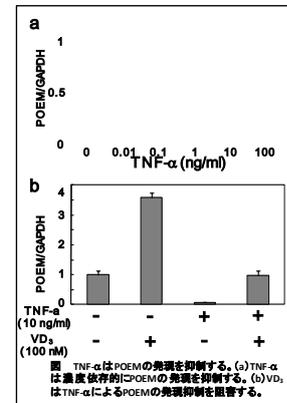
骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用い、POEM の発現を制御する因子を探索する中で、TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) に POEM の発現を強力に抑制する作用を有することを見出した。

②TGF- $\beta$  による POEM の発現制御機構の解明

TGF- $\beta$  受容体 (I) のキナーゼ活性阻害剤は TGF- $\beta$  による POEM の発現抑制作用を強く阻害し、TGF- $\beta$  により活性化される MAP キナーゼ経路阻害剤のうち ERK1/2 阻害剤および JNK 阻害剤によって阻害されたことから、TGF- $\beta$  による POEM の発現抑制は TGF- $\beta$  受容体から ERK1/2 および JNK 経路の活性化を介し行われていることが明らかとなった [Miyazono A *et al.* *FEBS Letters* 581:5321-5326(2007)]。

③TNF- $\alpha$  は骨芽細胞において強力に POEM の発現を抑制した。

POEM の発現を制御する因子を探索する中で、TGF- $\beta$  と同様に炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  (Tumor



necrosis factor- $\alpha$ ) にも POEM の発現を強力に抑制作用があることを見出した (図 a)。この作用は活性型ビタミン D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) と拮抗する作用を有していた (図 b)。

## 2. 研究の目的

細胞接着に関与する POEM が生体内における機能、中でも骨形成においてどのような役割を果たしているか検討するために、骨芽細胞の分化・成熟過程にとって重要な役割を果た

していると考えられている炎症性サイトカインの POEM 発現制御機構とその作用機序の解明を本研究課題の目的とした。

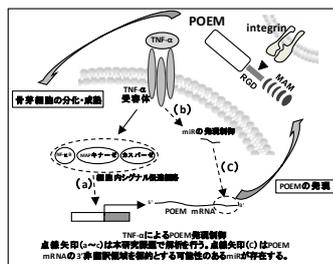
### 3. 研究の方法

(1) TNF- $\alpha$  による骨芽細胞分化制御と POEM の発現抑制との相関関係について

① TNF- $\alpha$  による骨芽細胞分化抑制を POEM が阻害することができるか検討する

骨芽細胞の分化指標は、アルカリホスファターゼ活性測定および活性染色法、石灰化の指標としてアリザリンレッド染色、各種骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現様式（アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、BSP、Runx2 など）により確認する。POEM を骨芽細胞で発現させる系として、申請者はすでに動物細胞と大腸菌それぞれでリコンビナントタンパク質を発現することのできる発現ベクターを、理化学研究所 守村直子博士との共同研究で作製・使用している。また、骨芽細胞で効率よく遺伝子を発現させることのできる、アデノウイルスベクターで発現させる系を確立する。細胞の増殖や細胞死に対する影響も同時に検討する。

② TNF- $\alpha$  により細胞内で活性化されるシグナル伝達経路として、



NF- $\kappa$ B 経路、MAP キナーゼ経路、カスパーゼ経路などが知られている (図)。これらのシグナル伝達経路の中でどの経路が TNF- $\alpha$  による POEM 遺伝子の発現抑制に関与しているか、それぞれの経路に特異的な阻害剤

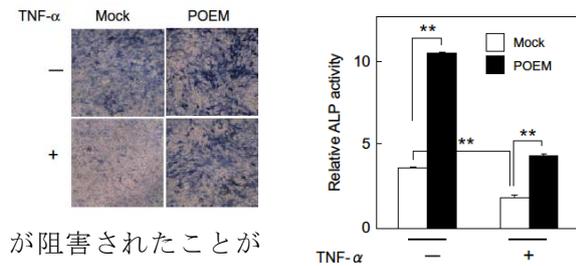
(Bay65-1942; NF- $\kappa$ B 阻害剤、PD98059; MEK 阻害剤、SB203580; p38 阻害剤、SP600125; JNK 阻害剤、 $\alpha$ -VAD-FMK; カスパーゼ 3 阻害剤) を用い検討する。

