The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	平滑筋特異的遺伝子に関する分子遺伝学的研究 : 平滑筋カルポニン遺伝子の骨形成過程における新機能の発見
Author(s)	山村, 倫子
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155601
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

平滑筋特異遺伝子に関する分子遺伝学的研究

－平滑筋カルポニン遺伝子の骨形成過程における新機能の発見－

1998年

山村倫子

①

平滑筋特異遺伝子に関する分子遺伝学的研究

- 平滑筋カルポニン遺伝子の骨形成過程における新機能の発見 -

1998年

山 村 倫 子

目次

緒論 2

本論 5

第一章　ヒト塩基性カルポニンおよびSM22α遺伝子のクローニングおよび発現調節機構 5

第一節　クローニング、転写開始点の決定、エキソン・イントロンの構築 5

第二節　プロモーターの構造 7

第三節　プロモーターの転写活性に対するCpGメチル化の影響 9

第四節　考察 11

第二章　ヒト塩基性カルポニンおよびSM22α遺伝子の発現- 12

第一節　ヒト組織および培養細胞における発現 12

第二節　骨芽細胞系細胞における発現 12

第三節　骨肉腫の病態との関連 14

第四節　考察 17

第三章　塩基性カルポニン遺伝子欠失マウスの作製とその解析 18

第一節　ターゲッテングベクターの構築とマウスカルポニン遺伝子の発現 18

第二節　骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein)に対する応答性の亢進 20

第三節　考察 23

総括 25

結論 26

謝辞 27

実験の部 28

引用文献 39

Abbreviation

PTCA; percutaneous transluminal coronary angioplasty
BMP; bone morphogegenetic protein
αSMA; α smooth muscle actin
CH-domain; calponin homology domain
FITC; fluorescein isothiocyanate
bp; base pair
Sp1; specificity protein 1
ERE; estrogen responsive elements
TPA; 12-o-tetradecanoilphorbor 13-acetate
AP1; activator protein-1
MeCP2; methyl CpG-binding protein-2
SRF; serum response factor
CArG; $CC(A/T)_6GG$
MEF-2; myocyte enhancer binding factor-2
PASMC; pulmonary artery smooth muscle cells
luc; luciferase
RT-PCR; reverse transcriptase polymerase chain reaction
MNNG; N-methyl-N'-nitro-N-nitrsoguanidine
GAPDH; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
ES; embryonic stem cell
DMEM; Dulbecco's modified Eagle's medium
FCS; fetal calf serum
SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
BSA; bovine serum albumin
rhBMP; recombinant human BMP
ALP; alkaline phosphatase
dpc; days post coitum
SSC; sodium choloride and sodium citrate
DIG; digoxigenin

緒　論

「ヒトは血管から老いる」という言葉が示すように、脳卒中や心臓病など血管の病気は老化の研究の重要課題である。血管の老化を理解するためには、その血管の主たる構成細胞である、内皮細胞や平滑筋細胞の発生と分化の機構を明らかにしなければならない。血管平滑筋細胞に特異的に発現する遺伝子の発現調節機構とその機能を明らかにすることは有力な手掛りとなり得る。

平滑筋は、心筋や骨格筋などの横紋筋とは細胞の微細構造や収縮調節機構が異なる。最も重要な相違点は、横紋筋では筋芽細胞から成熟筋管細胞に最終分化した後はもはや分裂増殖能がないのに対し、平滑筋は収縮型平滑筋細胞に最終分化した後も、種々の刺激で分裂増殖し得ることである[1]。増殖した平滑筋は、そのフェノタイプが、胎児期でみられる筋フィラメントに乏しく蛋白合成や細胞外マトリックスの分泌が盛んな合成型へと変化する。平滑筋細胞の収縮型から合成型へのフェノタイプ変換は、動脈硬化病変の形成や冠動脈形成術 (PTCA) 後の新生内膜の過形成による再狭窄の成立に基本的な役割を果たしているといえる[2]。

Fig.1 は、血管病の代表である動脈硬化病変の形成と進展を示す模式図である。正常な血管は、収縮・弛緩機能をもつ分化した収縮型平滑筋からなる中膜と一層の内皮細胞で構成されている。内皮細胞が機械的に傷害剥離されたり高脂血症の病態が続くと、平滑筋は増殖しそのフェノタイプが、胎児期で見られる合成型フェノタイプへと脱分化する。合成型平滑筋は、内膜に向かって遊走し増殖し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを合成して繊維化病変を形成する。

動脈硬化部位のプラークの破裂は心筋梗塞の最も直接的な引きがねであるが、動脈硬化巣は古くなると石灰化を来し、プラーク部位の力学的な不安定性の原因となることが知られている。Virchow は1863 年に動脈硬化部位の石灰化病変が、骨形成過程に類似した骨化であると指摘した[3]。最近、血管病変部の細胞が骨芽細胞のマーカーである osteopontin や 、matrix Gla protein 、骨形成因子 (BMP) などを発現することが示され、この考えは基本的には、正しいものと考えられている[4, 5]。しかし、血管壁の骨芽細胞様細胞の起源に関しては、血管周細胞や、脱分化した合成型平滑筋細胞に由来するものと推定されているが、そのフェノタイプ変換や骨化の機構については全く手掛かりが得られていない (Fig.1)。

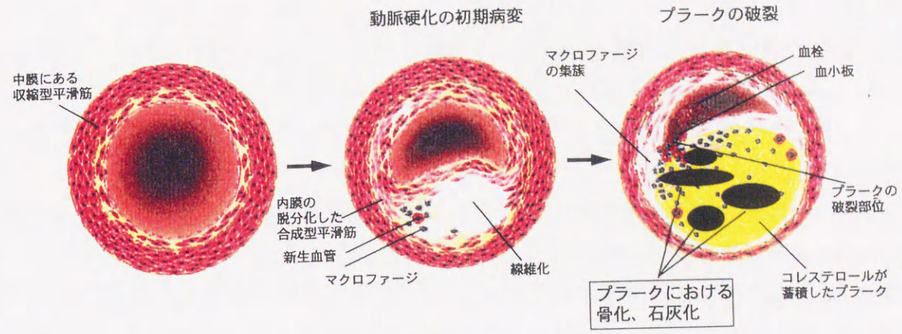


Fig. 1 Changes in smooth muscle cell phenotype and ectopic ossification in atherosclerotic arteries. (Revised from [6])

動脈硬化の病態を明らかにし、プラーク破裂の防止など有効な治療法を開発するためには、成熟した収縮型平滑筋から、未分化な合成型平滑筋へのフェノタイプ変換や、骨形成のoriginである骨芽細胞様細胞の形成のメカニズムを明らかにしなければならない (Fig. 2) 。そのための1つのアプローチとして、分化型と未分化型のそれぞれの平滑筋細胞で発現している遺伝子の中から、フェノタイプ変換に伴ってその発現が変化する遺伝子をスクリーニングする方法がある(differential hybridization 法)。1993年ケンブリッジ大学のShanahanらは、その方法を用いて、収縮型平滑筋と合成型平滑筋のそれぞれの細胞で発現している遺伝子の中から、未分化な平滑筋細胞で発現が低下する遺伝子として、カルポニンとそのホモログSM22αをコードする遺伝子があることを明らかにした[7]。

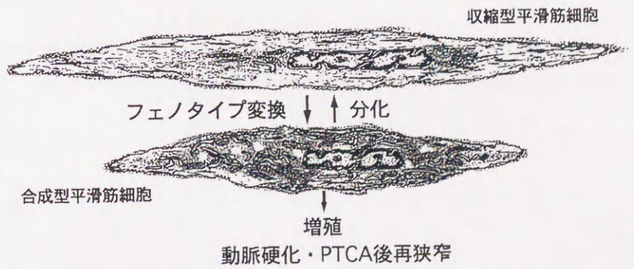


Fig. 2 Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cell.

カルポニンは平滑筋細胞のアクチン、トロポミオシン、カルモデュリンと結合する分子量34000の蛋白質として、1986年に高橋らがニワトリ砂嚢平滑筋からはじめて単離、精製し、その生化学的諸性質と一次構造を明らかにした[8-10]。その命名は*Calponin: cal*modulin-binding tro*ponin* T-like protein に由来している[8]。カルポニンのN末端領域には、Vav 癌遺伝子の発癌抑制部分と相同性を持つ領域 calponin homology domain (CH domain) が存在する (Fig. 3)。

SM22αは1987 年 にSmillie らによりニワトリ砂嚢平滑筋から単離精製された。カルポニンのN末端側 2/3 のアミノ酸配列とおよそ 60%の相同性をもつ分子量 22000 の蛋白質である[9] (Fig.3)。ヒトでは早老症 Werner 症候群患者の線維芽細胞に過剰発現している遺伝子 WS3-10 としてcDNAがクローニングされた[10]。しかし、ヒトカルポニン遺伝子やSM22α遺伝子の発現を抑制する転写制御のメカニズムは明らかでなく、遺伝子発現の低下が *in vivo* において細胞機能にどのような影響を与えるのかという問題も解明されていない。

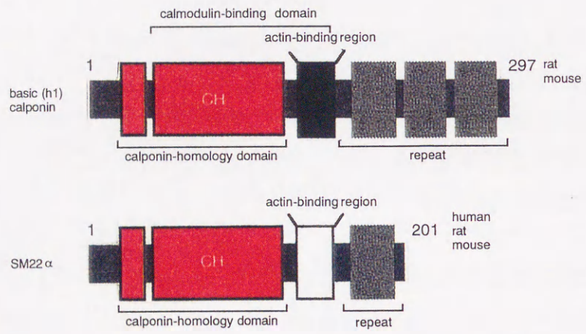


Fig. 3 Domain structure of basic calponin and SM22α.The CH-domain is homologous to the tumor supressor domain of the Vav proto-oncogene products.

そこで本研究では、平滑筋特異遺伝子であるカルポニンとSM22αに着目し、第一章では、両遺伝子をヒト白血球ゲノムライブラリーよりクローニングし、ヒト動脈硬化病変における発現と平滑筋および筋芽細胞における転写抑制のメカニズムを検討した。また、第二章では、骨形成のoriginである骨芽細胞系細胞における両遺伝子の発現を検討した。さらに、第三章では、カルポニン遺伝子の発現低下が*in vivo*での細胞機能にどのような影響を与えるかを検討するために、ノックアウトマウスを作製しその表現型を解析した。

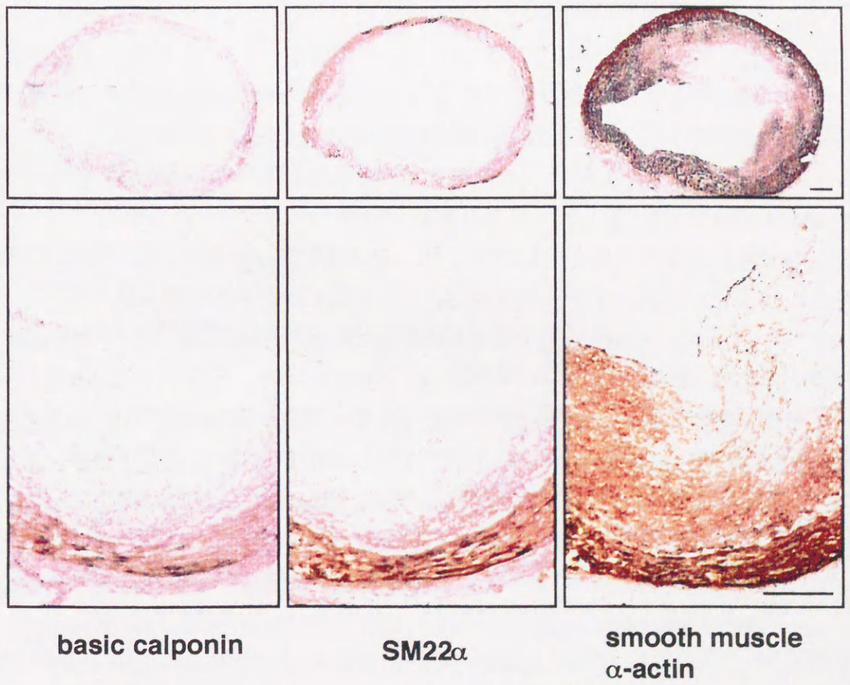
本論

第一章　ヒト塩基性カルポニンとSM22α遺伝子のクローニングおよび発現調節機構

第一節　クローニング、転写開始点の決定、エキソン・イントロンの構築

冠動脈硬化病変部と冠動脈PTCA後 6 日目の血管平滑筋における塩基性カルポニンとSM22α蛋白の発現を、ヒト塩基性カルポニンおよびヒトαSMAに対するモノクローナル抗体とヒトSM22αに対するポリクローナル抗体を用いて検討した (Fig. 4 (a), (b))。動脈硬化部位の新生内膜とPTCA後の中膜平滑筋層の αSMA 陽性細胞において、SM22αは中膜の内側1/2 の細胞で、また、塩基性カルポニンは新生内膜と中膜のほとんどの細胞で発現が低下していた。動脈硬化病変部位と内膜損傷後に新生内膜で増生する平滑筋細胞は、未分化型への形質変換に伴って、遊走能と増殖性を獲得する[1,2]。平滑筋のフェノタイプ変換に伴うヒトカルポニンとSM22α遺伝子の発現低下のメカニズムを明らかにするために、両遺伝子のクローニングを行ないその発現制御機構を検討した。

a



b

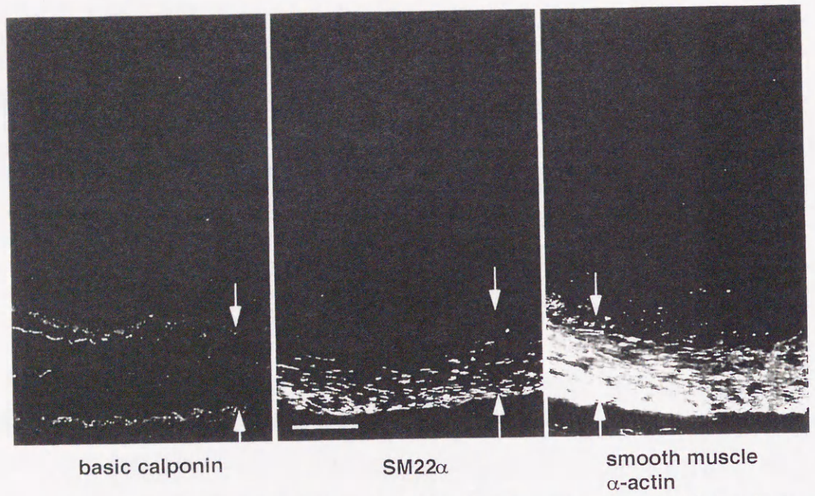


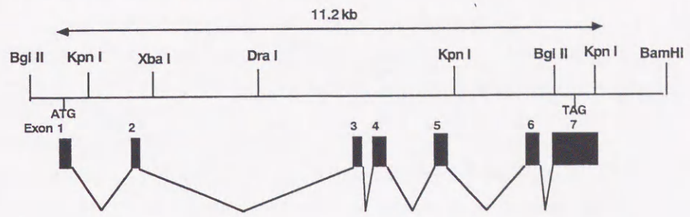
Fig. 4 Down regulation of basic calponin and SM22α in athercsclerotic artery (**a**) and post-PTCA artery (**b**). Serial sections of frozen human coronary arterier were labeled with monoclonal antibodies raised against human basic calponin and α-smooth muscle actin or with a polyclonal antibody to SM22α. Expressions of basic calponin, SM22α and smooth muscle α-actin were visualized by peroxidase-labeled (**a**) and FITC-labeled 2nd antibodies (**b**). The arrows in (**b**) indicate medial smooth muscle layer. The scale bar represents 200 μm.

