

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861843

研究課題名(和文) EphA4の未知なるリガンドの解明と臨床応用への可能性の追及

研究課題名(英文) Investigation of the likelihood to elucidation and the clinical application of an unknown ligand of EphA4

研究代表者

伊志嶺 知沙(黒田知沙)(Ishimine, Chisa)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：40581096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1)ISHによるRNAの検出 マウスEpha4遺伝子について、マウス7日齢膝関節のパラフィン切片を使ってISHを行い、mRNAの発現を検証した。P7マウス膝関節では骨周辺の骨膜や筋組織の一部の線維層と思われる領域に発色が見られたが、関節面の軟骨細胞などに発色は見られなかった。E18.5では関節面の軟骨組織にも細胞特異的と思われる発色が見られた。

(2)免疫染色によるタンパクの検出 ephrinA2, ephrinB2はE18.5マウスで、ephrinB3, ガレクチンについてP7マウスの膝関節でそれぞれ発現を確認した。EphA4と発現が似ているものも確認された。

研究成果の概要(英文)：(1)Detection of the RNA by ISH.About mouse Epha4 gene, we performed ISH using the paraffin section of the instar knee joint on mouse 7th and tested expression of mRNA.A color development was found in the region thought to be the fibrous layer of the periosteum around the bones and a sarcous part with the P7 mouse knee joint, but the color development was not found in the chondrocytes of the articular surface.A color development was found in the region thought to be the fibrous layer of the periosteum around the bones and a sarcous part in E18.5 in the same way as time of the P7 mouse, and a color development considered to be cells-specific was found in the cartilaginous tissue of the articular surface.(2)Detection of the protein by the immunostain. ephrinA2, ephrinB2 confirmed a manifestation with the knee joint of the P7 mouse about ephrinB3, galectin with E18.5 mouse, respectively.The thing which resembled EphA4 in a manifestation was confirmed.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

哺乳類において、長管骨は軟骨原基として発生し、内軟骨性骨形成を経て成長を遂げて骨格を形成するとともに、造血臓器としての骨髓も作り上げる。その過程では間葉系、血球系のさまざまな細胞が種々のサイトカイン、成長因子とその受容体を介して情報交換を行っている。申請者らは以前の研究で、ヒト軟骨細胞株 HCS-2/8 細胞に発現するチロシンキナーゼ型受容体の一つとして EphA4 を見出した。Eph は体節形成、細胞移動、臓器形成、心脈管形成などさまざまなところで重要な働きをする分子だが、その機能に関してはいまだ不明の点が多く残されている。そして Eph ファミリーメンバーの中でも EphA4 は比較的最近になって注目されはじめた分子であり、神経領域での研究は比較的進んでいるが、骨、軟骨組織における機能は未だわかっていない。EphA4 はチロシンキナーゼ型受容体であり、膜を一回貫通する分子で、細胞外にリガンド結合領域と2つのフィブロネクチン・タイプ リピートを持ち、細胞内にはチロシンキナーゼ活性ドメインを持ち、また自らも特定の部位でリン酸化される。EphA4 は以前の研究で、チロシンキナーゼ型レセプターの、キナーゼドメイン領域の cDNA を増幅するプライマーを用いた、RT-PCR クローニングの結果、ヒト軟骨細胞株 HCS-2/8 細胞上に存在するチロシンキナーゼ型レセプターの一つとして検出された。EphA4 は比較的最近になって注目されはじめた分子であり、神経領域での研究は比較的進んでいるが、骨、軟骨における分布状況や機能は未だわかっていない。よって軟骨組織、関連細胞株での EphA4 の発現、分布の解明をおこなった。結果、マウス成長板の免疫染色では EphA4 は、肥大軟骨細胞層、および骨周囲の細胞に局在しており、成長板軟骨初代培養細胞の分化過程では、EphA4 の遺伝子発現は CCN2 遺伝子の発現ピーク後、すなわち分化の最終段階(肥大化期)で急上昇が見られ、In vitro の実験において、EphA4 の遺伝子発現は、軟骨細胞株(HCS-2/8)より骨芽細胞株(SaOS-2)で高く、一方、子宮頸癌細胞株(HeLa)では発現していなかった。EphA4 の機能を調べるため、骨芽細胞株(SaOS-2)で EphA4 遺伝子をノックダウンするとオステオカルシン遺伝子の発現は低下し、ALPase 活性も低下した。骨芽細胞株(SaOS-2)において EphA4 は細胞質のみでなく核内への集積が見られ、核小体とは別の部位に局在した。これらの知見は、EphA4 が骨形成に重要な役割を果たすことを初めて明らかにするとともに EphA4 の新たなシグナリング経路の存在の可能性を示唆している。よって、長管骨に限らず、他の