(2) 骨芽細胞における TGF- $\beta$  の POEM の遺伝子発現制御機構について

TGF- $\beta$  による POEM の発現抑制が、Smad 経路を介しているかどうかを SiRNA による Smad2 遺伝子発現抑制で検討する。

### 4. 研究成果

(1) TNF- $\alpha$  による骨芽細胞分化抑制の阻害 POEM を強制発現させた骨芽細胞において、ALP 活性測定および活性染色法を用いて検討したところ、TNF- $\alpha$  による骨芽細胞分化抑制

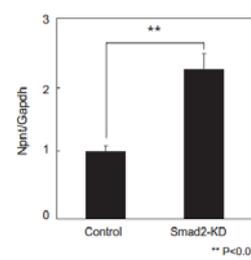


が阻害されたことが明らかになった。

(2) TNF- $\alpha$  による POEM 発現制御機構の解明

骨芽細胞において、TNF- $\alpha$  による POEM 発現の抑制が各種シグナル伝達経路阻害剤のうち、NF- $\kappa$ B 阻害剤を用いることによって阻害された。このことから、NF- $\kappa$ B 経路が関与していることがわかった。

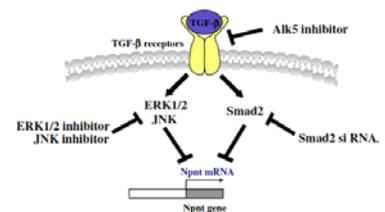
(3) 骨芽細胞における TGF- $\beta$  による POEM 発現制御には Smad2 が関与している。



骨芽細胞における TGF- $\beta$  による POEM の発現抑制は、TGF- $\beta$  1 型受容体 (ALK5) の阻害剤を用いたところ阻害された。さらに、

その下流の SMAD 経路について検討するために、SiRNA によって Smad2 の遺伝子発現を抑制させたところ、POEM (ネフロネクチン) の発現が増加した。

これらのことから、TGF- $\beta$  による POEM の発現



制御メカニズムが明らかになったと考えられる。

## 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 2 件)

(1) 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- $\alpha$ .

*Biochem Biophys Res Commun*, 410, 766-770 (2011) (査読: 有り)

(2) 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.

*Biochem Biophys Res Commun*, 425, 390-392, (2012) (査読: 有り)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 塚崎雅之, 山田 篤, 高見正道, 鈴木 大, 相澤 怜, 宮園あがさ, 吉村健太郎, 山本松男, 上條竜太郎:

TNF- $\alpha$  は骨芽細胞において POEM の発現を抑制し, 骨芽細胞分化を制御する.

第 29 回 日本骨代謝学会学術集会 プログラム抄録集, 193, 2011

(第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 2011 年 7 月)

(2) 宮園あがさ, 須澤徹夫, 山本 剛, 小野美樹, 相澤 怜, 臼井通彦, 立川哲彦, 榎宏太郎, 山本松男, 上條竜太郎:

TGF- $\beta$  によるエナメル芽細胞分化における

Caspase-14 の役割.

J Oral Biosci, 53 (Supplement): 189, 2011  
(第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 2011 年 9-10 月)

(3) 塚崎雅之, 山田 篤, 高見正道, 鈴木 大, 相澤 怜, 宮園あがさ, 吉村健太郎, 山本松男, 上條竜太郎:

TNF- $\alpha$  は POEM の発現を抑制し, 骨芽細胞分化を制御する.

J Oral Biosci 53 (Supplement): 168, 2011  
(第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 2011 年 9-10 月)

## 6. 研究組織

### 1) 研究代表者

宮園 あがさ (MIYAZONO AGASA)  
昭和大学・歯学部・助教  
研究者番号: 00514936

### (2) 連携研究者

上條 竜太郎 (KAMIJO RYUTARO)  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号: 70233939

山田 篤 (YAMADA ATSUSHI)  
昭和大学・歯学部・講師  
研究者番号: 50407558