

論 文 要 旨

Roles of Neuromedin B as a Regulatory Factor for Bone Formation

〔 骨形成における調節因子としての
ニューロメディン B の生理的役割の解明 〕

齊藤 弘樹

【序論および目的】

ニューロメディン B(NMB)はボンベシン関連ペプチドの一つであり、哺乳類で脳、神経系や消化管に存在し、平滑筋収縮など様々な生体機能の調節を担っているが、NMBの骨での発現、生理作用は全く不明である。そこで、我々は骨におけるNMBの役割を解明することを目的とし、先ず、マウス骨組織の骨関連細胞におけるNMB及びNMB受容体(NMBR)の局在を確認し、次に、ラット初代培養骨芽細胞とマウス軟骨細胞株ATDC5におけるNMB及びNMBRの発現を確認すると共に、それらの細胞でのNMBの機能の解明を試みた。

【材料および方法】

●免疫組織化学染色

マウス骨組織をパラフィン包埋後、組織切片を作成し、その切片を1次抗体(NMB抗体とNMBR抗体)とインキュベーションし、アビジン・ビオチン複合体とそのDAB色原体で可視化した。2重免疫蛍光染色のため、その切片を1次抗体の組み合わせ(オステオカルシン抗体とNMB抗体又はNMBR抗体)とインキュベーションし、2次抗体を用い検出した。

●細胞培養と処理

マウス軟骨細胞株ATDC5は5%ウシ胎仔血清を含んだDMEMとF-12の混合培地(1:1)で培養し、ATDC5細胞の分化を誘導するため、insulin、transferrinとseleniteを加えた。初代培養骨芽細胞は新生仔ラット頭蓋骨から採取し、消化した。その単離細胞は10%ウシ胎仔血清を含んだ α -MEMで培養し、その細胞はbone morphogenetic protein 2 (BMP2), 17β -estradiol (E2)とtransforming growth factor β 1 (TGF β 1)で処理した。

●RT-PCRとリアルタイムPCR

TRIzol LS reagentを用い組織と細胞のRNAを抽出後、SuperScript II reverse transcriptaseを用いcDNAを合成し、特異的プライマー(NMB, NMBR, GAPDH)とTaq polymeraseを用いPCRを行った。また、NMB遺伝子発現レベルを定量化するため、特異的プライマー(NMB, GAPDH)とSYBR Premix Ex Taq IIを用いリアルタイムPCRを行った。

●逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)とNMB特異的ラジオイムノアッセイ(RIA)

ATDC5細胞培養培地のNMB分泌を評価するため、培地中物質をSep-Pak[®] plus C18カラムを用い分離後、 μ Bondasphere C18カラムを用いRP-HPLCで分画、¹²⁵I-labeled NMBと抗NMB抗体を用いRIAを行い、分画ごとのNMBを検出した。

●アルカリフォスファターゼ(ALP)アッセイとアリザリンレッド染色

細胞分化誘導のため、ラット骨芽細胞は分化培地(0.1%ウシ血清アルブミン, 5 mM β -グリセロリン酸塩と 50 mg/mlアスコルビン酸を含んだ α -MEM)で培養し、ALPアッセイのため、分化培養7日と14日後、Lab Assay ALP kitを用い細胞ALP活性を定量化し、アリザリンレッド染色のため、分化培養21日後、1%アリザリンレッドS溶液を用い細胞を染色した。

● WST-8増殖アッセイとBrdU取り込みアッセイ

細胞は無血清24時間後、NMB又はE2添加24時間培養し、またNMBRアンタゴニストBIM23127とMEK阻害剤U0126はNMB添加1時間前に添加した。細胞増殖を評価するため、Cell Counting Kit-8を用いWST-8増殖アッセイとcell proliferation enzyme-linked immunosorbent assay for BrdUを用いBrdU取り込みアッセイを行った。

● ウェスタンブロット法

細胞を無血清処理24時間後、10 nM NMBを添加し、NMB刺激0, 5, 10, 30分後、SDS/PAGEを行い、1次抗体(リン酸化ERKまたはERK抗体)を用い免疫ブロット法を行った。その後2次抗体と培養し、western blotting reagentを用い蛋白を検出した。