視点からも EphA4 を調べていくこととする。

2. 研究の目的

EphA4 はチロシンキナーゼ型細胞表面受容体分子であり、その特異的リガンドとしては ephrinB2 や ephrinA2 などが知られている。申請者らの以前の研究で、軟骨肉腫由来細胞株 HCS-2/8 細胞に発現しているチロシンキナーゼ型受容体を探索した折に、EphA4 がその一つとして同定され、リガンドとして考えられている ephrinA2 は内軟骨性骨化において EphA4 より前の段階で発現のピークがあった。EphA4 のリガンドは現在不明な点が多いとされている。そこで今回の実験ではまずリガンドに着目し、リガンドを網羅的に調査することによって EphA4 の新規のタンパク質間相互作用が明らかとなり、シグナル伝達経路・疾患関連経路のマッピングなどの解析が可能となる。また申請者らの研究室の実験で、義歯を装着したラットの骨吸収に関する実験、歯牙喪失と空間認知能に関する実験が行われており、Filosa らによると EphA4 と ephrin-A3 の相互作用によるシグナリングは、アストロサイトによるシナプス機能と可塑性を制御するのに重要であると報告された。よって、歯牙喪失における海馬での EphA4 の発現、機能を探索するものである。

(1) EphA4 リガンドの網羅的調査とそのリガンドと EphA4 との関係の解析

(2) 義歯床下骨吸収と EphA4 の相互関係の解析

申請者らの研究室は義歯を装着したラットを使用した実験系を持つ。そのラットの組織を利用し、免疫組織学的検索、分子生物学的検索を行い、EphA4 との関連を解析する。

(3) 歯牙喪失をしているラット脳組織における EphA4 の遺伝子発現と機能の解析

空間認知能を評価したラットの海馬を免疫染色し、EphA4 の局在を確認。海馬より RNA を抽出し、遺伝子発現を確認する。

EphA4 はチロシンキナーゼ型細胞表面受容体分子であり、その特異的リガンドとしては ephrinB2 や ephrinA2 などが知られている。しかしながら、骨を形成する成長板軟骨細胞や骨芽細胞表面に存在する EphA4 に結合し、リガンドとして機能する分子はいまだ明らかにはなっていない。また機能面でも、骨芽細胞による骨基質石灰化に重要であるという前述の事実以外には、まったく情報がないのが現状である。

3. 研究の方法

正常骨・軟骨組織標本の作製と免疫染色による既知 EphA4 リガンドの産生・分布の解析

マウスを用い、生後1週における膝関節組織を摘出固定、EDTA による脱灰後、通法に従

いパラフィン包埋を行い、厚さ7μmの連続切片を作製する。続いて切片に ephrinA2 をはじめとする既知リガンドに対する抗体を作用させ、これらの存否と分布を EphA4 と比較検討する。例えば ephrinB5 と EphA4 が隣り合う細胞層で差別的に存在が確認された場合、神経組織で確認されているように EphA4 シグナルが、相互反発力の発生による細胞の適正な「住み分け」や「成長方向の限定」に役割を果たしている可能性が強く示唆される。

1. ブロック、薄切

- 1) 動物：マウス 胎仔 18.5 日齢
- 2) 組織：全身（矢状断面）、足関節のみ
- 3) 薄切：厚さ 6μm

2. IHC

1) 抗体

- ・抗体：Ephrin A2 rabbit pAb Bioss bs-9758R
- ・抗体：Ephrin B2 rabbit pAb biorbyt orb183286
- ・Negative control：rabbit Ig Dako X0936