1) クローニングおよびエキソン・イントロンの構築

ニワトリ砂嚢平滑筋カルポニンβアイソフォーム cDNAの *Sac* I-*Sma* I 断片[9]を、P^{32} でラベルしたプローブを用いて、ヒト大動脈平滑筋 λZAPII cDNAライブラリーをスクリーニングし、ヒト塩基性カルポニンの全長 cDNAを得た (DDBJ/GenBank™/EMBL database ; accession No. D17408)。また、ニワトリ砂嚢平滑筋 SM22αのアミノ酸配列からカルポニンとの間で最も相同性が低く、しかもコドンの縮重の少ないアミノ酸が多い領域よりアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し、ヒト胎児大動脈平滑筋の λgt 11cDNA ライブラリーよりヒトSM22αの全長 cDNAを得た(DDBJ/GenBank™/EMBL database ; accession No. D17409)。

カルポニン遺伝子とSM22α遺伝子は、それぞれヒト塩基性カルポニンの全長 cDNAと、ヒトSM22αの全長 cDNAをプローブにして、末梢血 EMBL3ゲノムライブラリーをスクリーニングし、各々 2 個の全長クローンを得、塩基配列を決定した。カルポニンは 7 つのエキソンと6つのイントロンよりなるおよそ 11.2 kbの遺伝子であること、また、SM22αは 5 つのエキソンと4つのイントロンよりなる 5.5kb の遺伝子であることが解った (DDBJ/GenBank™/EMBL database ; accession No. D84342-D84344)。両遺伝子のエキソン・イントロン境界部位では、スプライシングのコンセンサス配列 (gt/at) がよく保存されていた。Fig. 5 に両遺伝子のエキソン・イントロン構築を示す。

a human basic calponin gene



b human SM22α gene

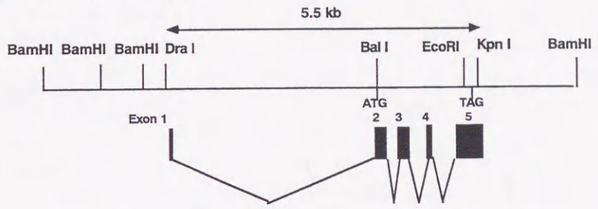


Fig. 5 Structure of the human basic calponin gene (**a**) and the human SM22α gene (**b**). A schematic representation of the exon-intron organization and partial restriction endonuclease maps. Exons are shown as closed boxes.

2) 転写開始点の決定

ヒト塩基性カルポニンはプライマー伸長法にてATG 翻訳開始点の上流 101bp に、SM22αはオリゴキャッピング法[13]を用いてATG翻訳開始点 の上流 79bp に、主要な転写開始点を決定した。

第二節　プロモーターの構造

1) 塩基性カルポニン遺伝子

塩基性カルポニン遺伝子プロモーター領域には、TATA-boxは無く、筋分化に関わる E-box (CANNTG)、基本転写に必要なCCAAT-box、GC-box/Sp1-結合配列(CCGCCC/GGGCGG)、エストロゲン応答配列 (ERE)、GATA結合部位(AGATAA)、TPA-応答配列/AP1結合部位(TGACTCA)などのコンセンサス配列が存在し、5'上流域 -775～-554の領域には、*Alu* 反復配列が存在した。一方、-559～+154 の領域は、5'プロモーター領域と 5'非翻訳領域および蛋白翻訳領域を含むが、この塩基配列は、メチル化 CpG 結合蛋白(MeCP2)アフィニテイーカラムを用いて、1994年にBirdらによって同定された、DNA フラグメントの配列と完全に一致した[14, 15](Fig. 6)。このことは、塩基性カルポニン遺伝子のプロモーターがDNAのメチル化によって、調節されている可能性を示唆している。

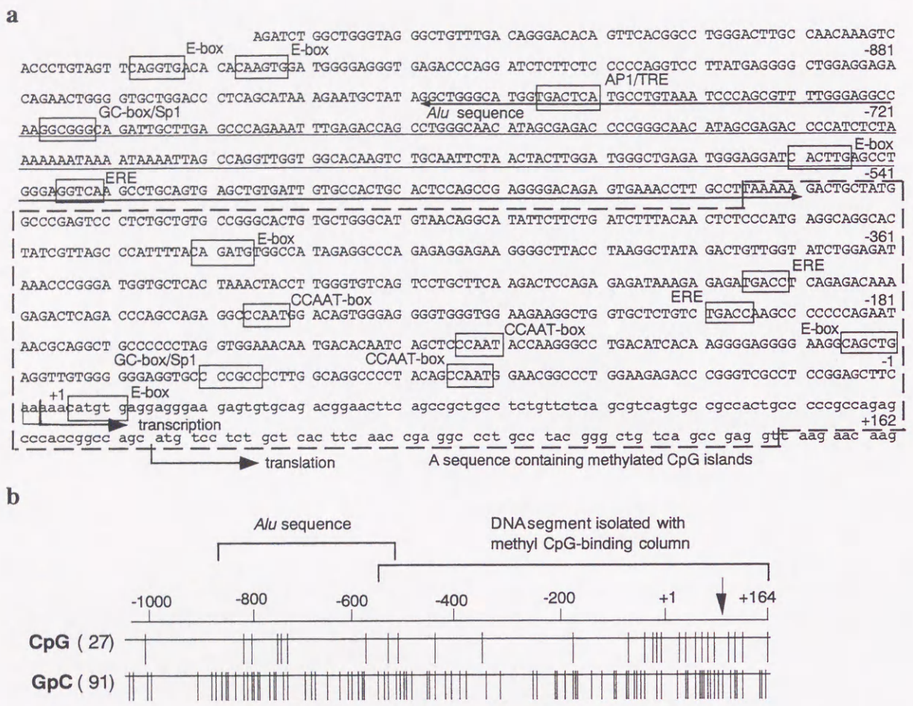


Fig. 6 Sequence analysis of the 5'-flanking, 5'-untranslated, and amino-terminal protein coding regions of the human basic calponin gene. (**a**) Known regulatory elements are boxed. The *Alu* repetitive sequence is underlined. A DNA segment identified with a methyl CpG-binding protein affinity column is boxed with a broken line. (**b**) CpG and GpC plots covering the region of genomic DNA described in (**a**). The arrow indicates the translation start site (ATG initiation codon).

2) SM22α遺伝子

SM22αプロモーターの転写開始点の近傍にはTATA-boxや、イニシエーターのコンセンサス配列はないが転写開始点の上流28-bpにTTTAAA配列が存在していた。ヒトSM22α遺伝子の5'上流-270～-1のプロモーター領域は、マウスおよびラットのSM22α遺伝子[16, 17]においてもよく保存されており、特に-274と-147に存在する2つのCArG/SRF-box ($CC(A/T)_6GG$)と、-233に存在するGC-box/Sp1-結合部位(CCCGCC/GGCGGG)は、ヒト、マウス、ラットの間で100%保存されていた。また5'上流2160bpの領域には、GC-box/Sp1結合部位が-1635に存在し、筋肉細胞に特異的な遺伝子に認められるMEF-2様配列 ($(C/T)TAAAAATAAC(C/T)_3$)が-573に存在していた。2つのCArG/SRF-boxを含む、5'上流およそ450bpの領域はマウスSM22α遺伝子の平滑筋組織特異的な発現に重要であることが明らかにされている[18]。この領域には、DNAメチルトランスフェラーゼの認識配列であるCpG配列が9個存在していた。(Fig. 7)

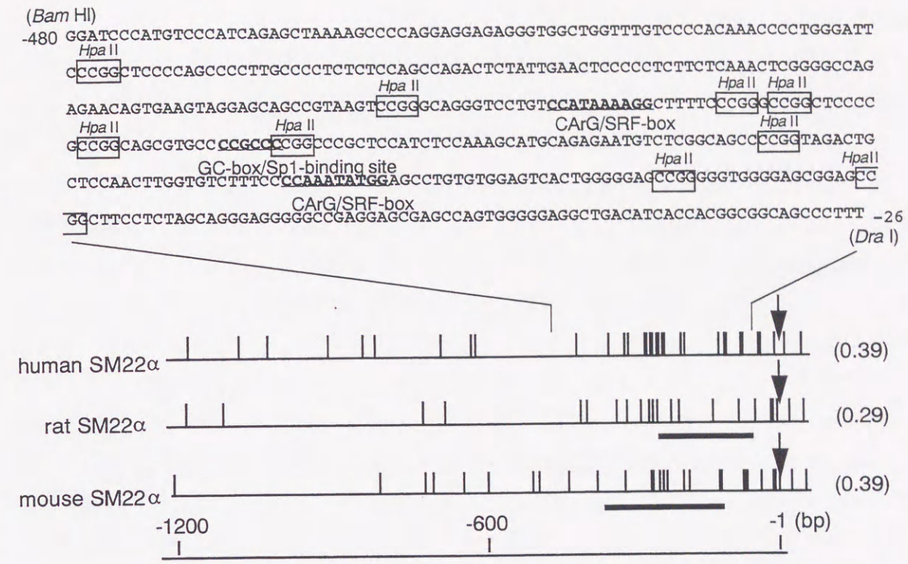


Fig. 7 Distribution of the CpG dinucleotides within the 1200-bp 5'-flanking region of the human, rat, and mouse SM22α genes. Nucleotide sequence of the 455-bp segment of the human SM22α promoter is shown. HpaII methylation sites are boxed and indicated. Two CArG/SRF-boxes and the proximal GC-box/Sp1-binding site are underlined and denoted in bold. The start of transcription is denoted by arrows. The underlined segment of the rat and mouse SM22α genes [16,17] indicates the minimum promoter region required for optimal expression in smooth muscle cell cultures. The numbers in parenthesis represent CpG/GpC ratio within the 1200-bp 5'-flanking sequence of each gene.

第三節　プロモーターの転写活性に対するCpGメチル化の影響

組織特異的な遺伝子はCpG island (CpG/ GpC比～0.2) をもたず、ハウスキーピング遺伝子はCpG island (CpG/ GpC比＞0.6) をもつことが報告されている[19]。ヒト塩基性カルポニン遺伝子の5'上流-1057～+164の領域とヒトSM22α遺伝子の5'上流-1137～+63の領域は、CpG/ GpC比が各々0.30と0.39で、組織特異的遺伝子の特徴を示していた。プロモーター領域のDNAメチル化はその遺伝子の転写効率を低下させることが報告されている[19, 20]。最近、DNAのメチル化によるプロモーター活性の抑制は、メチル化されたCpG配列に直接結合するメチル化CpG結合蛋白(MeCP2)を介して行なわれることが明らかにされた[21]。塩基性カルポニン遺伝子のプロモーター領域にMeCP2結合配列が存在すること(Fig. 6)、また、SM22α遺伝子の転写活性に重要なCArG/SRF-boxの周囲にCpG配列が集中して存在することから(Fig. 7)、塩基性カルポニンとSM22α遺伝子のプロモーター活性がDNAのメチル化により調節されている可能性が考えられた。

1) 塩基性カルポニン遺伝子

マウス塩基性カルポニン遺伝子プロモーターの転写活性に必要な領域 [22] に相当するヒト塩基性カルポニンプロモーターの-284～+137 の領域を、ルシフェラーゼレポータープラスミドpGL2 に連結して、ラット肺動脈由来の平滑筋細胞 (PASMC) にリポフェクション法でトランスフェクションし、プロモーター活性を測定した。塩基性カルポニンの421-bp のプロモーター領域には、3 個の *Hpa* II 部位 (-CCGG-) が存在するので、*Hpa* II 部位を *Hpa* II DNA methyltransferase を用いてメチル化した。その結果、プロモーター活性はメチル化しない対照を100%とした場合、22.5±1.5%と有意に減少した (Fig. 8 (a))。

2) SM22α遺伝子

マウスやラットSM22α 遺伝子[16, 17]の転写活性に必要な-480～-26の領域を、ルシフェラーゼレポータープラスミドpGL2に連結して、PASMCとマウス骨格筋筋芽細胞 (C2C12)にリポフェクション法でトランスフェクションし、前項と同様にプロモーター活性を測定した 。この SM22α 遺伝子の 455-bp のプロモーター領域には、9 個の*Hpa* II 部位が存在する (Fig. 7)。この*Hpa* II 部位をメチル化すると、プロモーター活性はメチル化しない対照に比し PASMCでは32.8±1.3%、C2C12では25.5±7.4%と、有意に減少した (Fig. 8 (b))。

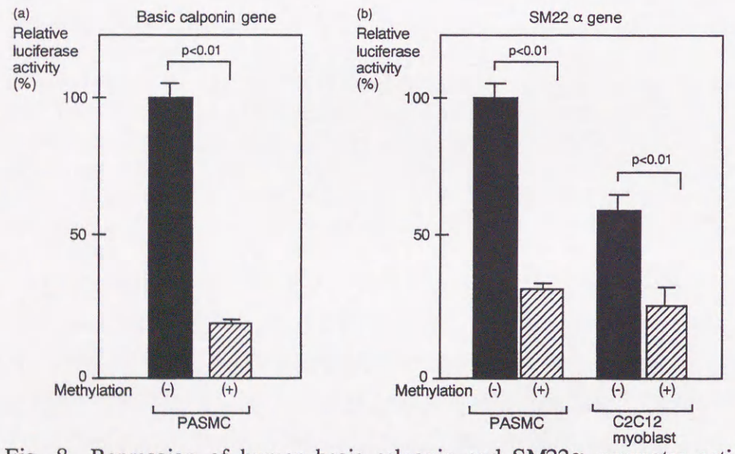


Fig. 8 Repression of human basic calponin and SM22α promoter activity by cytosine DNA methylation. The basic calponin promoter (**a**) and SM22α promoter (**b**) fragments with or without CpG methylation by *Hpa*II methyltransferase were ligated into the luciferase reporter genes, and transfected into rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) and mouse undifferentiated skeletal muscle myoblasts (C2C12) in the growing culture condition. Luciferase activities (light unit) were corrected for variations in transfection efficiencies as determined by β-galactosidase activities and amounts of protein. Activities were normalized for transfection efficiency by comparing the activities of pSV2-luc gene in differnt cell lines, and are expressed relative to that of the unmethylated luciferase construct in PASMC. Experiment was repeated four times, and data are means ± SE (n=6) from a representative experiment. Statistical analysis was performed using unpaired Student t-test.