【結果】

我々は先ず NMB と NMBR のラット生体内の発現分布を調べるため、RT-PCR 分析を行ったところ、骨組織の NMB と NMBR 遺伝子は脳組織に匹敵するほど豊富に発現していた。そこで、マウス骨組織における NMB と NMBR 発現の局在を調べるため、免疫組織化学染色を行ったところ、骨組織の骨芽細胞と軟骨細胞に NMB と NMBR 蛋白発現を検出した。次に我々は RT-PCR 解析によりラット初代培養骨芽細胞とマウス軟骨細胞株 ATDC5 の NMB と NMBR 遺伝子発現を確認した。RP-HPLC を組み合わせた RIA を行ったところ、ATDC5 細胞から分泌された NMB 免疫活性が NMB10 であることが確認された。NMB 刺激は骨芽細胞と ATDC5 細胞の分化に影響を与えないが、骨芽細胞と ATDC5 細胞の増殖を促進し、その促進を NMBR アンタゴニスト BIM23127 処理は阻害した。骨芽細胞を用い細胞内シグナリングを調べたところ、NMB は ERK1/2/MAPK シグナリングを活性化し、骨芽細胞増殖を促進することが明らかとなった。骨形成に関わる代表的な調節因子の NMB 遺伝子発現に及ぼす効果を検討したところ、E2 刺激は NMB 遺伝子発現を増加させ、TGF β 1 刺激は減少させた。更に E2 による細胞増殖を BIM23127 処理は有意に抑制した。

【結論及び考察】

骨は常にリモデリングされ、古い骨は破骨細胞により壊され、新しい骨は骨芽細胞により作られ、この過程を多くの骨関連因子により制御されることが知られているが、骨での NMB の機能的役割は調べられていない。先ず、免疫組織化学によりマウス骨組織の骨芽細胞と軟骨細胞に NMB と NMBR 蛋白が共発現していたので、NMB は骨芽細胞と軟骨細胞においてオートクライン/パラクラインとして NMBR を介し機能することが示唆された。次に、NMB はマウス軟骨細胞株 ATDC5 とラット初代培養骨芽細胞の増殖を促進させ、分化に影響しなかったことから、NMB の骨増殖因子としての機能が示唆された。また、NMB は細胞内シグナリングとして ERK1/2 MAPK 経路を活性化させ、細胞増殖を促進することや、E2 による細胞増殖に一部寄与することから、NMB/NMB-R シグナリングのオートクライン/パラクライン骨形成調節因子としての新たな生理的役割が示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 239 号	学位申請者	齊藤 弘樹
審査委員	主査	乾 明夫	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	米澤 傑	副査 橋口 照人
	副査	小澤 政之	副査 井尻 幸成

Roles of Neuromedin B as a Regulatory Factor for Bone Formation
(骨形成における調節因子としてのニューロメディン B の生理的役割の解明)

ニューロメディン B (NMB)はボンペシン関連ペプチドの一つであり、腫瘍細胞株に対して増殖因子として作用することが報告されている。学位申請者らはラット骨組織における NMB とその受容体(NMBR)の発現を見出したが、NMB の骨での発現、生理作用は全く報告されていない。そこで、学位申請者らはマウス骨組織における NMB と NMBR の局在をマウス大腿骨の骨端において、免疫組織化学染色により観察した。次に、ラット初代培養骨芽細胞とマウス軟骨細胞株 ATDC5 における NMB の効果を検討するため、アルカリフォスファターゼ(ALP)アッセイ、アリザリンレッド染色、WST-8 増殖アッセイと BrdU 取り込みアッセイを行った。更に、NMB による骨芽細胞の増殖における ERK1/2 MAPK 経路の関与を検討するため、NMBR アンタゴニストを用いウェスタンブロット法、WST-8 増殖アッセイと BrdU 取り込みアッセイを行った。また、代表的な骨関連制御因子である bone morphogenetic protein 2 (BMP 2), 17 β -estradiol (E2), transforming growth factor β (TGF β)の NMB 遺伝子発現に対する効果をリアルタイム PCR により検討し、E2 による骨芽細胞の増殖に対する NMBR アンタゴニストの効果を検討した。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1) マウス骨組織の骨芽細胞と軟骨細胞に NMB と NMBR が有意に発現していた。
- 2) 骨芽細胞(初代培養)と軟骨細胞株(ATDC5)における NMB と NMBR の発現を確認し、それらの細胞から NMB が分泌されることを特異的ラジオイムノアッセイと逆相高速液体クロマトグラフィーにより確認した。
- 3) NMB は骨芽細胞と軟骨細胞の細胞増殖と DNA 合成を促進させたが、分化の指標である ALP 活性や石灰化を増加させなかった。また、骨芽細胞での NMB は NMBR と特異的に結合し、ERK1/2 MAPK 経路を活性化し、細胞増殖を促進することを NMBR アンタゴニストにより確認した。
- 4) 骨芽細胞の NMB 発現が TGF β 刺激により減少し、E2 刺激により増加した。また、E2 による骨芽細胞の増殖は NMBR アンタゴニストにより部分的に抑制された。