2) 条件検討

Ephrin A2

組織：マウス E18.5 矢状断面

抗原賦活化：熱処理（Microwave, Citrate buffer pH6.0）

酵素処理（Proteinase K）

無処理

抗体濃度：10ug/ml, 2ug/ml, 0.4ug/ml

追加検討

組織：マウス E18.5 膝関節のみ

抗原賦活化：熱処理（Microwave, Citrate buffer pH6.0）

酵素処理（Proteinase K）

無処理

抗体濃度：2ug/ml, 0.4ug/ml

Ephrin B2

組織：マウス E18.5 膝関節のみ

抗原賦活化：熱処理（Microwave, Citrate buffer pH6.0）

酵素処理（Proteinase K）

無処理

抗体濃度：10ug/ml, 2ug/ml, 0.4ug/ml

3) 染色プロトコール

1. 脱パラ

2. PBS

3. 抗原の賦活化

熱処理（Microwave, Citrate buffer pH6.0）

酵素処理（Proteinase K）

無処理

4. PBS 室温 5分×3

5. 0.3%過酸化水素/メタノール 室温 30分

6. TBS 室温 5分×3

7. 非特異反応のブロッキング G-Block

(Genostaff GB-01) 室温 10分

8. Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector SP-2001)

9. 一次抗体 4 一晚

・抗体：Ephrin A2

・抗体：Ephrin B2

・Negative control：rabbit Ig

・抗体濃度：10ug/ml, 2ug/ml, 0.4ug/ml

10. TBST 室温 5分×2

11. TBS 室温 5分×1

12. 二次抗体 室温 30分

・Anti-Rabbit Biotin Dako E0432

13. TBST 室温 5分×2

14. TBS 室温 5分×1

15. PO 標識ストレプトアビジン（ニチレイ 426062）室温 10分

16. TBST 室温 5分×2

17. TBS 室温 5分×1

18. DAB/H₂O₂

19. 対比染色：ヘマトキシリン（武藤化学）

20. 封入：マリノール（武藤化学）

ISHによる Epha4 遺伝子の発現の解析

1. パラフィンブロック/切片の作製

1) 組織：C57BL/6 マウス 7日齢 膝関節
ソムノペンチル（共立製薬）麻酔下のマウスを屠殺したのち膝関節を摘出した

2) 固定：摘出した膝関節は、トリミングしたのち、ホルムアルデヒド系の組織固定液（G-Fix；Genostaff）を使って、室温にて2日間浸漬固定した

3) 脱灰：固定した膝関節は、キレート剤を含むマイルドタイプの中性脱灰液（G-Chelate Mild；Genostaff）を使って、2～8 にて脱灰した

4) 包埋：脱灰した膝関節は、キシレン代替品として低毒性溶剤 G-Nox（Genostaff）を使ったプロトコールのもと、パラフィン包埋装置 CT-Pro20（Genostaff）を用いてパラフィン包埋してブロックを作製した

5) 薄切：パラフィンブロックは、約 5μm の厚さで薄切して切片を作製した

2. ISH

1) プロープの設計：Epha4-1、Epha4-2、Epha4-3、Epha4-3L

2) プロープの調製：マウス E14.5 の cDNA（Genostaff）をもとにクローニングしたのち、*in vitro* transcription 法のもとジゴキシゲニンを標識（DIG RNA Labeling Mix；Roche）してプロープを作製した

3) 試薬キット：ISH Reagent Kit（Genostaff）

G-Hybo ~ プロープ希釈液

G-Wash ~ ハイブリ洗浄液

G-Block ~ ブロッキング試薬

4) 酵素：Proteinase K（Wako）

5) 検出抗体：アルカリフォスファターゼ標識 抗ジゴキシゲニン抗体（Roche）

- 6) 発色基質 : NBT/BCIP (Sigma)
- 7) 対比染色 : Kernechtrot Stain Sol (Muto)
- 8) 封入 : G Mount (Genostaff)

3. プロトコール :