第四節　考察

ヒト塩基性カルポニン遺伝子とヒトSM22α 遺伝子をはじめてクローニングし、両遺伝子プロモーターの転写活性がプロモーター領域のシトシンメチル化によって抑制されることを明らかにした。これまで両遺伝子は、平滑筋への分化を特徴づけるマーカーとされてきた [2]。実際、ヒト動脈硬化病変における塩基性カルポニン蛋白とSM22α 蛋白の発現を免疫組織学的に検討すると、脱分化した平滑筋細胞で両蛋白の発現がともに低下していた。この結果は、Shanahanらが in situ hybridization法を用いてヒト動脈硬化病変を解析した結果 [5] とよく一致しており、発現低下がmRNAのレベルで起こっていることを示している。脱分化した平滑筋細胞は、マトリックス蛋白を合成、分泌し、遊走や増殖する能力を獲得することから、塩基性カルポニン遺伝子が平滑筋細胞の遊走や増殖の抑制機能をもつことが推測された。最近、Jiangらはアデノウイルスベクターを用いてニワトリ砂嚢カルポニンのcDNAをウシの線維芽細胞と平滑筋細胞にトランスフェクションし、遊走と増殖を抑制し得ることを報告している [23]。

カルポニン遺伝子やSM22α 遺伝子がダウンレギュレーションを受けるメカニズムを明らかにするために両遺伝子をヒトのゲノムライブラリーからクローニングし、プロモーター領域を解析した。メチル化CpG結合蛋白MeCP2は、DNAの塩基配列には無関係にCpG配列の密度に応じて遺伝子の転写活性を抑制することが知られている[20,21]。ヒト塩基性カルポニン遺伝子とヒトSM22α 遺伝子の5'上流領域の塩基配列やシスエレメントは全く異なっているが、転写開始点の近傍にCpG配列が集中して存在することは両遺伝子に共通している。in vitroのCpGメチレーションによって両遺伝子の発現がともに抑制されることから、MeCP2がカルポニン遺伝子とSM22α 遺伝子に共通する転写抑制因子として作用しているものと思われる。このことは、動脈硬化病変部の脱分化した平滑筋細胞で、プロモーター領域の構造が異なるカルポニン遺伝子とSM22α 遺伝子が同時にダウンレギュレーションを受けることを説明するのに好都合である。両遺伝子を発現している中膜平滑筋と発現していない内膜平滑筋との間で、プロモーター領域に存在するCpG配列のメチレーションパターンの違いがあるかどうかを検討することによって、動脈硬化の病態において、メチル化による発現抑制のメカニズムを明らかにすることができると思われる。

第二章　カルポニンおよびSM22α遺伝子の発現

第一節　平滑筋組織における発現

ヒト胎児組織および培養細胞におけるカルポニンとSM22α遺伝子の発現をノーザンブロット法で解析した。大動脈、小腸等の平滑筋組織、胎盤、骨格筋芽細胞、心筋(心室および心房)、肺、脾臓、腎臓等の血管平滑筋を多く含む組織で、1.6kbの塩基性 カルポニンmRNAと1.2kbのSM22α mRNAの発現が認められた。副腎皮質や胸線、小腸上皮癌細胞株(Caco-2)、肝癌細胞株 (Hep3B)と子宮頚癌細胞株 (HeLa 細胞)では発現は認められなかった。一方、未分化なヒト骨格筋筋芽細胞株である HUSK-1 細胞では両遺伝子ともに高い発現が認められた (Fig. 9)。

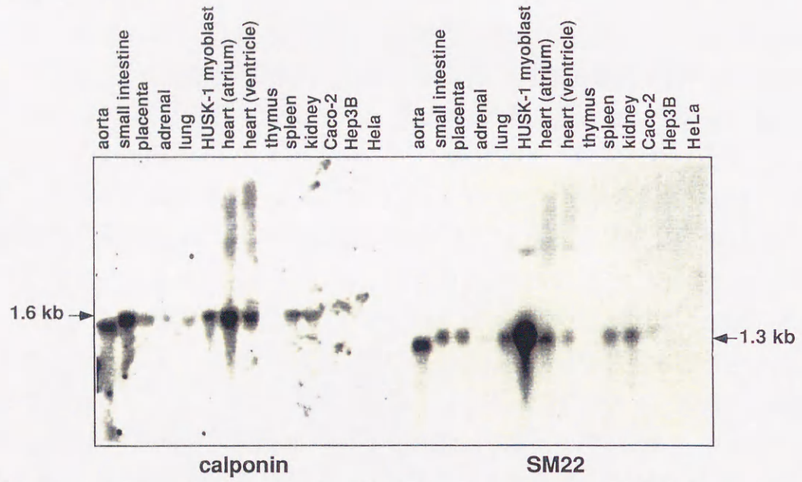


Fig. 9 Northern blot analysis of basic calponin (left) and SM22α (right) mRNA in human fetal tissues and the cell lines. Each lane contains 10 μg of total RNA isolated from the indicated tissues and the cells.

第二節　骨芽細胞系細胞における発現

ヒトの 動脈硬化病変の内膜には石灰化や軟骨および骨の形成が認められることが古くから知られている[1]。最近、培養神経堤細胞への骨形成因子(BMP)の添加により、神経堤細胞を、塩基性 カルポニンおよびαSMAを発現する平滑筋様細胞へと分化誘導し得ることが報告されている[24]。また、ヒトの骨肉腫組織でαSMA遺伝子の発現が報告された[25]。これらの観察は、骨芽細胞系細胞と平滑筋細胞が、細胞系列の上で関係していることを示唆している。そこで、骨芽細胞系細胞である8 種類のヒト骨肉腫培養細胞株 Saos、OS^{Rb}/N-M、HuO9、HuONY、HuO3NI、OST、HOS、MNNG-HOS におけるカルポニンとSM22α遺伝子の発現を、 Table 1 に示したそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いたRT-PCR 法および特異抗体を用いたイムノブロット法で検討した。

Table 1

OLIGONUCLEOTIDE SEQUENCES AND PRODUCT SIZES

Gene	Primers used		Product size (bp)
basic calponin	sense anti-sense	5'-GAGTGTGCAGACGGAACTTCAGCC-3' 5'-GTCTGTGCCCAACTTGGGGTC-3'	671
neutral calponin	sense anti-sense	5'-CTGCAGAGCGGGGTGGACATTGGC-3' 5'-GCCGGCCTCCTCCTGGTAGTAAGG-3'	519
acidic calponin	sense anti-sense	5'-GGAAGCGAAGTGCGAGAGACC-3' 5'-CTGTGTGGATCTAATAATCAATGC-3'	1061
SM22α	sense anti-sense	5'-CGCGAAGTGCAGTCCAAAATCG-3' 5'-GGGCTGGTTCTTCTTCAATGGGG-3'	928
caldesmon	sense anti-sense	5'-GTCACCAAGTCCTACCAGAAGA-3' 5'-GCTGCTTGATGGGTCGATTTGA-3'	744 (L) 1508 (H)
smooth muscle α-actin	sense anti-sense	5'-CCAGCTATGTGAAGAAGAAGAGG-3' 5'-GTGATCTCCTTCTGCATTCGGT-3'	965
GAPDH	sense anti-sense	5'-CCCATCACCATCTTCCAGGA-3' 5'-TTGTCATACCAGGAAATGAGC-3'	731

L, mRNA for low molecular weight isoform; H, mRNA for high molecular weight isoform.
GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

骨肉腫培養細胞ではカルポニンの3つのアイソフォームとSM22αおよびαSMA、アクチン結合蛋白であるカルデスモン遺伝子が種々のレベルで発現していた。その発現が平滑筋に特異的ではない中性 カルポニン遺伝子は全ての細胞株で発現していた。一方、平滑筋に特異的な塩基性 カルポニンの発現はHuO9とHOSでは平滑筋細胞と同程度の高い発現を示したのに対しOSTでは発現が認められなかった。塩基性 カルポニン遺伝子が高発現を示す骨肉腫細胞では、他の平滑筋マーカーであるSM22αとαSMA遺伝子も発現していた (Fig.10 (a))。蛋白レベルでは、Fig.10 (b)に示すように平滑筋で発現しているものと同じ分子量の蛋白の発現が認められた。化学発癌剤 (MNNG)でHOS 細胞を処理すると、より悪性度の強い細胞株であるMNNG-HOSが得られる[26]。HOSでは塩基性 カルポニンの発現が認められたのに対し、MNNG-HOSではその発現が消失していることから、骨肉腫細胞の悪性度と塩基性 カルポニンの発現との関連が推測された。

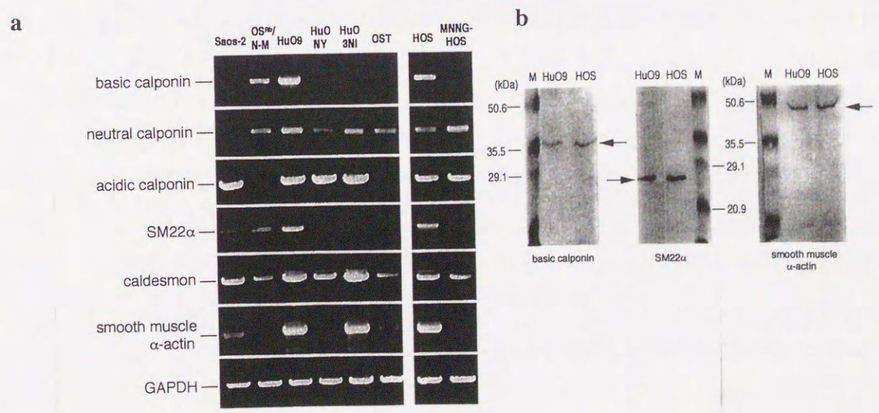


Fig. 10　Expression of smooth muscle specific genes in human osteosarcoma ccell lines. (**a**) Detection of basic, neutral and acidic calponins, SM22α, caldesmon and smooth muscle α-actin expression by RT-PCR analysis in human osteosarcoma cell lines. A major caldesmon PCR product was 744-bp in size, indicating that mRNA expressed in the osteosarcoma cells was for a low molecular weight isoform. (**b**) Detection of basic calponin, SM22α and smooth muscle α-actin gene expression by immunoblot analysis in HuO9 and HOS human osteosarcoma cell lines. Cells cultured on a 10-cm dish (70-80% confluency) in DMEM containing 10% FCS were washed with PBS, dissolved by scraping with a Teflon policeman in 300-400 μl of Laemmli's sample buffer containing 8M urea, 10μg/ml leupeptin and 0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and boiled for 2min. Samples containing equal amounts of proteins were loaded on 12.5% SDS-polyacrylamide gels. The quantitation of proteins on gels was carried out by Ultroscan XL lazer densitometry. Lane M; Prestained SDS-PAGE Standards; BSA (50,600), Ovalbumin (35,500), Carbonic anhydrase (29,100) and Soybean trypsin inhibitor (20,900).

第三節　骨肉腫の病態との関連

1)　骨肉腫

骨肉腫腫瘍組織での平滑筋特異遺伝子の発現を、Table 1 に示したそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いたRT-PCR法および特異抗体を用いた免疫組織化学法を用いて検討した。骨肉腫生検材料から得た腫瘍組織 においても、カルポニンの 3つのアイソフォームとSM22αおよびαSMAの平滑筋特異遺伝子および非筋型カルデスモン遺伝子が種々のレベルで発現していた(Table 2)。塩基性 カルポニンは骨肉腫腫瘍組織 17 例中、10例 で発現を認めた。一方、中性カルポニンは全ての腫瘍組織 で発現を認め、酸性カルポニン、SM22α、カルデスモン、αSMAはそれぞれ17 例中 14、14、15、13 例で発現していた。塩基性 カルポニン遺伝子の発現を強 陽性 (+++)、中等度陽性 (++)、弱陽性 (+)、陰性 (-) の 4 段階に分けて、 Fig.11 (a) に、典型的な 4 症例について各遺伝子の mRNA 発現を示した。次に、塩基性カルポニンの mRNA 発現が、強 陽性、弱陽性、陰性の症例について、蛋白レベルでの発現を、塩基性 カルポニンに特異的なモノクローナル抗体を用いて検討した。Fig.11 (b) に示すように、塩基性 カルポニンのmRNA 発現と蛋白レベルでの発現はよく相関し、カルポニン蛋白は 腫瘍細胞の細胞質に局在していた。

塩基性 カルポニンやSM22αの mRNA 発現と各症例の年齢、性別、腫瘍の組織型、肺への転移の有無、予後について比較した (Table 2)。両遺伝子の発現と年齢、性別、腫瘍の組織型との相関は明らかではなかったが、塩基性 カルポニン遺伝子を発現している症例 10 例中死亡例は 2 例で、同遺伝子を発現していない 7 例では、 5 例が死亡例であった。また、死亡例には全例肺転移が認められた。

Table 2

SUMMARY OF EXPRESSION OF CALPONINS, SM22α, CALDESMON AND SMOOTH MUSCLE α-ACTIN

case	age	sex	location	histology	metastasis (mo.)	prognosis (mo.)	calponin basic	calponin neutral	calponin acidic	SM22α	caldesmon	α-actin
1	59	M	humerus	osteoblastic	no	alive (28)	+++	+++	+++	+	++	-
2	14	M	femur	osteoblastic	no	alive (25)	++	+++	++	++	++	+
3	18	M	fibula	osteoblastic	no	alive (47)	++	+	+	+	+	-
4	16	F	tibia	chondroblastic	no	alive (25)	++	+	+	+	++	++
5	18	M	ilium	chondroblastic	yes (28)	dead (38)	++	+++	++	+++	+++	++
6	36	M	femur	osteoblastic	no	alive (78)	+	++	+++	++	+++	++
7	22	M	femur	fibroblastic	no	alive (14)	+	++	++	++	+++	++
8	24	M	tibia	osteoblastic	no	alive (52)	+	+	+++	++	++	++
9	69	M	forearm	fibroblastic	yes (47)	dead (54)	+	++	+	+	+	++
10	13	M	femur	telangiectatic	no	alive (8)	+	+++	+	+	+	++
11	15	M	tibia	osteoblastic	yes (25)	dead (40)	-	+	+	-	-	-
12	13	M	femur	chondroblastic	yes (16)	dead (30)	-	+	+++	+	+++	+++
13	12	F	tibia	osteoblastic	yes (2)	dead (14)	-	++	+	++	++	++
14	14	M	tibia	osteoblastic	yes (16)	dead (23)	-	++	+	+	+++	++
15	16	F	femur	osteoblastic	no	alive (47)	-	+	-	-	+	+
16	12	M	femur	osteoblastic	yes (20)	dead (27)	-	+	-	+	++	+
17	14	F	humerus	osteoblastic	no	alive (36)	-	++	-	-	-	-

M, male; F, female. mo., months. -, no expression detectable; +, expressed at low levels; ++, expressed at intermediate levels; +++, expressed at high levels.

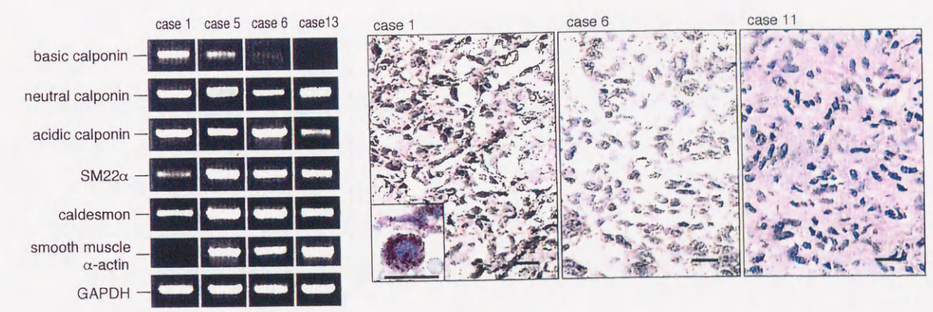


Fig. 11　Representative osteosarcoma cases with various levels of basic calponin expression. (**a**) Detection of basic, neutral and acidic calponins, SM22α, caldesmon and smooth muscle α-actin expression by RT-PCR analysis in the representative tumor samples of human osteosarcomas listed in Table 2. PCR products were graded according to the basic calponin expression from +++ (case 1), ++ (case 5), + (case 6) and - (case 13). The caldesmon PCR product was 744-bp in size. (**b**) Immunostaining of basic calponin in representative human osteosarcomas categorized in the group of patients with high (case 1) and low (case 6) levels of mRNA expression (see Table 2 and Fig.11 (**a**)). Calponin immunoreactivity was present in the cytoplasm of tumor cells. Scale bar, 20 μm.

この17例の症例を最長6年半経過観察し、塩基性カルポニン陽性例と陰性例とに分けてKaplan-Meier法で解析した。無肺転移生存曲線をFig.12に示したが、塩基性カルポニン陽性例は陰性例に比較して有意に生存率が高いことが明らかになった。一方、SM22α遺伝子の発現と予後との関係は明らかではなかった。

最近、塩基性カルポニンのN末端側にある約80アミノ酸残基からなるCH-domainがIQGAP1やVav等Rhoのシグナル伝達分子にも存在することが明らかにされた[27]。Vavは、CH-domainが欠失すると、発癌活性をもつことが報告されている[28]。

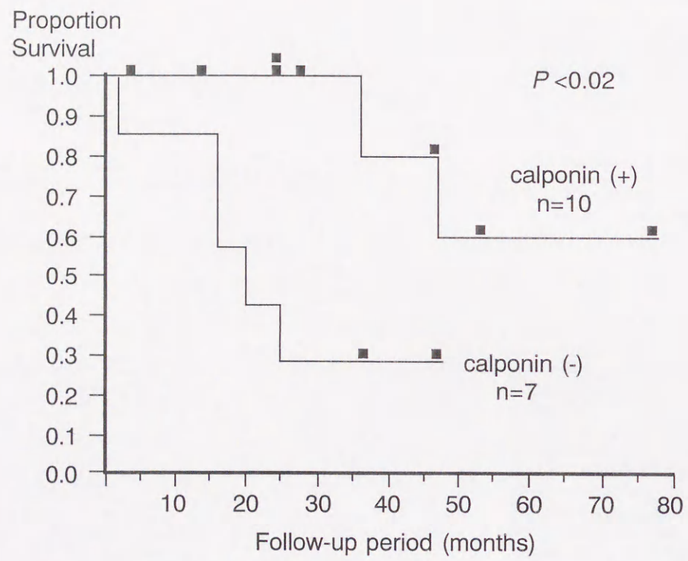


Fig. 12 Continuously disease-free survival curve according to basic calponin expression in 17 patients with osteosarcoma. The basic calponin-positive group had a more favorable prognosis than the basic calponin-negative group (p<0.02). Squares indicate survivors.