このように、骨芽細胞と軟骨細胞株から分泌された NMB はこれらの細胞に存在する NMBR に結合し、ERK1/2 MAPK 経路を介し、それらの細胞増殖と DNA 合成を促進したが、NMB はそれらの細胞分化に影響しなかった。また、E2 は NMB 発現を増加させるとともに、NMBR アンタゴニストが E2 による細胞増殖を抑制したことから、E2 による骨形成に NMB が関与することが示唆された。

本研究は、NMB の骨組織における発現と局在を明らかにするとともに、骨形成に関わるオートクライン・パラクラインとしての NMB の新規機能を提示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 239 号	学位申請者	齊藤 弘樹
審査委員	主査	乾 明夫	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	米澤 傑	副査 橋口 照人
	副査	小澤 政之	副査 井尻 幸成
<p>主査および副査の5名は、平成 25年 3月 11日、学位申請者 齊藤 弘樹 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) ニューロメディン B (NMB)は軟骨分化と骨分化のどちらに関わっているのか。 (回答) 骨における NMB の研究論文がなく、情報量が少ないことから、どちらの分化に関わるのか断定できない。なお、本研究の長管骨の骨端と成長板における NMB の免疫組織化学染色から考えると、NMB とその受容体(NMBR)陽性の軟骨細胞数が骨芽細胞数と比べ圧倒的に多く観察できるので、NMB が軟骨分化に関わるように見える。また、骨髄での NMB と NMBR 発現が非常に強いので、間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞を考えると、骨分化に対する NMB の効果も無視できない。</p> <p>質問2) NMB は広範囲に発現しているが、生理的に又は病的に機能しているのか。 (回答) 内因性 NMB は哺乳類で広範囲に存在し、多様な生理的機能の報告がある。また、肺がん患者において NMB が高発現し、NMB が腫瘍細胞の増殖を促進することが報告されている。</p> <p>質問3) 免疫組織化学染色では、細胞のどこが染色されているのか。増殖層で染色された軟骨細胞は形態だけチェックしたのか。他のマーカーとの共染をした方が良いのではないか。 (回答) 本研究の免疫組織化学染色において骨芽細胞と軟骨細胞全体がそれぞれ染色していることで、細胞質に NMB と NMBR が存在する。また、蛍光染色において、比較的細胞質の外側、おそらくゴルジ系細胞小器官や膜表面が染色されていることから、分泌直前の NMB と細胞表面に発現している NMBR が染色されている可能性が考えられる。増殖層の軟骨細胞は形態で確認した。他のマーカーとの共染による細胞の断定が望ましいが、軟骨細胞について形態が指標の一つと考える。</p> <p>質問4) ATDC5 細胞で Sox 9 は分化4日目から減少しているが、分化しているのか。 (回答) 分化の指標として、Sox 9 の他に、アルカリフォスファターゼ(ALP)アッセイとアリザリンレッド染色を行ったところ、ALP 活性/細胞は時間依存的に増加し、石灰化結節が 14 日目で染色されたことから、ATDC5 細胞は分化培地で分化していると考ええる。</p> <p>質問5) NMBR アンタゴニスト単独の処理は骨芽細胞の増殖を有意に低下させないが、内因性 NMB は機能していないのか。 (回答) 初代培養骨芽細胞から分泌される内因性 NMB 量が少ないために、NMBR アンタゴニスト単独処理による効果は有意な変化としてとらえられなかったと考える。</p> <p>質問6) 初代培養骨芽細胞と ATDC5 細胞の大きな違いは何か。それらの細胞の NMB 分泌において違いがあるのか。 (回答) RT-PCR 分析で、ATDC5 細胞の NMB と NMBR 遺伝子は初代培養骨芽細胞と比べると非常に強く</p>			

