

学位研究紹介

張力刺激によりマウス頭頂骨縫合部に誘導される遺伝子群の解析  
Isolation of Tensile Stress-responsive Genes in Cranial Sutures of Mouse Calvariae

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻  
口腔健康科学講座 小児口腔科学分野

下村淳子

Division of Pediatric Dentistry,  
Department of Oral Health Science,  
Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences  
Junko Shimomura

【背景及び目的】

我々は機械的刺激的骨形成作用の機構解明とその応用に関する研究を目的としてマウス頭頂骨器官培養系を導入し、この系が従来知られている骨芽細胞の分化から石灰化にいたる骨形成過程を72時間で完了すること、又骨芽細胞の分化においてBMP-4の発現が重要な役割を果たすこと等を明らかにしてきた。本研究では、機械的刺激に対する本実験系の遺伝子発現変化を調べることにより本実験系の有用性をさらに確認した上で、刺激にตอบสนองして早期に変動する遺伝子をRNA fingerprinting by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (Differential Display法の変法、以下RAP-PCRと略す)法により検索し、その役割を明らかにすることを目的とする。

【材料及び方法】

生後3～4日齢のddYマウス頭頂骨を無菌的に切りだし、矯正用ワイヤーで作製したバネにより矢状縫合部に0.2g重の持続的張力刺激を加えた状態(実験群)及び張力刺激が加わらないように固定した状態(対照群)で、BGJb培地中で3又は6時間培養後、採取した縫合部組織からRNAを抽出した。このRNAを用いてRT-PCR法によりIGF- $\beta$ 、IGF- $\alpha$ 、connexin43 (Cx43)及びcbfa1の遺伝子発現を比較した。次にRNAをRNase-free DNase で処理した後、39通りの組み合わせのprimer対を用いてRAP-PCRを行った。その後各試料を6%ポ

リアクリルアミドゲルで電気泳動後銀染色を行い、対照群と実験群との間で発現量に差を認められたbandを切り出しDNA fragmentの抽出を行った。これを鋳型としてさらにPCRを行い再増幅が見られたものについてクローニングの後塩基配列を決定した。これらの中で既知遺伝子由来のものについては報告されている配列を、又未知遺伝子由来と考えられるものについては得られた配列を基にprimerを作製しそれらの遺伝子発現が実際に張力刺激により変化することをRT-PCR法により確認した。さらに骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)及びいくつかの前骨芽細胞様の間葉系線維芽細胞株を用いてその発現を検討した。

【結 果】

RT-PCRの結果、実験群においてIGF- $\beta$ 、IGF- $\alpha$ 及びCx43の発現量が対照群に比べて明らかに増加したがcbfa1については変化を認めなかった。

RAP-PCRにより得られたDNA fragments (13種類)の中で3種類についてはその後のRT-PCRにより張力刺激によって発現が上昇することが確認された(図1)。

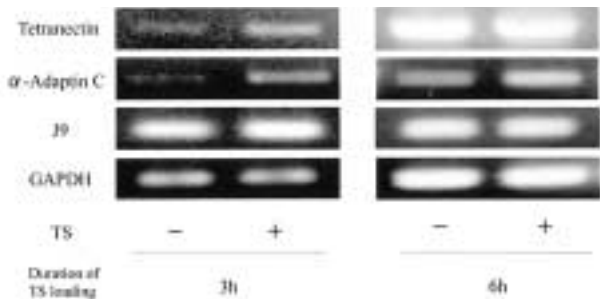


図1 Tetranectin、 $\alpha$ -adaptin C及びJ9のRT-PCR解析。これらの遺伝子発現は3時間の張力刺激(TS)により増加した。張力刺激後6時間ではtetranectinとJ9の発現レベルは対照群と同レベルに戻ったが、 $\alpha$ -adaptin Cは増加していた。

その中の2つのについては報告されているマウスtetranectin及び $\alpha$ -adaptin Cの配列とほぼ同一であったが、1つのクローン(J9)については未知遺伝子由来と考えられた。Tetranectinは、骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)及びいくつかの前骨芽細胞様の間葉系線維芽細胞株におけるその発現を調べたところ、骨芽細胞としての形質が強まるにつれて発現が弱まる傾向を認められた。一方Dexamethasoneと $\beta$ -glycerophosphate存在下で培養したMC3T3-E1の分化に伴う発現の変化を調べた

ところ、分化誘導後1週目から発現が上昇し2週目まで持続し以後は減少した(図2)。 $\alpha$ -adaplin Cは、3時

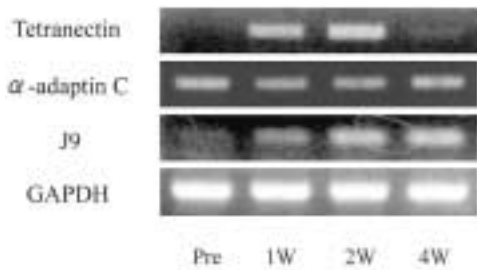


図2

MC3T3-E1細胞の分化に伴う遺伝子発現解析。

Pre: dexamethasoneと  $\beta$ -glycerophosphate を加える前のMC3T3-E1細胞。

1~4W: dexamethasoneと  $\beta$ -glycerophosphate を加えて1~4週間後のMC3T3-E1細胞。

間の張力刺激によりその発現が蛋白質レベルにおいても惹起されることをウエスタンブロットにより確認した(図3)。一方tetranectinと異なり、その遺伝子発現レベルは様々な間葉系細胞株の間でほぼ一定であり、MC3T3-E1の分化に伴う発現変化も認めなかった(図



図3

張力刺激を加えた状態もしくは加えない状態で培養した縫合部組織での  $\alpha$ -adaplin CのWestern blot解析。

AC1-M11抗体は  $\alpha$ -adaplin AとCのどちらも検出する。脳組織ではどちらも検出されるが、その他の組織(例えば肺)では  $\alpha$ -adaplin Cのみ検出されることが知られており、本図においてもそのことが確認された。図より張力刺激により増加するのは  $\alpha$ -adaplin C蛋白のみであることがわかる。

2)。J9はIL-1 receptor accessory protein (IL1RAcP) 遺伝子に介在するintron配列の一部であることが示され、その発現はMC3T3-E1の分化に伴い顕著に上昇した(図2)。

## 【考 察】

本実験系においても過去に機械的刺激による発現の変化が報告されているいくつかの遺伝子の発現が上昇したことから、本実験系の妥当性が再確認された。

RAP-PCR法により得られた3種類の遺伝子は3時間の張力刺激によりその発現が著しく増加することから、張力刺激による骨形成の初期に関与している可能性が高く、tetranectinとJ9については骨芽細胞の分化との関連性も示唆された。 $\alpha$ -adaplin Cは機械的刺激にตอบสนองしてEGF-R等の受容体を介したエンドサイトーシス依存性シグナリングを調節し、BMP-4等とともに間葉系細胞の分化を促進する可能性が考えられる。又未知遺伝子であるJ9はIL1RAcPのalternative splicingの産物としてIL-1のsignal伝達を抑制する可能性が考えられる。

本研究は、新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座細胞機能制御学分野にて行ったものである。

## 【参 考 文 献】

Ikegame, M., Ishibashi, O., Yoshizawa, T., Shimomura, J., Ozawa, H. and Kawashima, H.: Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture. *J. Bone Miner. Res.*, 16: 24-32, 2001.