第四節　考察

平滑筋特異的な分化マーカーとされてきた塩基性カルポニンとSM22α、カルデスモン、αSMA遺伝子が骨肉腫細胞株と骨肉腫組織で発現することをはじめて明らかにした。さらに、平滑筋特異的な分化マーカーの骨肉腫での発現と骨肉腫患者の予後との相関を検討し、塩基性カルポニン遺伝子を発現している骨肉腫患者では、生存率が高いことを明らかにした。

創傷治癒の際や、心臓や骨格筋など横紋筋の発生過程で多分化能をもつ間葉系細胞に平滑筋特異的遺伝子が一過性に発現することが知られている[22, 29]。また、線維芽細胞を癌細胞へとトランスフオーメーションするとαSMAのmRNA発現と蛋白合成が減少することが報告されている[30]。しかし、このような平滑筋マーカーの発現変化の意義は不明である。骨芽細胞の前駆細胞である多能性間葉系細胞は、筋肉細胞、軟骨細胞、脂肪細胞にも分化する能力がある[31]。一方、骨芽細胞への分化を誘導する因子として知られているBMPは、筋芽細胞を骨芽細胞へと分化させる[30]。さらに最近、培養神経堤細胞へBMPを添加すると、神経堤細胞が塩基性カルポニン遺伝子およびαSMA遺伝子を発現する平滑筋様細胞へと分化することが報告された[24]。これらの知見は、骨芽細胞と平滑筋細胞が細胞系列の上で関係していることを示唆している。このことは、ヒトの動脈硬化病変やバルーン損傷後の動脈の脱分化した平滑筋細胞で、骨細胞に発現する遺伝子であるosteopontin, osteonectin, matrix GLA proteinの発現が認められること[4, 32, 33]など、これまで解釈が困難であった観察結果を説明する有力な手掛かりを与えるものと思われる。

塩基性カルポニン遺伝子が発現している骨肉腫患者10例中の内8例で転移が認められなかったこと、また、HOS細胞からMNNNG-HOS細胞への悪性変換に伴って、塩基性カルポニン遺伝子の発現が消失することなどから、カルポニン遺伝子に腫瘍細胞の転移能や腫瘍形性能を抑制する作用があることが推測される。また、抗腫瘍作用には、塩基性カルポニン遺伝子のN-末端領域にあるVav癌遺伝子の発癌抑制ドメインが関係していることも考えられる。あるいは、アクチン・ミオシン相互作用に対するカルポニンの抑制効果の消失によって、腫瘍細胞の運動能や増殖能が亢進するメカニズムが考えられる。高橋らは、塩基性カルポニン遺伝子のトランスジェニックラットを作製し、バルーン損傷後の動脈での平滑筋細胞の増殖が塩基性カルポニンの過剰発現で抑制できることを明らかにしている[34]。しかし、カルポニン遺伝子の発現低下が*in vivo*での細胞機能にどのような影響を与えるかは明らかではない。

第三章　カルポニン遺伝子欠失マウスの作成とその解析

第一節　ターゲッテングベクターの構築とマウスカルポニン遺伝子の発現

1) ターゲッテングベクターの構築

塩基性カルポニン遺伝子のアクチン結合領域をコードする exon 5～exon 7 にネオマイシン耐性遺伝子 (pMC1neoPGKgpt)を挿入し、ジフテリア毒素遺伝子をネガテイブセレクション用に結合したターゲッティングベクターを作成した。129SV/Jマウス由来の胎児幹 (ES) 細胞にエレクトロポレーション法で導入し、相同組み換えによってカルポニン遺伝子のホモ型欠失マウスを作成した。ホモ型欠失マウスと野性型マウスの tail ならびにES 細胞 よりDNAを抽出し、 *Hind* III で消化後、Fig.13 (a) に示したプローブで、サザンブロットを行なった。Fig.13 (b) に示すように野性型の塩基性カルポニン遺伝子では13.6kb、相同組み換えがおこった変異遺伝子では11.6kbのバンドが検出された。ヘテロ型欠失マウスのかけ合わせにより得たホモ型欠失マウスには致死性はなく、外観は野性型マウスとの間に差異を認めなかった。

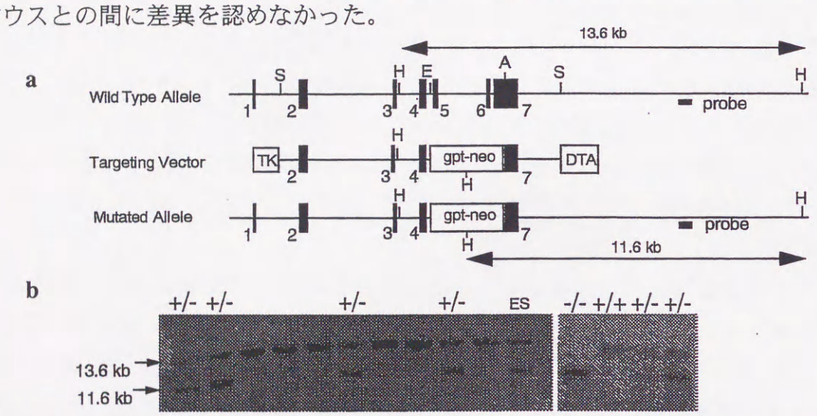


Fig. 13 Targeting of the basic calponin gene. (**a**) Structure of the wild-type allele, gene-targeting vector and mutated allele. Predicted lengths of *Hind* III restriction fragments for genotyping are shown. A, *Apa* I; E, *EcoR* V; H, *Hind* III; S, *Sma* I. (**b**) Southern blot analysis of DNA prepared from an ES clone, and F1 (left panel) and F2 (right panel) mice, demonstrating wild-type allele (+/+), heterozygous (+/-) and homozygous (-/-) mutation. Genomic DNA isolated from tails of mice was digested with *Hind* III and hybridized with the *Eco* T22I-digested fragment as a probe shown in (**a**). Bands correspond to wild-type (13.6 kb) and mutated (11.6 kb) genes.

2) マウス骨組織および骨芽細胞系細胞におけるカルポニン遺伝子の発現

塩基性カルポニン遺伝子の発現は、平滑筋への分化を特徴づけるマーカーである[5]。一方、前章で塩基性カルポニンがヒトの骨肉腫や骨芽細胞系細胞にも発現することを明らかにした。そこで、マウス骨組織および骨芽細胞におけるカルポニン遺伝子の発現をRT-PCR法およびイムノブロット法で検討した。Fig.14 (a)の上段は、野性型マウスおよびホモ型

欠失マウスの頭蓋冠骨組織における塩基性カルポニン遺伝子mRNAの経時的発現パターンを示す。ホモ型欠失マウスではmRNAの発現は認められない。野性型マウスでは、塩基性カルポニンの発現は胎仔期に最も強く、生後徐々に低下し、骨成長の旺盛な4 週前後にもう一つの発現のピークを認めた。10週齢以後の骨組織では発現を認めなかった。このことから塩基性カルポニン遺伝子は、未分化な骨芽細胞に発現していると考えられた。マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞株である MC3T3-E1細胞では、未分化な増殖期にのみ塩基性カルポニン遺伝子の発現を認め、分化した基質合成期には発現を認めなかった(Fig.14 (c))。次に野性型マウスの頭蓋冠からディスパーゼとコラゲナーゼを用いた段階的酵素処理法を用いて初代培養骨芽細胞を分離し、カルポニンに特異的なポリクローナル抗体を用いてイムノブロットを行なった。骨芽細胞に発現している塩基性カルポニン蛋白は平滑筋に発現しているものと同じ分子量であることが確かめられた (Fig.14 (b))。また、肋骨骨折モデルを用いて、骨折治癒過程における塩基性カルポニン遺伝子の発現をホモ型欠失マウスと野性型マウスで比較した。塩基性カルポニン遺伝子の発現は骨折後 4 日目からはじまり、7-10 日で最も強く骨折後 20 日目には消失していた (Fig.14 (d))。

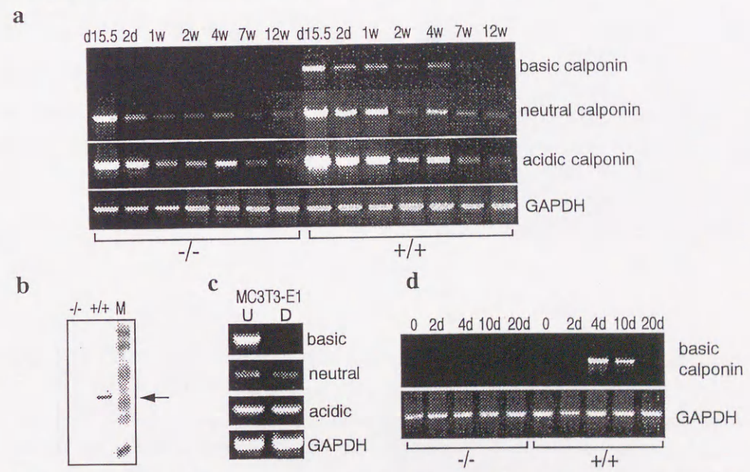
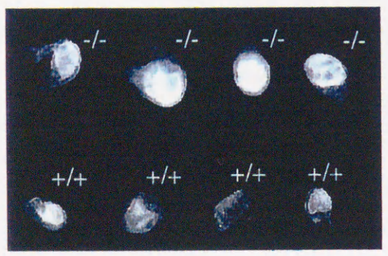


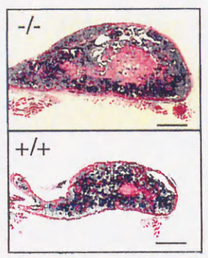
Fig. 14 (**a**) RT-PCR analysis of basic calponin expression at the embryonic stage of 15.5 dpc, 2 days after birth, at the age of 1, 2, 4, 7 and 12 weeks of mutated (-/-) and wild-type (+/+) mice. GAPDH. (**b**) Immunoblot analysis of basic calponin expression. Primary cultured osteoprogenitor cells were prepared from calvaria of mutated (-/-) and wild-type (+/+) mice at 2 days after birth. They were cultured on a 10-cm dish (70-80% confluency) in DMEM containing 10% FCS. The cells were washed with PBS, dissolved by scraping with a Teflon policeman in 300-400 μl of Laemmli's sample buffer containing 8M urea, 10 μg/ml leupeptin and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and boiled for 2 min. Samples containing equal amounts of proteins were loaded on 12.5% SDS-polyacrylamide gels. Lane M: prestained SDS-PAGE standards; phosphorylase B (103,000), BSA (77,000), ovalbumin (48,000), carbonic anhydrase (34,200), soybean trypsin inhibitor (28,400) and lysozyme (20,500). (**c**) RT-PCR analysis of basic, neutral and acidic calponin expression in MC3T3-E1, a clonal mouse osteoblast cell line. The cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. U, undifferentiated subconfluent culture; D, differentiated culture at 7 days post-confluence. (**d**) RT-PCR analysis revealed that healing bone tissues during fracture repair express the basic calponin gene transiently in wild-type (+/+) mice, but not in mutated (-/-) mice.

第二節　骨形成因子 に対する応答性の亢進

1) カルポニン遺伝子ホモ型欠失マウスにおける異所性骨形成の亢進

骨形成因子･BMPは、未分化な骨芽細胞や間葉系細胞に作用して、骨芽細胞への分化を促進することによって骨形成を誘導する[35]。塩基性カルポニン遺伝子が未分化な骨芽細胞に発現することから (Fig.14)、骨形成に対するカルポニン遺伝子の役割を明らかにする目的で、ヒト組み換え体 BMP-2 (rhBMP-2) (5 μ g/ペレット)をペプシン消化アテロコラーゲン (2.4mg/ペレット)を担体として含浸させた後、凍結乾燥し、野性型マウスおよびホモ型欠失マウスの背部筋膜下に移植した。ホモ型欠失マウスにおいて、正常骨髄を有するより大きな異所骨が形成された(Fig. 15 (a) (b))。実際ホモ型欠失マウスのカルシウム含量は有意に高かった(Fig. 15 (c))。





c

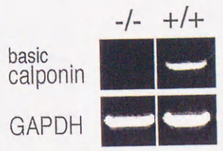
	Calcium content (mg/pellet)
-/-	7.25±0.42 (n=8)**
+/+	4.08±0.30 (n=8)

**p <0.001

Fig. 15 Ectopic bone formation in vivo induced by BMP. (**a**) X-ray analysis of ectopic ossicles 3 weeks after implantation of BMP/atelocollagen pellets, each containg 5 mg of rhBMP-2, in mutated (-/-) and wild-type (+/+) mice. (**b**) Cross sections of ossicles. Calcified trabeculae and normal bone marrow can be seen in both mutated (-/-) and wild-type (+/+) mice. Scale bar, 1 mm. (**c**) Calcium content of each ossicles (mean±S.E., n=8).

2) カルポニン遺伝子を欠失する未分化間葉系細胞のBMPに対する応答性の亢進

カルポニン遺伝子ホモ型欠失マウスでは rhBMP-2 による異所性骨形成の亢進が認められることより、カルポニン遺伝子はBMPによる骨芽細胞への分化を抑制する可能性が示唆された。一方、骨格筋細胞へと分化し得る未分化な間葉系細胞が rhBMP-2に反応し骨芽細胞に分化することが報告され[36]、筋芽細胞と骨芽細胞の共通の前駆細胞であることが推測されている。そこで野生型マウスおよびホモ型欠失マウスの胎仔大腿筋よりトリプシン (0.08%) 処理により未分化な間葉系細胞を分離した。野性型マウス由来の細胞は、塩基性カルポニン遺伝子を発現している (Fig.16 (a))。 rhBMP-2 存在下で培養すると、ホモ型欠失マウス由来の細胞で有意に増殖が促進された (Fig.16 (b))。



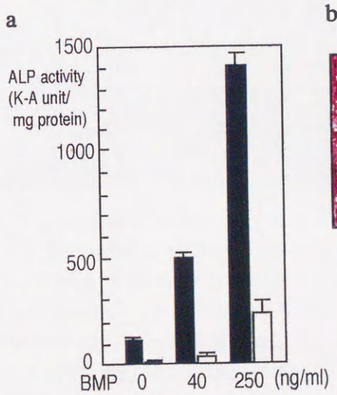
b

Condition	Cell number x10^{-4}	
	-/-	+/+
1% FCS (control)	25.0±0.9	22.0±1.2
10% FCS	83.3±2.1	75.5±4.6
BMP-2		
40 ng/ml	29.5±1.8	25.1±1.6
250 ng/ml	42.0±2.1**	29.5±1.2

**p <0.002 vs. wild-type (+/+) cells

Fig. 16 Effects of rhBMP-2 on proliferation of embryonic mesenchymal cells *in vitro*.. (**a**) RT-PCR analysis demonstrates that subconfluent cultures of embryonic mesenchymal cells isolated from thigh muscle of wild-type mice (+/+) express basic calponin mRNA but the cells from mutated mice (-/-) lack its expression. (**b**) Effect of rhBMP-2 on the growth of mutated (-/-) and wild-type (+/+) cells. The cells were initially plated at a density of 1x10^5 cells per well. The data, from a representative experiment, are expressed as the mean±S.E.of six separate wells for each condition.