P7 mouse knee joint was dissected, fixed with G-Fix (Genostaff Co., Ltd.), decalcified with G-Chelate Mild (Genostaff), embedded in paraffin on CT-Pro20 (Genostaff Co., Ltd.) using G-Nox (Genostaff Co., Ltd.) as a less toxic organic solvent for Xylene, and sectioned at 5µm. In situ hybridization was performed with the ISH Reagent Kit (Genostaff Co., Ltd.) according to manufacturer's instructions. Tissue sections were de-paraffined with G-Nox, and rehydrate through an ethanol series and PBS. The sections were fixed with 10% NBF (10% Formalin in PBS) for 15min at RT and washed in PBS, treated with 4 ug/ml Proteinase K (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) in PBS for 10min at 37C and washed in PBS, re-fixed with 10% NBF for 15min at RT and washed in PBS, placed in 0.2N HCl for 10min at RT and washed in PBS, and then placed within a coplin jar containing 1xG-Wash (Genostaff Co., Ltd.), equal to 1xSSC. Hybridization was performed with probes at concentrations of 300ng/ml in G-Hybo (Genostaff Co., Ltd.) for 16hr at 60C. After hybridization, the sections were washed in 1xG-Wash for 10min at 50C, 50% formamide in 1xG-Wash for 10min at 50C. Then the sections were washed twice in 1xG-Wash for 10min at 50C, twice in 0.1xG-Wash for 10min at 50C, and twice in TBST (0.1% Tween20 in TBS) at RT. After treatment with 1xG-Block (Genostaff Co., Ltd.) for 15min at RT, the sections were incubated with anti-DIG AP conjugate (Roche Diagnostics) diluted 1:2000 with x50G-Block (Genostaff Co., Ltd.) in TBST for 1hr at RT. The sections were washed twice in TBST and then incubated in 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween20, 100mM Tris-HCl, pH9.5. Coloring reactions were performed with NBT/BCIP solution (Sigma-Aldrich Co. LLC.) overnight and then washed in PBS. The sections were counterstained with Kernechtrot stain solution (Muto Pure Chemicals Co., Ltd.), and mounted with G-Mount (Genostaff Co., Ltd.).

4 . 研究成果

Ephrin A2 抗体

マウス E18.5 全身矢状断面の切片を用いて免

疫組織化学染色の条件検討 (9 条件) を行った結果、全ての抗原賦活化条件で主に骨組織に発色が見られた。ネガティブコントロール (rabbit Ig) については、抗体濃度 10ug/ml にて若干の発色が見られたが、2ug/ml, 0.4ug/ml の濃度では発色が見られなかった (Fig.1-3)。また熱処理でのみ腸管の一部の細胞で発色が確認出来た (Fig.2)。

確認のためマウス E18.5 の膝関節のみの切片を用いて、抗原賦活化 3 条件、抗体濃度 2 条件の 6 条件にて染色を行った結果、全ての条件で発色が見られた。ネガティブコントロール (rabbit Ig) では発色は確認出来なかった (Fig.3)。しかし熱処理や酵素処理では殆どの組織や細胞で発色が見られていた。無処理では熱処理や酵素処理に比べ筋組織や骨幹などの発色は弱くなり、また骨端の部位でも発色していない細胞が見られたが、これまでの結果のみではこの発色が Ephrin A2 特異的かの判断は難しいと考える。

Ephrin B2 抗体

マウス E18.5 の膝関節のみ切片を用いて免疫組織化学染色の条件検討 (9 条件) を行った結果、全ての抗原賦活化条件で発色が見られた。ネガティブコントロール (rabbit Ig) については、抗体濃度 10ug/ml に発色が見られたが、2ug/ml, 0.4ug/ml の濃度ではほとんど発色が見られなかった (Fig.4)。

熱処理では、抗体濃度 2ug/ml にて主に骨端軟骨板に発色が見られた (Fig.5)。

Fig.1
Ephrin A2 rabbit pAb Bloss bs-9758R
IHC条件検討
組織 : マウスE18.5 矢状断面
抗原賦活化 : 熱処理 (Citrate buffer pH6.0)
抗体濃度 : 10ug/ml, 2ug/ml, 0.4ug/ml
写真 (顕微鏡倍率) : 100倍

