

## 論文要旨等報告書

氏 黒田 知沙  
授与した学位 博士  
専攻分野の名称 歯学  
学位授与の番号 博甲第3799号  
学位授与の日付 平成21年3月25日  
学位授与の要件 医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)  
学位論文題名 Distribution, gene expression, and functional role of EphA4 during ossification (骨形成におけるEphA4の分布、遺伝子発現と機能的役割)  
論文審査委員 教授 長塚 仁 教授 山本 敏男 教授 滝川 正春

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

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髄も作り上げる。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。以前の研究で我々は、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 を検出した。Eph を介したシグナルは体節形成、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、その仕組みに関してはいまだ不明の点が多く残されている。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、軟骨における分布状況や機能は未だわかっていない。本研究では、長管骨組織における EphA4 の発現、分布と機能に関する新知見を得たのでここに報告する。

#### 【方法・及び材料】

免疫染色：生後1週のマウス脛骨の切片に抗 EphA4 抗体を反応させ、次に二次抗体である HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG を反応させた。またカバーガラス上で培養した SaOS-2 細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、抗 EphA4 抗体、抗核小体抗体を反応させ、さらに Alexa Fluor 標識の二次抗体を反応させた。

細胞培養：マウス成長軟骨細胞を胎生 18.5 日マウス肋軟骨からコラゲナーゼ処理により分離し、10%牛胎児血清(FBS) + 含有 α-MEM で培養した。HeLa(子宮頸部癌細胞株)、SaOS-2(骨芽細胞様細胞株)、MDA-231(乳癌細胞株)、HCS-2/8(軟骨細胞様細胞株)は 10%FBS + 含有 DMEM で培養した。

RNA 抽出とリアルタイム PCR：回収した細胞を RNA 抽出試薬 Isogen にて抽出した。リアルタイム PCR には LightCycler システムで TOYOBO SYBR GREEN PCR Master Mix を使用した。

ウェスタンブロット：4-20% 勾配ポリアクリルアミドゲルを使用し細胞から回収したタンパクを電気泳動し PVDF 膜に転写した。それに抗 EphA4 抗体を反応させ、さらに HRP 標識抗ウサギ IgG を反応させた。特異的シグナルは ECL Western Blotting Detection システムを使用し検出した。

si-RNA による遺伝子サイレシング：SaOS-2 細胞に siRNA 導入試薬 siPORT と共に siRNA をトランسفエクションした。3 日目に RNA 抽出試薬にて RNA を回収し、RNA 精製のち逆転写、リアルタイム PCR をおこなった。

アルカリホスファターゼ活性：酵素活性の評価は、パラニトロフェニルリン酸を人工基質とし、生成したパラニトロフェノールの吸光度を測定しで行った。

## 【結果】

### 1.マウス成長板における EphA4 の分布

EphA4 は、以前の研究で、ヒト軟骨細胞様 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、得られた全クローンの約 20%を占めていた。よってこの EphA4 の局在を免疫染色法にて確認した結果、肥大軟骨細胞層、および骨領域で EphA4 の明確な局在を認め、静止、増殖軟骨細胞層には EphA4 は検知されなかった。

### 2.in vitro における内軟骨性骨化における EphA4 遺伝子発現の特性

結合組織成長因子 *ccn2* と *epha4* の遺伝子発現パターンを、胎生 18.5 日マウス肋軟骨より分離、培養した軟骨細胞を用いて解析した結果、*ccn2* は分化培養開始後 25 日でピークを迎えたのに対し、*epha4* はその後の分化の最終段階で遺伝子発現が急上昇した。次に、ヒト細胞株における EphA4 mRNA 発現の比較検討を RT-PCR によりおこなった。*epha4* の発現を各種細胞種で比較した結果、MDA231、SaOS-2、HCS-2/8 で EphA4 mRNA が検出された一方、HeLa では発現が認められなかった。EphA4 の発現、産生の量的な違いを検討するために、リアルタイム PCR 法とウエスタンプロット法により検討を行った。リアルタイム PCR 法による分析の結果、SaOS-2 では、HCS-2/8 に比べて大幅に EphA4 の発現量が多い事がわかり、ウェスタンプロット法によるタンパク質レベルでの解析でも、HCS-2/8 よりも SaOS-2 で強い EphA4 分子のシグナルが検出された。

### 3.造骨細胞表現型における EphA4 ノックダウンの影響

EphA4 の機能を探るために SaOS-2 細胞に対して siRNA を用いた *epha4* 遺伝子ノックダウン実験を行った。*epha4* 遺伝子が実際にノックダウンされている事を確認したのち、同じ条件下で骨芽細胞のマーカー遺伝子である *osteocalcin* とアルカリフォスファターゼ (ALPase) の mRNA の発現を調べたところ、それぞれで発現の低下を認めた。さらに ALPase 活性の変動をみたところ、ノックダウン効果の強い siRNA の導入でわずかながら低下がみられた。

### 4.SaOS-2 細胞における EphA4 の細胞内局在

次に、SaOS-2 細胞における EphA4 の局在を明らかにするために、蛍光免疫染色を行った。レーザー共焦点顕微鏡を用いた観察では、EphA4 は細胞表面だけでなく、核内の小構造にも集積している像がみられた。そこで核小体のマーカーである nucleolin に対する抗体を用い、SaOS-2 細胞における核内 EphA4 の局在を再検討すると EphA4 の核内の集積が見られるも、核小体とは別の部位に局在する事がわかった。

## 【考察】

本研究では骨芽細胞の形質維持における EphA4 機能の必要性が初めて示唆された。そして、骨芽細胞での EphA4 のこの新しい機能は、今まで報告されている EphA4 分子によって調節されるフォワードシグナル経路を介した機能と全く異なるので、造骨細胞におけるこの機能が、EphA4 の核内移行による新たなシグナリング経路を介して行われている可能性もある。

## 論文審査結果の要旨

Eph 分子は受容体型チロシンキナーゼであり、EphA 群、EphB 群に大きく分けられ、現在ヒトでは EphA1～EphA8、EphB1～EphB4 および 6 という名称で整理されている。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進んでいるが、骨、軟骨における分布状況や機能は未だ不明である。本研究では、軟骨細胞様細胞株 (HCS-2/8)において強く発現していた EphA4 の骨形成における役割を探ったものである。

その結果、明らかになったこととして以下の点を挙げている。

1. 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いた。
2. 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)で急上昇が見られた。
3. In vitro の実験において、EphA4 の遺伝子発現は、軟骨細胞様細胞株 (HCS-2/8) より骨芽細胞様細胞株 (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。
4. EphA4 の機能を調べるため、骨芽細胞様細胞株 (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。
5. 骨芽細胞様細胞株 (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たものである。

よって、本研究は博士（歯学）の学位論文に値するものと認めた。