続いて10% FCS存在下で培養した後、rhBMP-2 (40-500 ng/ml) を添加してさらに 48 時間培養し、骨芽細胞への分化能を比較検討した。骨芽細胞への分化のマーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)は rhBMP-2 によって用量依存性に誘導され、その活性はホモ型欠失マウス胎仔由来の未分化間葉系細胞で有意に高値であった (Fig.17 (a))。 Fig.17 (b) は rhBMP-2、500ng/ml 存在下での ALP 活性染色の結果を示している。カルポニン遺伝子ホモ型欠失マウス由来の未分化間葉系細胞では 92.4±1.7 %の細胞が骨芽細胞（ALP 陽性細胞）に分化したのに対し、野生型マウスでは、ALP 陽性細胞は32.8±4.4 %にすぎなかった (n=5, p<0.001)。



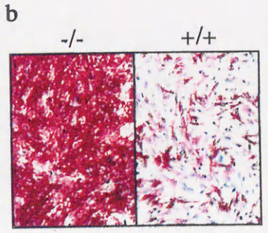


Fig. 17 Effects of rhBMP-2 on osteoblastic differentiation of mesenchymal cells *in vitro* monitored by the ALP activity. The cells obtained from mutated mice are shown by closed bars, and the cells from wild-type mice are shown by open bars (**a**). The data, from a representative experiment, are expressed as the mean±S.E. of three separate wells for each condition. For ALP-staining, cells were treated with 500 ng/ml of rhBMP-2 for 48 hr (**b**). Original magnification, x20.

胎生期における脊椎動物の骨格形成においては、最初に軟骨が形成され、軟骨組織は引き続いて骨組織に置換される。この過程で、未分化な間葉系細胞の集簇からなる、いわゆる「間充織の凝縮」を経て軟骨が形成される際や、骨膜性の骨化が開始される際に、BMPが重要な役割を演じている[37]。そこで、13.0、13.5、14.5 dpc胎児をアリザリンレッド（骨染色）とアルシアンブルー(軟骨染色)で二重染色 すると、 野性型に比べてホモ型欠失胎児で軟骨と骨がともに早く形成されることが明らかになった (Fig.18) 。

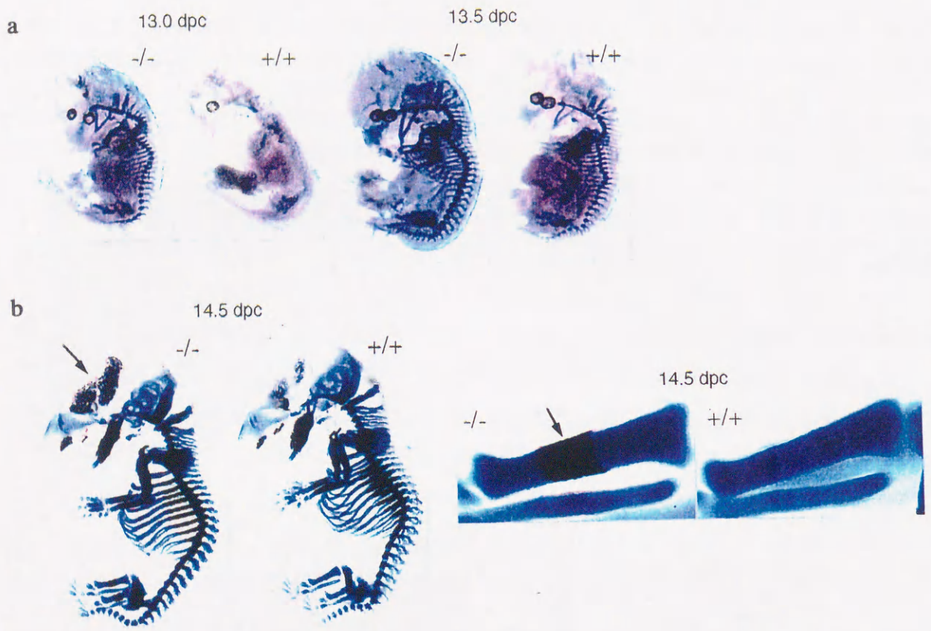


Fig. 18 The phenotype of embryonic skeletal system. The skeletons from 13.0, 13.5 and 14.5 dpc of mutated (-/-) and wild-type (+/+) embryos were double stained with Alizarin red and Alcian blue. Cartilage is stained blue and bone dark red. Arrows indicate ossification in the calvaria (**a**) and tibia (**b**) of the mutated embryo (-/-) at 14.5 dpc. Original magnification, x6.7 (**a**) and x64 (**b**).

Fig.19 (a),(c) は 12 週齢マウスの大腿骨の軟X線像と中央部横断面組織像である。ホモ型欠失マウスにおいて骨の横径成長の亢進を認めた。骨芽細胞機能のマーカーである血清 ALP 活性は、ホモ型欠失マウスで有意に高値を示し骨形成の亢進が示唆された (Fig.19 (b)) 。

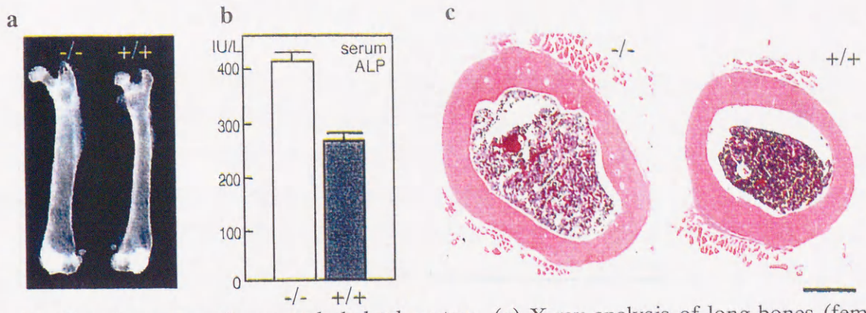


Fig. 19 The phenotype of postnatal skeletal system. (**a**) X-ray analysis of long bones (femur) of 12-week-old mutated (-/-) and wild-type (+/+) mice. (**b**) Serum ALP activity (IU/L) of 8- week-old mutated (-/-) and wild-type (+/+) mice. (**c**) Cross sections of femur of 5-week-old mutated (-/-) and wild-type (+/+) mice. Scale bar, 500 μm.

Fig. 20 は 5 週齢マウスの大腿骨の骨皮質と骨膜の拡大像である。ホモ型欠失マウスにおいて骨芽細胞の増殖が認められた。次に、マウスBMP-4 cDNAをプローブにして、*in situ* hybridization を行ったところ、ホモ型欠失マウスの骨膜骨芽細胞にBMP-4 mRNAの過剰発現を認めた。この所見は骨芽細胞機能が亢進していることを示している。

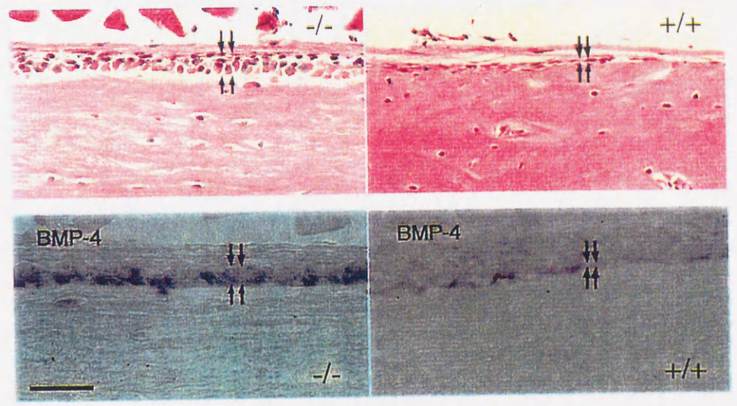


Fig. 20 Hyperplasia of activated periosteal osteoblasts in mutated (-/-) mice as compaired with wild-type (+/+) mice. Histological analysis (upper panels) of cortical bones of femur of 5-week-old mutated (-/-) and wild-type (+/+) mice. Note increase in the number of activated periosteal osteoblasts in mutated mice (arrows). The serial sections were analysed by in situ hybridization using probes for BMP-4 mRNA (lower panel). Osteoblasts lining on the periosteum in mutated mice expressed of BMP-4 mRNA at high levels. Scale bar, 100 μm.

第三節　考察

塩基性カルポニン遺伝子の発現低下が、*in vivo* での細胞機能にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、塩基性カルポニン遺伝子のホモ型欠失マウスを作製した。ホモ型欠失マウスでは、骨膜骨芽細胞の増殖と活性化を伴う骨の横径成長の亢進、

胚発生過程での軟骨および骨形成の促進、骨折治癒過程での治癒促進が認められ、塩基性カルポニン遺伝子が　骨芽細胞の増殖や分化を抑制する機能をもつことが明らかになった。さらにBMPの背部筋膜下への移植でホモ型欠失マウスで異所性骨形成の亢進が認められることより、塩基性カルポニン遺伝子が　BMPによる骨芽細胞への分化を抑制する可能性が示唆された。一方、骨格筋由来の筋芽細胞株C2C12がrhBMP-2に反応し、骨芽細胞に分化することが報告され[36]、筋芽細胞が筋細胞と骨芽細胞の共通の前駆細胞であることが推測されている。そこで胎児大腿筋より未分化間葉系細胞を分離し、rhBMPを添加するとホモ型欠失マウスでは骨芽細胞への分化能が亢進した。このことより、塩基性カルポニン遺伝子がBMPによる未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化を抑制することを明らかにした。カルポニン遺伝子が欠失すると、この抑制作用がなくなるためにBMPによる骨芽細胞への分化が亢進し、結果として骨形成が亢進するものと考えられた(Fig.21)。一方、最近報告された骨芽細胞特異的なCbfa1遺伝子[38]の発現は、ホモ型欠失マウスと野生型の間に差は認められなかった。

BMPの細胞内シグナル伝達経路については、BMPがそのレセプターに結合すると、細胞内のシグナル伝達分子であるSmad蛋白がリン酸化され、BMPのシグナルを核内に伝達するという系が報告されているが[39]、Smad蛋白の機能を制御する機構は未だ解明されていない。今回の筆者の実験結果から、カルポニンがSmad経路などのBMPの細胞内シグナル伝達機構を抑制する可能性が示唆された。また、塩基性カルポニン遺伝子の発現を抑制するという遺伝子治療は、内在性BMPや組み換え体BMPに対する骨芽細胞の応答性を高めることが予想されるので、骨折の予防や骨折治癒の促進を可能にする新しい治療法として期待される。

一方、カルポニンホモ型欠失マウスにおいて、血管には明らかな動脈硬化病変は認められなかったが。この結果は、マウスが動脈硬化の発症に抵抗性を示すことに起因していると思われる。今後、ヒトによく似た動脈硬化のモデル動物であるLDL受容体欠失マウス[40]とカルポニン欠失マウスをかけ合わせることにより、動脈硬化の病態におけるカルポニン遺伝子の役割を明らかにできると思われる。

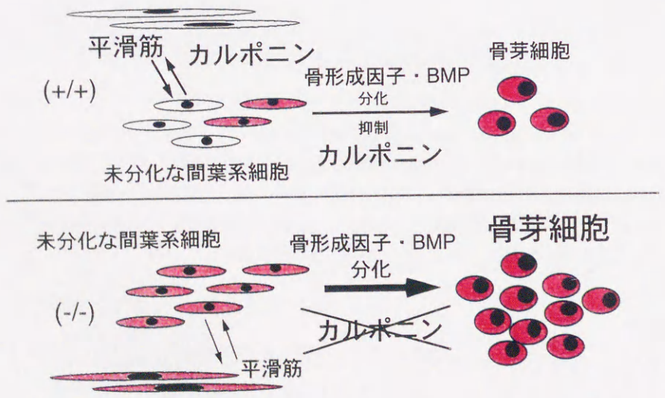


Fig. 21 Role of calponin is inhibition of osteoblastic diferrenciation induced by BMP.

総　括

1. 本研究において、ヒト塩基性カルポニン遺伝子とヒトSM22α遺伝子をはじめてクローニングし、両遺伝子プロモーターの転写活性がプロモーター領域のシトシンメチル化によって抑制されることを明らかにした。
2. これまで両遺伝子は、平滑筋への分化を特徴づけるマーカーとされてきた。しかし、本研究の実験結果から、未分化な骨芽細胞や骨肉腫細胞にも塩基性カルポニン遺伝子とSM22α遺伝子が発現していることが明らかになり、平滑筋細胞と骨芽細胞が、細胞系列の上で関係していることが示唆された。この結果は、(1) ヒトの動脈硬化病変には石灰化や軟骨および骨の形成が認められること、(2) 培養神経堤細胞へのBMPの添加により、神経堤細胞を塩基性カルポニン遺伝子およびα平滑筋アクチン遺伝子を発現する平滑筋様細胞へと分化誘導し得ることなど、これまで解釈が困難であった観察結果を説明する有力な手掛かりを与えると思われる。動脈硬化病変部の中膜平滑筋層では、両遺伝子の発現が低下し、平滑筋細胞の収縮型から合成型への脱分化が起こっていることが推測された。骨肉腫の病態においては、塩基性カルポニン遺伝子の発現低下と腫瘍の悪性度の指標である肺転移とが相関することを明らかにした。
3. 塩基性カルポニン遺伝子の発現低下が、*in vivo* での細胞機能にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、塩基性カルポニン遺伝子のホモ型欠失マウスを作製した。ホモ型欠失マウスでは、骨膜骨芽細胞の増殖と活性化を伴う骨の横径成長の亢進、胚発生過程での軟骨および骨形成の促進が認められ、塩基性カルポニン遺伝子が骨芽細胞の増殖や分化を抑制する機能をもつことが明らかになった。さらに *in vitro* の培養細胞を用いた実験によって、塩基性カルポニン遺伝子がBMPによる未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化を抑制することを明らかにした。カルポニン遺伝子が欠失すると、この抑制作用がなくなるためにBMPによる骨芽細胞への分化が亢進し、結果として骨形成が亢進するものと考えられた。
4. BMPのシグナル伝達経路については、BMPがそのレセプターに結合すると、細胞内のシグナル伝達分子であるSmad蛋白がリン酸化され、核内にシグナルを伝達するという系が考えられているが[39]、未だ不明な点が多い。カルポニンが細胞質内に存在するアクチン結合蛋白であることから、本研究は、BMPの細胞内シグナル伝達機構の解明に役立つものと確信している。また、塩基性カルポニン遺伝子の発現を抑制するという遺伝子治療は、内在性BMPや組み換え体BMPに対する骨芽細胞の応答性を高めることが予想されるので、骨折の予防や骨折治癒の促進を可能にする新しい治療法として期待される。

結　論

1. 平滑筋特異遺伝子であるヒト塩基性カルポニン遺伝子とヒトSM22α 遺伝子をはじめてクローニングし、両遺伝子の発現がプロモーター領域のシトシンメチル化により抑制されることを明らかにした。

2. 動脈硬化病変部の中膜平滑筋層ではカルポニンとSM22α 遺伝子の発現が低下し、平滑筋細胞の収縮型から合成型への脱分化が起こっていることが推測された。また、両遺伝子が、未分化な骨芽細胞や骨肉腫細胞にも発現していることを見い出した。特に塩基性カルポニン遺伝子の発現低下が骨肉腫の悪性度の指標になることを明らかにした。

3. 骨芽細胞における塩基性カルポニン遺伝子の機能を検討するために、同遺伝子のホモ型欠失マウスを作成した。骨膜骨芽細胞の増殖と活性化を伴う骨の横径成長の亢進、胚発生過程での軟骨および骨形成の促進が認められ、塩基性カルポニン遺伝子が 骨芽細胞の増殖や未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化を抑制する機能をもつことを発見した。

4. 本研究の成果は、骨形成を促進する新しい治療法の開発および動脈硬化における血管の骨化や石灰化の病態解明に寄与するものと思われる。

謝辞

本論文の作成にあたり、終始御指導ならびにご鞭撻を賜りました、大阪大学薬学部　西原　力教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終止御指導、御助言ならびに御協力を戴きました、大阪大学大学院薬学研究科助教授 ・大阪府立成人病センター研究所主任研究員　高橋克仁先生 に心から深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、御助言と御協力を戴きました、大阪大学医学部整形外科　吉川秀樹講師ならびに大阪大学薬学部　今川正良助教授に心から感謝の意を表すと共に、討論に参加して戴きました大阪大学薬学部薬学研究科生命情報環境科学専攻微生物動態学の皆様に感謝致します。