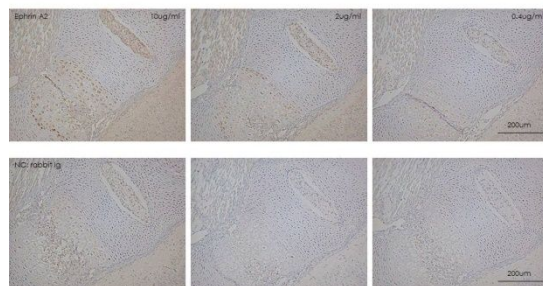
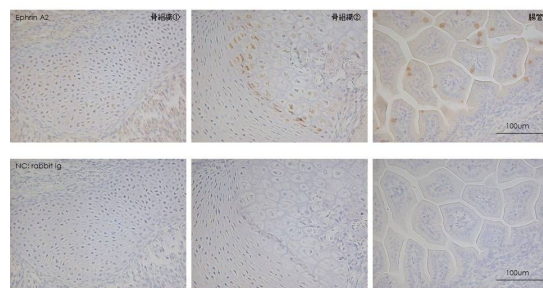


Fig.2
Ephrin A2 rabbit pAb Bloss bs-9758R
IHC条件検討
組織 : マウスE18.5 矢状断面
抗原賦活化 : 熱処理 (Citrate buffer pH6.0)
抗体濃度 : 2ug/ml
写真 (顕微鏡倍率) : 200倍



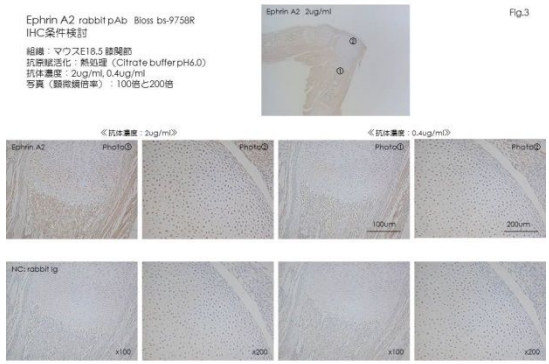


Fig.3

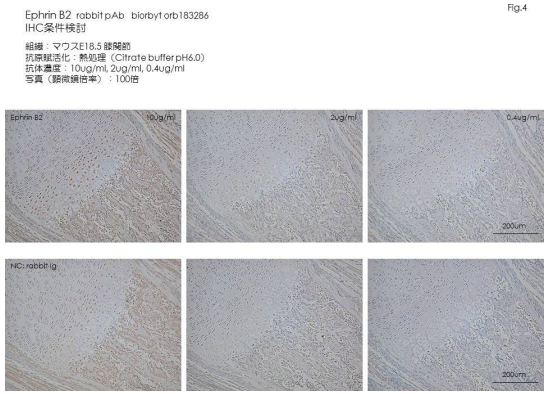


Fig.4

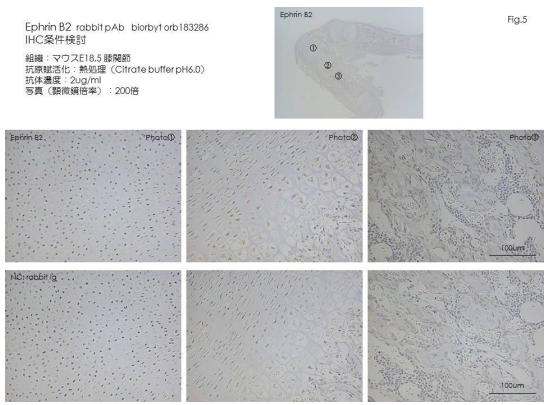


Fig.5

ISH

・ISH用に設計_作製した3つのプローブ (Epha4-1、Epha4-2、Epha4-3) について、マウス E17.5 のパラフィン切片を使って ISH を行ったところ、いずれのプローブでも脳 (海馬、線条体、大脳皮質、小脳、橋、延髄など) や腎臓においてアンチセンス特異的な発色を確認できたが、その発色強度は Epha4-3 プローブが最も強かった。