最終試験の結果の要旨

発現していることから、それらの発現量に大きな違いがあると考えられる。また、NMB 特異的ラジオイムノアッセイの結果から、ATDC5 細胞(7×10^6)からの分泌 NMB 量は 140 pg で、骨芽細胞(7×10^6)のは約 8.4 pg であったことから、ATDC5 の NMB 分泌が骨芽細胞と比較し 10 倍以上多い。

質問 7) TGF β が NMB 発現を低下させるメカニズムは何か。

(回答) 単離方法を引用した骨芽細胞の論文によると、TGF β はその細胞の分化を促進することから、細胞分化に伴い NMB 発現が抑えられる可能性がある。

質問 8) 酸化型 NMB は生理活性をもつのか。

(回答) 酸化型 NMB の生理活性の関連論文がないが、酸化型 NMB の活性は非酸化型 NMB とほぼ同じと考えられる。

質問 9) 他の分化誘導因子の存在での NMB の効果を試したか。早期分化マーカーを試したか。

(回答) 他の分化誘導因子を試していないが、BMP 2 の分化誘導に伴う NMB の効果について検討する価値がある。早期分化マーカーは試しておらず、今後、Cbfa 1 や I 型コラーゲンを試してみる予定である。

質問 10) 髄腔と骨髄が NMB 抗体と NMBR 抗体にて染色されているが、これはどの細胞が染色されているのか。

(回答) 骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化することから、髄腔と骨髄での間葉系幹細胞が染色される可能性がある。

質問 11) ヒト NMB 抗体はあるのか。ヒトで研究されているのか。ヒトでの分布の報告はあるのか。

(回答) ヒト NMB 抗体はあり、ヒト腸組織の正常と悪性上皮細胞での NMB 染色に用いて評価している報告がある。また、ヒト組織分布において NMB は脳や胃腸組織に発現している報告がある。

質問 12) NMB が将来的に骨粗鬆症における臨床応用の可能性はあるのか。

(回答) 本研究の結果を踏まえると、NMB が骨芽細胞の増殖を促進するので、強力な NMBR アゴニストが骨粗鬆症治療薬として使える可能性が考えられる。

質問 13) 骨での NMB と NMBR の発現量は他のペプチドと比べ多いのか。

(回答) 骨で NMB と他のペプチドの発現量を比較していないが、グレリン、ニューロペプチド Y、ニューロメディン U とそれらの受容体は骨芽細胞に発現していることが報告されている。

質問 14) ガストリン放出ペプチド(GRP)は骨に発現しているのか。

(回答) 我々は RT-PCR 分析により骨組織に GRP と GRP 受容体(GRPR)遺伝子の発現を認めるが、骨芽細胞において GRPR は発現していたが、GRP は発現していなかった。

質問 15) 骨の NMB のプロセッシングは他の組織と比べ同じか。

(回答) 骨そのものではなく、ATDC5 細胞における知見であるが、NMB 32 の免疫反応性ピークを認めなかったため、NMB 前駆体蛋白より直接、NMB10 へプロセッシングされると考えられる。

質問 16) 血中 NMB の影響はあるのか。

(回答) この研究で、骨組織の NMB と NMBR 遺伝子が脳組織同様に高発現していることから、骨組織におけるオートクライン・パラクラインとしての NMB の効果は血中 NMB と比べ重要であると考えられる。

質問 17) NMB のノックアウトマウスは存在するのか。骨におけるフェノタイプはあるのか。

(回答) NMBR のノックアウトマウスは存在し、骨におけるフェノタイプの報告はない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。