本研究の最初の段階で御助言と御協力を戴きました関西大学工学部生物工学科徳山　泰教授ならびに長谷川喜衛助教授ならびに大学院生の皆様に深く感謝致します。

研究上の有益な御助言を戴きました、大阪大学大学院薬学　研究科教授・大阪府立成人病センタ-第1内科部長　淡田修久先生、大阪府立成人病センター研究所所長　竜田正晴先生ならびに大阪府立成人病センター総長豊島久真男先生に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり御助言と御協力を戴きました、大阪府立成人病センター柴田宣彦　元研究所第 1 部部長ならびに管谷陽一先生をはじめ大阪府立成人病センター研究所 第 5 部 循環生化学研究室の皆様に深く感謝致します。

実験の部

1. 第一章の実験

塩基性カルポニン cDNAとゲノムDNAのクローニング

ヒト塩基性 カルポニン全長 cDNA のクローンをヒト大動脈λZAP II cDNA ライブラリー (Stratagene, La Jolla, U.S.A.) から単離した 、^{32}Pでラベルしたニワトリ 砂嚢カルポニン β アイソフォームcDNA[9] の*Sac*I-*Sma*I 断片を プローブとして、 4 x10^5個をスクリーニングした。cDNAの塩基配列は、 dideoxy 法 [42] にて、Applied Biosystem Model 373A DNA シークエンサー を用いて決定し、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した (Accession No. D17408)。 ヒト塩基性カルポニン遺伝子は、白血球由来のλDASH ゲノム ライブラリー(Stratagene)より、^{32}Pで標識した全長 c DNA(1536bp) をプローブとして、 5 x10^5個のプラークからスクリーニングした。 プレハイブリダイゼーション とハイブリ ダイゼーションは、 5x SSC、 5x Denhardt's液 、 1% (w/v)SDS よりなる溶液中で 65 °C 、 12 時間行った[41]。ナイロンメンブレン (Hybond-N+; Amersham, Little Chalfont, U.K.)は、 0.1xSSC 、1% (w/v)SDSの溶液中で 68 °C、 1 時間 2 回洗浄後、Fuji RX X線フィルムに曝 露した。サイズの違う2 種類のクローン が単離されたが、その塩基配列はお互いにオー バーラップ していた。そのインサートDNAを pBluescript プラスミド ベクター(Stratagene) にサブクローニングし、 制限酵素地図を作製し、全塩基 配列を決定した。 5x SSC; (1 x SSC=15 mMクエン酸ナトリウム 緩衝液(pH7.0), 0.15 M NaCl) 5x Denhardt's 液; (1 xDenhert=0.1% (w/v)BSA (FractionV), 0.1% (w/v)Ficoll, 0.1% (w/v) polyvinyl pyrolidone)

プライマーエクステンション法による塩基性カルポニン遺伝子の転写開始点の決定

プライマー エクステンション法 [43] を用いて、塩基性カルポニン遺伝子の主要な転 写開始点を決定した。total RNAはヒト成人 大動脈の平滑筋 組織よりISOGEN RNA抽出 キット(ニッポンジーン,富山)を用いて調製した。42塩基のオリゴヌクレオチドプライマー (-5'-AGAGGCAGCGGCTGAAGTTCCGTCTGCACACTCTTCCCTCCT-3')を、エキソン 1の アンチセンス配列 (+53～+12)をもとにして合成し、5'末端を[γ^{32}P] dATPとT4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly, U.S.A.)で標識した。 20 μgのtotal RNAよりfirst-strand cDNA合成 キット(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いて、10 pmol の^{32}P 標識プライマー存在下で37℃ 、60分間の逆転写 (RT) 反応 を行った。その反 応 生成物 をフェノール/クロロホルムで抽出した。エタノール沈殿した後、8M Urea を 含有 する6% (w/v)アクリルアミド ゲルで電気泳動し、シークエンスした。

ヒトSM22α c DNAのクローニング

ニワトリ 砂嚢平滑筋 SM22α のAsp-141 から Met-152 までのアミノ酸配列 [11]から、アンチセンスオリゴヌクレオチド; 5'-CAT GAA CCA(G/A)TT GGG (G/A)TC GCC (G/A) TG(G/A)TA (G/A)TG GCC (G/A)TC-3'を合成し、5'末端を^{32}Pで標識した。ヒト大動脈λgt11cDNAライブラリー(Clontech Laboratories, Palo Alto, U.S.A.)をスクリーニングし、ヒトSM22α の全長cDNAを単離した。 プレハイブリダイゼーションとハイブリダイゼーションは25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5), 0.1% (w/v)SDS, 1xDenhart, 6 x SSC, 100μg/ml 子ウシ 胸腺DNAを含む溶液 中で37 ℃、16時間行った。 最後 に 0.5 x SSCと 0.1% (w/v) SDS の溶液中で38 ℃、 1 時間洗浄した。8 x 10^5 個のプラークをスクリーニングし18個の陽性クローンが得られた。その各々を pBluescript SK(-) ベクター(Stratagene) にサブクローニングし、その塩基配列を決定した。

SM22α 蛋白をグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST) 蛋白との融合蛋白として大腸菌に発現させた。ヒトSM22α全長 cDNAを*Msc*I/*Pst*Iで二重消化したフラグメントを pBluescript ベクターの*Sma*I/*Pst*I 部位にサブクローニングした (pBl-M/PSM22)。次に *Pst*I/*Eco*RVで二重消化したSM22αcDNAフラグメント(+554～+1062)をpBl-M/PSM22にライゲーションした。その後、*BamH*I/*Msc*I (+51～+757を含む)フラグメントをカットし、原核生物発現ベクター pGEX 3X (Pharmacia Biotech)にサブクローニングした。グルタチオン S-トランスフェラーゼ遺伝子 に対するSM22α cDNAの方向性は、シークエンスによって確認した。 DH5α 大腸菌をトランスフォームし、培養した。0.1mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosideを添加してさらに4 時間培養し、組換え体SM22αタンパクを発現させた。 ヒトSM22α ポリペプチドは Factor Xa (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)にて消化し、 グルタチオンセファロース4B-アフィニテイーカラム (Pharmacia Biotech)で精製した。 抗ニワトリ砂嚢 SM22α ポリクローナル 抗体を用いてとイムノブロット分析[44]を行い、組換え体ヒトSM22α タンパクとの交差反応性を確認した。

ヒト SM22α 遺伝子のゲノムクローニング

ヒト白血球の EMBL3ゲノムライブラリー (Japanese Cancer Resources Bank; JCRB, 東京) を ヒトSM22α 全長 cDNA (1063bp)をプローブとして スクリーニングした。 プローブ は DIG-High- Prime 標識キット (Boehringer Mannheim)を用いてジゴキシゲニン (DIG)で標識した。プレハイブリダイゼーション とハイブリアイゼーションは 250 mM ナトリウム-リン酸緩衝液 (pH 7.2) , 20% (w/v)SDS, 1 mM EDTA, 0.5% (w/v)ブロッキング 試薬 (Boehringer Mannheim)を含む溶液中で 60℃、12 時間行った。メンブレンは 0.1xSSC , 1% (w/v)SDSの溶液中で 68 ℃ 、 1 時間 2 回洗浄した後、Fuji RX X線フィルムに曝露した。 5.1 x10^5個のプラークをスクリーニングし、サイズが異なる2 種類の 陽性クローンを得た。それぞれのクローンを単離し、pUC18ベクター (Clontech Laboratories)にサブクローニングした後、 制限酵素地図を作製し、全塩基配列を決定した。

オリゴ-キャッピング法 [13]による転写開始点の 決定

初代培養ヒト大動脈平滑筋細胞 (クローン HS4001; クラボー、大阪) と ヒト成人 大動脈 平滑筋 組織より、Quick Prep mRNA精製 キット(Pharmacia Biotech)を用いてポリA-RNA (5 μg)を精製した。Bacterial alkaline phosphatase (BAP)(宝酒造、大津)処理に引き続き Tobacco acid pyrophosphatase (Sigma Chemicals, St. Louis, U.S.A.)で処理することにより、真核生物のmRNAに特有の5'末端キャップ構造をはずして一リン酸基とした。続いてmRNAの5'末端を、RNAオリゴヌクレオチド (5'-ACC GGU UGUUGC AGC GGA GG -3')を用いてオリゴキャッピングを行った。ヒトSM22α cDNA (+423～+405)のアンチセンス 配列より、19塩基のオリゴヌクレオチドプライマー (5'-CTG CTG CCA TGT CTT TGC C-3') を 合成した。 RT 反応はFirst-Strand-cDNA合成 キット(Pharmacia Biotech)の反応液を用い, 40 pmol のアンチセンス プライマー存在下で 行った。37℃、 60 分間反応させた後 , ヒトSM22α cDNA (+240～+222)の塩基配列を基にして合成した forward (5'-ACC GGT TGT TGC AGCGGA GG-3')とreverse (5'-GCT TGC TCA GAA TCACGC C-3')のプライマーそれぞれ25 pmoleと2.5UのTaqDNAポリメラーゼ (Pharmacia Biotech)を 加えて、PCR反応 を変性; 94°C, 40 秒,アニーリング; 58°C,30 秒, 重合; 72°C, 1 分30秒で30サイクルの条件で行った。 PCR産物を1% (w/v)アガロースゲル電気泳動で確認した後、pBluescript ベクターにサブクローニングし塩基配列を決定した。

mRNAの抽出・精製とノーザンブロット分析 [46]

total RNA は培養細胞が60~70%コンフルエントに達した時点で、Stallcup とWashington らの方法 [45] に従って抽出した。また、組織からのRNA抽出はISOGEN RNA抽出 キット (ニッポンジーン)を用いて行なった。 1% (w/v)アガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロースメンブレンにトランスファーし、^{32}P標識のcDNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行なった。プレハイブリダイゼーション およびハイブリダイゼーションは 25 mM ナトリウムリン酸 緩衝液 (pH 6.5), 50% (v/v)ホルムアミド , 0.2% SDS (w/v), 2 x Denhart, 6 x SSC , 100μg/ml 子ウシ 胸腺 DNAを含む溶液中 で43℃ で行った。最後 に 0.2 x SSC と0.1% (w/v) SDSで 50℃ 、 1 時間洗浄した。

抗体

ニワトリ 砂嚢 SM22α タンパク質 に対するポリクローナル抗体をウサギで作製し、抗原アフィニティーカラムを用いて精製した。SM22α抗体は、 塩基性カルポニンとは交差反応しないことをイムノブロット法 [47]で確認した 。ヒト塩基性カルポニンに対するモノクローナル抗体 (クローンNo.hCP)とヒトαSMAに対するモノクローナル抗体

(クローンNo.1A4)はSigma chemicals 社から購入した。抗体の特異性 はニワトリ 砂嚢 とヒト大動脈平滑筋の粗抽出液を用いてイムノブロット法[47]で検討した。

免疫蛍光 抗体法

ヒト冠動脈組織はバルーン血管形成術 (PTCA) 後 6日目の剖検例より得た。 5μmの凍結切片を作製し、-20°C のアセトンで 7 分間固定した 後、PBS で15 分間洗浄した。切片を 1% (v/v)ヤギ 血清/PBS で 1 時間 、室温で処理した。 PBS洗浄後2%(w/v)BSA/PBS で希釈した一次抗体で 4°C、一晩反応させた。0.005% (v/v) Tween 20/PBSにて 5 回 洗浄後、ローダミン標識のヤギ 抗ウサギもしくは抗マウス IgG (TAGO Immunologicals, Camarillo, U.S.A.)を含む 2%(w/v) BSA/PBS で1 時間、 室温で反応させた。 0.005% (v/v)Tween 20/PBSで洗浄後、 蛍光 顕微鏡 (Vanox-S; オリンパス、東京)で検鏡した。

ルシフェラーゼレポータープラスミドの 作製と シトシン ＤＮＡメチル化反応

塩基性カルポニン遺伝子の 5'側 上流の-284から+137を含む*Kpn*I/*Hind*III 断片(421bp)をpGL2-basic ベクター(Promega, Madison, U.S.A.)の*Kpn*Iと*Hind*III 部位にサブクローニングし、それを pGL2-421CNh1と命名した。pGL2-421CNh1を*Kpn*I/*Hind*IIIで二重消化した後、0.8% (w/v)アガロースゲル で電気泳動し、インサートとベクターをそれぞれ分けて、SUPREC™-01 (宝酒造)を用いて精製した。インサートを*Hpa*IIメチラーゼ (2U/1μgDNA) (New England Biolabs)を用いて、80 mM S-adenosyl methionine (New England Biolabs) 存在下で 1時間、 37°C でメチル化した。 *Hpa*II 部位のメチル化は*Hpa*II 消化に対するプロテクションで確認した。

SM22 α 遺伝子5'側 上流 -480 からエキソン 5までの 6.5kbの*Bam*HI/*Eco*RIフラグメントを*Bam*HI/*Eco*RIで二重消化した pUC18 ベクターに サブクローニングした。6.5kb SM22α フラグメントが挿入されたpUC18 ベクターの*Bam*HI 部位に*Xho*I リンカーを結合した。プロモーター領域の-26 から-480を含む*Xho*I/*Dra*I 断片は、 pGL2-basic ベクター(Promega)の*Xho*Iと*Hind*III 部位を平滑末端化して、サブクローニングした。それを pGL2-454SM22と命名した。pGL2-454SM22を、*Xho*I/*Xba*I で二重消化した後 、0.8% (w/v)アガロースゲルで電気泳動し、インサートとベクターをそれぞれSUPREC™-01 (宝酒造)を用いて精製した。インサートを*Hpa*IIメチラーゼ (2U/1μgDNA) (New England Biolabs)を用いて、80mM S-adenosyl methionine 存在下で 1 時間 、37°C でメチル化した。 *Hpa*II 部位のメチル化は*Hpa*II 消化に対するプロテクションで確認した。メチル化されたDNAフラグメント(2 μg)とメチル化していないフラグメント(2 μg)を pGL2-basic ルシフェラーゼ レポーター プラスミドの*Xho*I/*Xba*I 部位 (10 μg)に、37°C、5 時間 ライゲーションした。 ライゲーション反応が完全に行われたことを、アガロースゲル電気泳動で確認した。フェノール/クロロホルム 抽出した後、クロロホルム抽出し、エタノール 沈殿してプラスミドDNAを精製した。

細胞培養

PASMC培養細胞株は、ＳＤラット肺動脈に由来するラット平滑筋培養細胞株であり、複数 継代しても平滑筋としての性質を維持している[48]。初代培養のヒト大動脈平滑筋細胞 (HS4001)はクラボー (大阪)より 購入し、マウス骨格筋 筋芽細胞C2C12(CRL-1772) と BC3H1 (CRL-1443),マウス線維芽細胞株C3H/10T1/2 クローン 8 (CCL 226) とNIH3T3 (CRL-1658)はAmerican Type Culture Collection; ATCC (Rockville, U.S.A.)より購入した。