・作製した P7 マウス膝関節のパラフィン切片について、マウス Actin プローブならびに Collagen-II プローブを使って ISH を行ってところ、いずれもプローブ特異的な発色が

確認できた。

・P7 マウス膝関節のパラフィン切片と Epha4-3 プローブを使い、ハイブリダイゼーション: 60 / 洗浄: 50 の条件 (プロトコル No.645) のもと ISH を行った。その結果、骨周辺の骨膜や筋組織の一部の線維層と思われる領域に発色が見られたが、関節面の軟骨細胞などに発色は見られなかった。

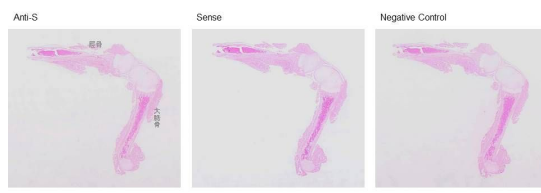
・プロトコル No.645 の染色結果における S/N (アンチセンスとセンスの差) を改善する目的で、洗浄温度を 60 に変更した条件 (プロトコル No.556) のもと ISH を行った。その結果、センスでの発色とともにアンチセンスの発色も減少し、S/N を改善できなかった。

・アンチセンスでの発色を強めることで S/N を改善するために、Epha4-3 プローブの長さを約 200bp の長くした Long プローブ (Epha4-3L) を作製して、マウス E18.5 (個体 #1) のパラフィン切片を使って ISH を行った。その結果、アンチセンスでは対照とした Epha4-3 プローブと同じような発色態度を確認できたが、センスが組織全体でユビキタスに染まってしまい、S/N を改善できなかった。

・Epha4-3 プローブについて、ハイブリダイゼーション: 60 / 洗浄: 50 の条件 (プロトコル No.645) のもと、マウス E18.5 (個体 #2) のパラフィン切片を使って ISH を行った。その結果、P7 マウスのときと同じように骨周辺の骨膜や筋組織の一部の線維層と思われる領域に発色が見られたほか、関節面の軟骨組織にも細胞特異的と思われる発色が見られた。

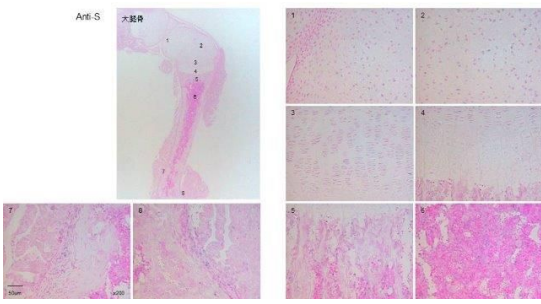
Epha4 ~ 本染色 (1) Fig. 6

パラフィンブロック: C57BL/6 マウス 7日齢 膝関節
プローブ: Epha4-3
染色条件: ハイブリダイゼーション...60°C、洗浄... 50°C *プロトコル No.645-H



Epha4 ~ 本染色 (1) Fig. 7

パラフィンブロック: C57BL/6 マウス 7日齢 膝関節
プローブ: Epha4-3
染色条件: ハイブリダイゼーション...60°C、洗浄... 50°C *プロトコル No.645-H



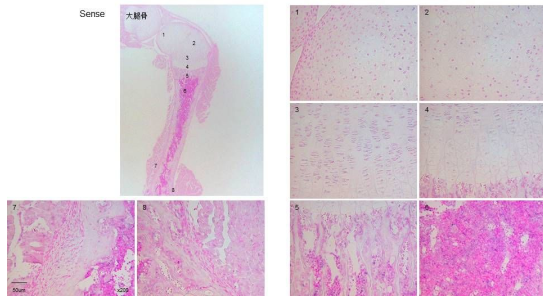
Epha4 ~ 本染色(1)

Fig. 8

ヒラフンブロウカ: C57BL/6 マウス, 7日齢 膵臓部
プロトプ: Epha4-3

染色条件: ハイブリダイゼーション...60°C、洗浄... 50°C 1 フロリゴール No.645-H

EPHA4-12324-122014



5 . 主な発表論文等なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊志嶺 知沙 (ISHIMINE CHISA)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号 : 40581096