トランスフェクションアッセイ、ルシフェラーゼアッセイ、βガラクトシダーゼ アッセイ

PASMC細胞と C2C12 細胞を10% (v/v) FCSを 含むDMEM培地で培養し、トランスフェクション24 時間 前に3 x 10^4 細胞を直径 3cmのシャーレで培養した。 pGL2 -455SM22およびpGL2-421Cnh1の各ルシフェラーゼ発現ベクター10 μgの メチル化もしくはメチル化しないルシフェラーゼ レポータープラスミドを、インターナルコントロールとして3 μgのpSV-β-galactosidase コントロールベクター (Promega)と30 μgのDOTAP 試薬N- [1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate (Boehringer Mannheim)とともにトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後に細胞を100 μl の細胞溶解 剤 (Pica Gene Kit、東洋インキ、東京)で溶解した。12000xg、10 分間、 4°Cにて 遠心分離 後、上清のそれぞれ一定分量 (20 μl と30 μl)をルシフェラーゼ活性 (Pica Gene Kit)とガラクトシダーゼ活性測定に用いた 。ルシフェラーゼ 活性は、ルミネッセンスリーダーBLR-201(アロカ、 東京)を用いて測定した。β-ガラクトシダーゼ 活性 はβ-ガラクトシダーゼ 酵素 アッセイシステム (Promega)を用いて測定し、遺伝子導入効率を標準化した。上清30 μlを30 μl の2Xアッセイ 緩衝液 (200 mM ナトリウム リン酸緩衝液 (pH7.3), 2 mM $MgCl_2$, 100 mM β-メルカプトエタノール と 1.33μg/ml o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド)と96穴プレート上で混和し、37°C 1 時間反応させた。 90 μl の1 Mトリス 溶液を 添加して反応を停止させ、プレートリーダーMTP-120 (コロナ電気、 茨城)を用いて吸光度を測定した。実験は少なくとも 3 回繰り返し、再現性を確認した。ルシフェラーゼ活性 (light unit)は、細胞抽出物のβ-ガラクトシダーゼ 活性により補正した。 異なる細胞間のトランスフェクション効率 は、SV40エンハンサーを含むpSV2-luc 遺伝子プロモーターのルシフェラーゼ活性をもとにして比較検討した。データは補正後のルシフェラーゼ活性を平均値 (%)±標準誤差で表し、コントロール実験と比較した。

2. 第二章の実験

ヒト骨肉腫 培養細胞株と骨肉腫患者 生検材料

HOS (CRL-1543), MNNG-HOS (CRL-1547) は ATCCより、 HuO9 (JCRB0427), HuO-3N1 (JCRB0413) HuO-NY (JCRB0614) は、JCRB より、Saos-2 (RCB0428) , OST (RCB0454)は、RIKEN GENE BANK; RGB(筑波)より入手し、OS^{RB}/N-M は三重 大学の 河井和夫先生より供与を受けた。17 例の患者は、大阪 大学 医学部および 大阪府立 成人病センターにおいて診断治療がなされたEnnekingの分類でStageIIB[49]の原発性骨肉腫症例である。大きさ、局在, 組織学的 サブタイプと腫瘍の悪性度、治療法、追跡時間など 正確な 臨床 情報が得られている。患者はすべて、拡大局所切除術と術前、術後 化学療法による治療を受けている。今回の 実験に用いた腫瘍 組織は、診断時にインフォームドコンセプトを得て採取した生検材料である。標本は採取後直ちに-80 ℃で凍結保存した。total RNAは、培養細胞 (70~80% コンフルエント) ならびに骨肉腫 組織よりISOGEN RNA抽出キット(ニッポンジーン、東京)を用いて 抽出した。

RT-PCR

Moloney murine leukemia virus 由来の逆転写酵素を用いて、一本鎖cDNAを合成し、それを鋳型として特異的なプライマーを用いてPCRを行った。発現分布のコントロールとしてグリセルアルデヒド3-リン酸 デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を用いた。2μg のtotal RNAより、0.2 μg のランダムプライマー存在下で、Ready-To-Go You-Prime First-Strand ビーズ(Pharmacia Biotech)を用いて、37℃、60 分間反応させ、RT 反応を行った。forwardとreverseそれぞれ0.5 μM の プライマーと 、200 μMのdNTP混合液(各2.5 mM)と2.5 UのTaq DNA polymerase (Pharmacia Biotech) と 8 μl のRT反応 混合液を加え、滅菌水で容積を50 μl にした。PCR反応は、変性 ; 94℃, 40sec, アニーリング ; 60℃, 30 sec, 重合 ; 72℃, 1.5 min で30 サイクルの条件で行った。 forward とreverseの プライマーは、 Table I に示したシークエンスのものを用いた。カルデスモン遺伝子のプライマーは、低分子量と高分子量 アイソフォームを両方検出できるようにデザインした[50]。カルポニン、SM22α と カルデスモンの PCR生成物は、25-35 サイクルで、α-SMAとGAPDHは、20-30 サイクルの間で直線性が得られた。PCR反応は、それぞれのプライマーセットで逆転写酵素を含まないネガティブコントロールを作成した。1%(w/v)アガロース ゲル 電気泳動を行い PCR 生成物をUV 照射し、Eagle Eye II Still Video System (Stratagene)を用いて定量化した。異なるアガロースゲル間のシグナル 強度の違いは、分子量 マーカーを用いて補正した。 発現程度の判定は、二人の独立した 観察者によりブラインドで少なくとも2回反復し、 高発現、中等度発現、低レベルの発現、陰性 に分類し、それぞれ(+++), (++), (+)と(-)で表した。

抗体とイムノブロット法[44]

カルポニンモノクローナル抗体(クローン No. hCP) と αSMAモノクローナル抗体(クローン No. 1A4) は、 Sigma Chemicals 社より購入した。 hCPモノクローナル抗体の塩基性カルポニン アイソフォームに対する特異性 は、以前に Masudaらが報告した[47]。また、 SM22α タンパクに特異的 なポリクローナル抗体の作製は「第一章の実験」 の項で述べた。これらの抗体を用いてイムノブロット法を行った。12.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルの各レーンには、等量の蛋白をアプライした。蛋白量は、Ultroscan XL lazer densitometry (Pharmacia Biotech)を用いて標準化した。分子量マ-カーは SDS-PAGEスタンダード; BS A(50,600), Ovalbumin (35,500), Carbonic anhydrase (29,100), Soybean trypsin inhibitor (20,900) (Bio-Rad Laboratories)を用いた。

免疫組織化学

組織標本は、 3.7% (v/v)ホルマリン/PBSで 固定後 、パラフィン 包埋し、4 μm の厚さの切片に薄切した。キシレンとアルコールを用いて脱パラフィンし、3% (v/v)H_2O_2を加えた70% (v/v)メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼをブロックした。スライド切片を10 mMクエン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で 400W 電子レンジ (ERT 330; 東芝)で、5 分間 4 回 処理し、抗原性を露出させた。 1% (v/v)ヤギ 血清/PBS で 1 時間 、室温にて反応させた後、抗カルポニンモノクローナル抗体 (クローン No. hCP)を含む2% (v/v) BSA/PBS で、一晩、4℃で反応させた。0.005% (v/v)Tween 20/PBSで5 回洗浄後、ビオチン標識したヤギ抗マウスIgG(TAGO Immunologicals)を含む2% (v/v) BSA/PBS にて1 時間 、室温でインキュベーションした。続いて、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ 複合体溶液 (Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.)を 30 分間、室温で 反応させた。0.005% (v/v) Tween 20/PBSで 洗浄後、0.5mg/ml diaminobenzidine(和光純薬、大阪)によって最終反応 生成物は呈色した。核はヘマトキシリンで染色した。1次抗体として、マウス非免疫 IgG を用いて非特異的な 発色を検討した。

統計分析

年齢、発病 および追跡 期間とカルポニン陽性群 あるいは陰性群との 関連を、対のない t 検定を用いて分析した。さらにKaplan-Meier 法を用いて、2 群間の生存率の 統計学的な有意差を検討した($p<0.05$を有意差ありとした)。

3. 第三章の実験

ターゲッテング遺伝子の構築

ターゲティングベクター を作成するために、塩基性 カルポニンの全長 遺伝子を含む約25kbのDNAフラグメントを129SV/J マウスのゲノムライブラリー (Stratagene)よりクローニングした。 エキソン 2 から7 までを 含む10kb の*Sma*I 断片をpBluescript SK(+)にサブクローニングした。エキソン 5 から 7 までを含む*Eco*RV-*Apa*I 断片をgpt-neo-カセットに置換した。HSV-tk 遺伝子とジフテリア毒素遺伝子をネガティブ選択のマーカーとして、それぞれターゲティングベクターの5'と3'に結合させ た。胎児幹細胞 (ES細胞)(CCE クローン)に、 ECM600 (BTX, San Diego, U.S.A.)を用いて電気パルス法 (270V/1.8 mm, 500 μF) にてトランスフェクションした。 G418 (250 μg/ml)で選択し、138 個のクローンを得た。このうちサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて、相同組換えが起こったクローン10 個を選択した。ES細胞を、C57BL/6マウスの 胚盤胞にマイクロインジェクションした。キメラのオスをC57BL/6 のメスとかけ合わせヘテロ接合体マウスを作成した。続いて、ヘテロ接合体マウス同士をかけ合わせて塩基性カルポニン 遺伝子ホモ型欠失マウスを得た。

RNAの精製とRT-PCR

RNA標本とRT-PCR分析用の組織の試料は生体から 切除後、-80 °Cの液体窒素でRNA抽出時まで凍結保存した。total RNAは培養細胞および組織よりISOGEN RNA抽出キット(ニッポンジーン)を用いて抽出した。RTは2 μg のtotalRNAを Ready-To-Go You-Prime First-Strandビーズ(Pharmacia Biotech)を用いて0.2 μgランダムプライマーの存在下で行った。以下に示した特異的プライマーを用いてPCR反応を行った。条件は、変性; 94°C, 40 sec, アニーリング; 60°C, 30 sec, 重合; 72°C, 90 sec,30 サイクルで行った。

basic calponin ; 1295 bp
sense 5'-GTCTGTGTCATCTGCACCTC-3' extending from position 52
antisense 5'-TCCCGTCGCAGGAAT GGGGC-3' extending from position 1346 ;
neutral calponin ; 1312 bp
sense 5'- CCCTCTGCCGGTCCCGCTGG-3'
antisense 5'-CAAACTGATGTGAAAGAGAT-3'
acidic calponin ; 924 bp
sense 5'-AACAGCCATGACCCACTTCAAC-3'
antisense 5'-TCGGGGTATTCTGCTTG ATAATC-3'
BMP receptor-IA/ALK3 ; 534 bp
sense 5'-GCTTATTCTGCTGCTTGTGGTC-3'

antisense 5'-GTGAGTCTGGAGGCTGGATTAT-3'
BMP-4 ; 402bp
sense 5'-GCGC CGTCATTCCGGATTAC-3'
antisense 5'-CATTGTGATGGACTAGTCTG-3'
GAPDH ; 731bp
sense 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGA-3'
antisense 5'-TTGTCATACCAGGAAATGAGC-3'

抗体

塩基性カルポニン遺伝子のLeu-281～Ala-297の領域の合成 ペプチドをlimpet haemacyaninとm-maleimidobenzoyl-N-hydroxy succinimide esterに結合させてウサギに免疫し、抗血清を得た。塩基性カルポニン アイソフォームに対する抗体の特異性は、組換え型カルポニン-βガラクトシダーゼ 融合蛋白を用いて、イムノブロット 法で検定した[47]。

軟骨および骨の染色

受精後13.0, 13.5 と14.5 日目の胚を エタノールで 4 日間 固定し、アセトンに置換した。3 日後に水洗し、0.1% (w/v)アリザリン レッド(Sigma chemicals)を含む95% (w/v)エタノール, 0.3% (w/v) アルシアンブルー 8GX(Sigma chemicals)を含む70% (v/v)エタノール, 酢酸, エタノールのそれぞれ1対1対1対17の割合で混合した溶液 中にて10 日間 染色した。96% (v/v)エタノールで洗浄後、検体を室温で20% (v/v)グリセリン/1% (w/v) KOH中で、骨格が見えるまで透明化した。

軟X線撮影と*In situ hybridization*

骨を軟X線 装置(Softex 社製 , 大阪)で撮影した。 骨組織は10% (w/v)ホルムアルデヒド/PBS にて 16～24 時間固定後、5% (v/v)ギ酸で骨のカルシウム成分を脱灰した後パラフィン包埋した。5 μmの厚さに切った組織切片をヘマトキシリン、エオジン染色し、BX-50 顕微鏡(オリンパス)で観察した。*In situ* hybridization は、マウスBMP-4 cDNAの0.72kb の *Xba*I-*Bal*I 断片から、ジゴキシゲニンで 標識したcRNAを合成し、プローブ として用いた[51]。hybridizationと洗浄はそれぞれ50°C と37°Cで行った。

骨折治癒の実験的 モデル

6 週齢のホモ型欠失マウス (n=16) と野生型 マウス (n=16) の第 8 肋骨をエチル エーテル麻酔下で、 肋骨の軸に垂直にハサミで切断した。全ての動物は、大阪府立成人病センターの動物 愛護 委員会の指針に基づき処置した。

BMP/ アテロコラーゲン複合ペレットの移植

ヒト組換え体BMP (rhBMP)は、山の内製薬 (東京)を介して、Genetics Institute (Cambridge, U.S.A)より供与を受けた。5 μg のrhBMP-2を、2.4 mg のアテロコラーゲン(ニッタゼラチン、大阪) に含浸させ、6 週齢のホモ型欠失マウスと野生型マウスに移植した。移植 3 週間目で屠殺し、骨形成を軟X線と組織学的手法により解析した。 さらに、骨切修復過程を組織学的に検討した。骨のカルシウム 含有量 は、以下の方法で定量した。 骨をトリクロロエチレンとメタノール (1:1) 混液で 24 時間脱脂し、蒸発により乾燥させた後、1 ml の0.6 M HCl で 24 時間脱灰した。その塩酸上清中のカルシウム 含有量を、カルシウムC-テスト (和光純薬、大阪)を用いて測定した。

細胞培養

マウス 骨芽細胞株 MC3T3-E1(RCB1126) は理研遺伝子バンク (筑波)より購入した。 初代培養前骨芽細胞は、 新生児 頭蓋冠よりコラゲナーゼ (Sigma chemicals) とディスパーゼ (Sigma chemicals)を用いて分離した。 ホモ型欠失マウスおよび野生型 マウスの15.5 日目の胎児の大腿 筋より、未分化間葉系細胞を分離した。組織片をPBSで洗浄した後、0.06% (w/v)トリプシン/PBS (Difco Labolatories, Detroit, U.S.A.)を37 ℃ 、15 分間 ゆるく攪拌しながら作用させた。この操作を3 回繰り返した後、細胞を1300 rpm 、10分間 、室温で遠心して集め、10% (v/v)FCS (Bioserum, Canterbury, Austraria) /ペニシリン(10万単位/L), ストレプトマイシン(0.1g/L)を含むDMEM培地 (Life Tech., Rockville, U.S.A.)に懸濁した。細胞 をレンズペーパーのついたSwinex フィルターを通して、10cmガラスシャーレ(岩城ガラス, 船橋)に移し、37 ℃ 、1 時間インキュベーションした後、浮遊細胞を除去した。接着細胞を、10% (v/v)FCS/DMEMで 6 日間培養した。 増殖実験は、細胞を6 穴シャーレ(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, U.S.A.)に1 x 10^5 cells/well の密度で培養し、10% (v/v) FCS/DMEM培地下で行った。1% (v/v)FCS/DMEM培地に交換後、10%(v/v) FCS もしくは、40 ng/ml あるいは250 ng/ml の濃度 のrhBMP-2を含むDMEM培地で72 時間培養した後、細胞数を血球算定板を用いて計測した。培養シャーレへの生着率はホモ型欠失マウスと野生型マウスの細胞で差がなかった。 6 穴シャーレに細胞を 5 x 10^4 cells/ well の密度で、48 時間 培養した。rhBMP-2を40 ng/ml あるいは250 ng/ml の濃度で10% (v/v)FCS/DMEM培地に添加し、さらに48 hr 培養した。 細胞を 0.4 ml/well のPBSで抽出し、超音波で破砕した。ALP 活性は基質として p-nitrophenyl phosphate を用い、Kind and King'sの方法 (和光 純薬, 大阪)に従って測定した。ALP活性染色は、細胞を10% (w/v)ホルムアルデヒド/PBSで固定し、 0.1 mg/ml のナフトール AS-MX リン酸 (Sigma Chemicals) と0.6 mg/ml のクレシルバイオレットB塩 (Sigma chemicals)を含む10 mM トリスHCl 緩衝液 (pH8.5) を用いて染色した。タンパク質濃度は Protein Assey Reagent (Bio-Rad

Laboratories)を用いて測定した。 実験は、 少なくとも 3 回繰り返して行い、 異なる日に分離した胚細胞を用いて再現性を確認した。

統計分析

Student's t-test あるいは χ^2-testを用いて統計学的な有意差を 検定した 。

引用文献

1. Campbell, G.R., Campbell, J, H. Smooth muscle phenotipic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp. Mol. Pathol.* **42**, 139-162 (1985).
2. Owens, G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* **75**, 487-517 (1995).
3. Virchow, R. Cellular pathology: as based upon physiological and pathological histology. New York: Dover Publications, Inc; 404-408 (1863).
4. Giachelli, C.M., Bae, N., Almeida, M., Denhardt, D.T., Alpers, C.E., Schwartz, S.M. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **92**, 1686-1696 (1993).
5. Shanahan, C.M., Cary, N.R.B., Metcalf, J.C., Weissberg, P.L. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **93**, 2393-2402 (1994).
6. 永井良三. 冠動脈硬化と血管平滑筋細胞. *Cardiac Insight* **1**, 8-11 (1997).
7. Shanahan, C.M., Weissberg, P.L., Metcalf, J.C. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **73**, 193-204 (1993).
8. Takahashi, K., Hiwada, K., Kokubu, T. Vascular smooth muscle calponin: a novel troponin T-like protein. *Hypertension* **11**, 620-626 (1988).
9. Takahashi, K., Nadal-Ginard, B. Molecular cloning and sequence analysis of smooth muscle calponin. *J. Biol. Chem.* **266**, 13284-13288 (1991).
10. Gimona, M., Small, J.V. Calponin in *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction* (Barany, M. ed.), Academic Press, New York pp91-103 (1995).
11. Pearlstone, J.R., Weber, M., Less-Miller, J.P., Carpenter, M.R., Smilli, L.B. Amino acid sequence of chicken gizzard smooth muscle SM22α. *J. Biol. Chem.* **262**, 5985-5991 (1987).
12. Thweatt, R., Lummpkin C.K.Jr., Goldstein., S. A novel gene encoding a smooth muscle protein is overexpressed in senescent human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1-7 (1992).
13. Maruyama, K., Sugano, S. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* **138**, 171-174 (1994).
14. Takahashi, K., Tazunoki, T., Okada, T., Ohgami, K., Miwa, T., Miki, A., Shibata, N. The 5'-flanking region of the human smooth muscle cell calponin gene contains a cis-acting domain for interaction with a methylated DNA-binding transcription repressor. *J. Biochem.* **120**, 18-21 (1996).
15. Cross, S.H., Charlton, J.A., Nan, X., Bird, A. Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nature Genet.* **6**, 236-244 (1994).
16. Solway, J., Seltzer, J., Samaha, F.F., Kim, S., Alger, L.E., Niu, Q., Morriesey, E.E., Ip, H.S., Parmacek, M.S. Structure and expression of a smooth muscle cell-specific gene, SM22α. *J. Biol. Chem.* **270**, 13460-13469 (1995).
17. Kemp, P.R., Osbourn, J.K., Grainger, D.J., Metcalf, C. Cloning and analysis of the promoter region of the rat SM22α gene. *Biochem. J.* **310**, 1037-1043 (1995).
18. Li, L., Miano, J.M., Mercer, B., Olson, E. N. Expression of the SM22α promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **132**, 849-859 (1996).

19. Razin, A., Kafri, T. DNA methylation from embryo to adult. in *Progress in Nucleic Acid Reserch and Molecular Biology* (Cohn,W.E.and Moldave,K.,eds.) Vol.48, pp.53-81, Academic press, San Diego, (1994).
20. Bird, A. The essentials of DNA methylation. *Cell* **70**, 5-8 (1992).
21. Nan, X., Campoy, J., Bird, A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**, 471-481 (1997).
22. Miano, J.M., Olson, E.N. Expression of the smooth muscle cell calponin gene marks the early cardiac and smooth muscle cell lineages during mouse embryogenesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 7095-7103 (1996).
23. Jiang, Z., Grage, R.W., Walsh, M.P., Kamm, K.E. Adenovirus-mediated transfer of the smooth muscle cell calponin gene inhibits proliferation of smooth muscle cells and fibroblasts. *FEBS Lett.* **413**, 441-445 (1997).
24. Shah, N.M., Groves, A.K., Anderson, D.J. Alternative neural crest cell fate are instructively promoted by TGFβ superfamily members. *Cell* **85**, 331-343 (1996).
25. Hasegawa, T., Hirose, T., Seki, K., Hizawa, K., Usui, M., Ishii, S.,Wakabayashi, J. Histological and immunohistochemical diversities, and proliferative activity and grading in osteosarcomas. *Cancer Det. Prev.* **21**, 280-287 (1997).
26. Rhim, J.S., Park, D.K., Arnstein, P., Huebner, R.J., Weisburger, E.K., Nelson-Rees, W.A. Transformation of human cells in culture by N-methyN'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nat. Struct. Biol.* **256**, 751-753 (1975).
27. Carugo, K.D., Banuelos, S., Saraste, M. Crystal structure of a calponin homology domain. *Nat.Strut. Biol.* **4**, 175-179 (1997).
28. Katzav, S., Cleveland, J.L., Heslop, H.E., Pulido, D. Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potenntial. *Mol.Cell Biol.* **11** 1912-1920 (1997).
29. Sappino, A.P., Schurch, W., Gabbiani, G. Differentiation repertoir of fibroblastic cells: Expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab. Invest.* **63**, 144-161 (1990).
30. Leavitt, J., Gunning, P., Kedes, L., Jariwalla, R. Smooth muscle α-actin is a transformation-sensitive marker for mouse NIH3T3 and Rat-2 cells. *Nature* **316**, 840-842 (1985).
31. Rodan, G.A., Harada, S. The missing bone. *Cell* **89**, 677-680, (1997).
32. Ikeda, T., Shirasawa, T., Esaki, Y., Yoshiki, S., Hirokawa, K. Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. *J. Clin. Invest.* **92**, 2814-2820 (1993).
33. Weissberg, P.L., Cary, N.R.B., Shanahan, C.M. Gene expression and vascular smooth muscle cell phenotype. *Blood Pressure* **4** (Suppl. 2), 68-73 (1995).
34. Takahashi, K., Miwa, A., Takagi, M., Kojima, A., Eshita, Y., Nara, Y., Yamori, Y., Hirabayashi, M., Kato, O., Awata, N., Kobayashi, T., Shibata., N. Overexpression of calponin in transgenic rats inhibits intimal arterial smooth muscle cell hyperplasia in the carotid artery model of restenosis. *Circulation* **92**, I-295 (1995).
35. Urist, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**, 893-899 (1965).
36. Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Kahn, A.J., Suda, T., Yoshiki, S. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J. Cell Biol.* **113**, 681-687 (1991).
37. Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Mukudai, Y., Kawakami, Y., Nohno,T.,

Higuchi, Y., Takemoto, S., Ohchi, H., Noji, S., Kurisu, K. Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J. Cell Biol.* **140**, 409-418 (1998).

38. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi,K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao,Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y.,Yoshiki,S., Kishimoto, T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755-764 (1997).
39. Heldin, C.H., Miyazono, K., ten Dike, P. TGF-β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-471 (1997).
40. Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard, R.D., Hammer R.E., Herz,J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* **92**, 883-893 (1993).
41. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis,T. Analysis and cloning of eukaryotic genomic genomic DNA. in *Molecular Cloning* Cold Spring Harbor Lab.Press (2nd ed.) pp 9.1-9.62 (1989).
42. McKnight, S.L., Kingsbury, R. Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* **217**, 316-324 (1982).
43. Sanger, F., Nicklen, S., Couson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **74**, 5463-5467 (1977).
44. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354 (1979).
45. Stallcup, M. R., Washington, L. D. Region-specific initiation of mouse mammary tumor virus RNA synthesis by endogenous RNA polymerase II in preparations of cell nuclei. *J. Biol. Chem.* **258**, 2802-2807 (1983).
46. Breslauer, K., Frank, R., Bloker, H., Marky, L. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 3746-3750 (1986).
47. Masuda, H., Tanaka, K., Takagi, M., Ohgami, K., Sakamaki, T., Shibata, N., Takahashi,K. Molecular cloning and characterization of human non-smooth muscle calponin. *J. Biochem.* **120**, 415-424 (1996).
48. Rothman, A., Kulik, T.J., Taubman, M.B., Berk, B.C., Smith, C.W.J., Nadal-Ginard, B. Development and characterization of a cloned rat pulmonary arterial smooth muscle cell line that maintains differentiated properties through multiple subcultures. *Circulation* **86**, 1977-1986 (1992).
49. EnnekingW.F., Spanier, S.S., Goodman, M.A. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin. Orthop.* **153**, 106-120 (1980).
50. Humphrey,M.B., Herrera-Sosa H., Gonzalez, G., Lee, R., Bryan, J. Cloning of cDNAs encoding human caldesmons. *Gene* **112**, 197-204 (1992).
51. Nakase, T., Nomura, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Oikawa, S., Ono, K., Takaoka, K. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 651-659 (1994).

主論文

1. Hisako Yamamura, Hideki Yoshikawa, Masaharu Tatsuta, Hitoshi Akedo, Katsuhito Takahashi. Expression of the smooth muscle calponin gene in human osteosarcoma and its possible association with prognosis. *International Journal of Cancer* **79**, 245-250 (1998).

2. Hisako Yamamura, Hiroaki Masuda, Wataru Ikeda, Tai Tokuyama, Michiko Takagi, Nobuhiko Shibata, Masaharu Tatsuta, Katsuhito Takahashi. Structure and expression of the human SM22α gene, assignment of the gene to chromosome11, and repression of the promoter activity by cytosine DNA methylation. *Journal of Biochemistry* **122**, 157-167 (1997).

3. Hideki Yoshikawa, Shun-ichiro Taniguchi, Hisako Yamamura, Shigeki Mori, Mizuo Sugimoto, Kenji Miyado, Kenji Nakamura, Kazuki Nakao, Motoya Katsuki, Nobuhiko Shibata, Katsuhito Takahashi. Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes to Cells* **3**, 685-695 (1998).

参考論文

1. Noboru Ueki, Toshihisa Ohkawa, Hisako Yamamura, Katsuhito Takahashi, Takahiko Tsutsui, Yutaka Kawai, Yuzi Yokoyama, Yoshiki Amuro, Toshikazu Hada, Kazuya Higashino. Induction of calponin-h1 by transforming growth factor-β1 in cultured human Ito cells, LI90. *Biochimica Biophysica Acta* **1403**, 28-36 (1998).

2. Hisako Yamamura, Wataru Ikeda, Nobuhiko Shibata, Nobuhisa Awata, Katsuhito Takahashi. Structure and expression of calponin in arterial smooth muscle cells. *Ischemic Heart* **1**, 87-95 (1998).

3. Akihiko Nakaizumi, Masaharu Tatsuta, Hiroyuki Uehara, Hiroyasu Iishi, Hisako Yamamura, Sigeru Okuda, Tugio Kitamura. A prospective trial of early detection of pancreatic cancer by ultrasonographic examination combined with measurement of serum elastase 1. *Cancer* **69**, 936-940 (1992).

4. Hisako Yamamura, Masaharu Tatsuta, Michiko Itoh, Hiroyasu Iishi, Sanai Noguchi, Shigeru Okuda,Mototsugu Yoshida. Effectiveness of discriminant analysis of serum CA19-9 and elastase 1 in diagnosis of pancreatic carcinoma. *Pancreas* **4**, 401-405 (1989).

5. Masaharu Tatsuta, Hiroyasu Iishi, Hisako Yamamura, Reiko Yamamoto, Haruo Taniguchi. Enhancement by tetragastrin of experimental induction of gastric epithelium in the duodenum.
Gut **30**, 311-315 (1989).

6. Masaharu Tatsuta, Hiroyasu Iishi, Hisako Yamamura, Miyako Baba, Haruo Taniguchi. Enhancement by prolonged administration of caerulein of experimental carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rat stomach.
Cancer Research **48**, 6332-6335 (1988).

7. Masaharu Tatsuta, Hiroyasu Iishi, Hisako Yamamura, Miyako Baba, Reiko Yamamoto, Haruo Taniguchi. Effect of cimetidine on inhibition by tetragastrin of carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats.
Cancer Research **48**, 1591-1595 (1988).

8. Masaharu Tatsuta, Hiroyasu Iishi, Hisako Yamamura, Haruo Taniguchi. Inhibition by tetragastrin of experimental carcinogenesis in rat colon: Effect of wheat bran consumption.
International Journal of Cancer **41**, 239-242 (1988).

9. Masaharu Tatsuta, Hiroyasu Iishi, Hisako Yamamura, Haruo Taniguchi. Enhancement by propranol of the inhibitory effect of tetragastrin on gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats.
Cancer Research **47**,111-114 (1987).

10. Masaharu Tatsuta, Hiroyasu Iishi, Makoto Ichii, Sanai Noguchi, Hisako Yamamura, Haruo Taniguchi. Inhibitory effects of tetragastrin and histamine on carcinogenesis in the small intestines of Wistar rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.
Journal of National Cancer Institute **76**, 277-281 (1986).

11. Masaharu Tatsuta, Hiroyasu Iishi, Makoto Ichii, Sanai Noguchi, Hisako Yamamura, Haruo Taniguchi. Effect of tetragastrin on the colonic mucosa of rats during intrarectal administration of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.
Cancer Research **46**, 4539-4542 (1986).

12. Masaharu Tatsuta, Hisako Yamamura, Hiroyasu Iishi, Makoto Ichii, Sanai Noguchi, Miyako Baba, Haruo Taniguchi. Effect of a chemically defined diet in liquid form on colon carcinogenesis in rats.
Journal of National Cancer Institute **75**, 911-916 (1986).

13. Masaharu Tatsuta, Hisako Yamamura, Hiroyasu Iishi, Makoto Ichii, Sanai Noguchi, Miyako Baba,Haruo Taniguchi. Promotion by vagotomy of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats.
Cancer Research **45**, 94-197 (1985).

14. Masaharu Tatsuta, Reiko Yamamoto, Hisako Yamamura, Hiroyasu Iishi, Sanai Noguchi, Makoto Ichii, Shigeru Okuda. Photodynamic effects of exposure to hematoporphyrin derivatives and dye-laser radiation on human gastric adenocarcinoma cells.
Journal of National Cancer Institute **73**, 59-67 (1984).

15. Masaharu Tatsuta, Hisako Yamamura, Makoto Ichii, Haruo Taniguchi. Promotion by histamine of carcinogenesis in the forestomach and protection by histamine against carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the glandular stomach in Wistar rats.
Journal of National Cancer Institute **71**, 36-364 (1983).

16. Masaharu Tatsuta, Hisako Yamamura, Makoto Ichii, Haruo Taniguchi. Effect of prolonged administration of gastrin on experimental carcinogenesis in rat colon induced by intrarectal instilation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.
Cancer Research **43**, 2258-2260 (1983).

17. Masaharu Tatsuta, Hisako Yamamura, Reiko Yamamoto, Yataka Okano, Takurou Molii,Shigeru Okuda, Hiroshi Tamura. Significance of carcinoembrionic antigen levels and cytology of pure pancreatic juice in diagnosis of pancreatic cancer.
Cancer **52**, 1880-1885 (1983).

18. Masaharu Tatsuta, Hisako Yamamura, Haruo Taniguchi, Hiroshi Tamura. Gastrin protection against chemically induced gastric adenocarcinoma in Wistar rats: Histo-pathology of the glandular stomach and incidence of gastric adenocarcinoma.
Journal of National Cancer Institute **69**, 59-66 (1982).

19. Masaharu Tatsuta, Tadao Itoh, Shigeru Okuda, Hiroshi Tamura, Hisako Yamamura. Effect of fundectomy on serum and antral gastrin levels in rats.
Gastroenterology **72**, 78-81 (1977).

20. Tadao Itoh, Masaharu Tatsuta, Hiroshi Tamura, Hisako Yamamura, Takeshi Iwanaga. Studies on serum gastrin of the patients with gastric cancer.
American Journal of Gastroenterology **68**, 56-63 (1977).