

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10475

研究課題名(和文)炎症性サイトカインによる破骨細胞分化を制御するグルタチオン応答性タンパク質の同定

研究課題名(英文) Mechanism of glutathione-induced stimulation of osteoclast differentiation

研究代表者

藤田 洋史 (Fujita, Hirofumi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20423288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性疾患である関節リウマチや骨髄炎では、最も重大な症状が骨破壊として現れる。この骨破壊は破骨細胞による骨吸収が原因である。私たちは、破骨細胞の分化・活性化を制御する新規分子を、グルタチオン関連分子の中から同定することを試みた。私たちは、グルタチオンに関連し且つ破骨細胞に特異的に発現する複数の分子を見出した。そして、CRISPR-Cas9 systemにより、これらのノックアウトマウスの作出を試みた。私たちは複数の遺伝子のゲノム編集マウス(F0)の作製に成功し、そのうち次世代のマウスがとれた1分子でノックアウトマウスの樹立に成功した。現在、KOマウスの骨における表現系を解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that glutathione have a role in molecular mechanism of osteoclast differentiation. To clarify mechanisms of the stimulatory effect of glutathione on osteoclast differentiation, we tried to establish knockout mice of glutathione-related molecules which are expressed specifically in osteoclasts. Using CRISPR-Cas9 system, we were able to establish a knockout mice strain of glutathione-related molecules.

研究分野：骨代謝学、レドックス制御

キーワード：osteoclast glutathione inflammation differentiation

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は、巨大な多核の細胞であり、生体内の骨吸収を担う唯一の細胞であると考えられている。骨基質に接着し、細胞と骨基質の間に密閉空間を作り、酸やプロテアーゼを分泌することで、骨を溶解・吸収する。この破骨細胞は、造血幹細胞に由来する単球・マクロファージ系細胞が融合して形成される細胞であり、この分化を誘導、促進する分子として、Receptor activator of NFκB ligand (RANKL)や炎症性サイトカインである TNFα や IL-1 が知られている。

炎症性疾患である関節リウマチや骨髄炎では、最も重大な症状が骨破壊として現れる。近年、この骨破壊は破骨細胞による骨吸収は原因である事が明らかとなった。このような骨破壊を伴う疾患の治療において、破骨細胞の形成及び活性化を調節することは、最も重要な課題の一つである。

炎症において活性酸素および抗酸化酵素が重要な役割を果たしている。近年、抗酸化酵素ペルオキシレドキシシンが細胞外へ放出されると、マクロファージを刺激し、炎症を惹起することが報告された(Shichita T et al., Nat Med. 2012)。すなわち、リポポリサッカリド刺激により、マクロファージはペルオキシレドキシシンを放出し、これを danger signal として、TNF の分泌に続く反応を誘導している(Salzano S et al., PNAS, 2014)。さらに、ペルオキシレドキシシンはグルタチオン化されていることも報告された。これらの知見より、グルタチオン化ペルオキシレドキシシンが、マクロファージを活性化し、炎症の引き金になることが示された。このように、炎症とレドックス制御分子の関連が近年明らかになりつつある。

以上の研究背景より、私たちは、炎症性骨疾患における細胞外レドックス制御分子の関与を着想した。炎症条件下において、レドックス関連分子が、マクロファージ系の細胞の一種である破骨細胞の活性や分化を制御するという仮説を立てた。

2. 研究の目的

私たちは、グルタチオンが破骨細胞の分化を強く促進することを見出した。そこで、本研究の目的は、破骨細胞の分化および活性を制御する分子をグルタチオン関連分子の中から同定することとした。

3. 研究の方法

生体内において、破骨細胞の分化および骨吸収活性へのグルタチオン関連分子の影響を評価するために、CRISPR-Cas9 system によるゲノム編集を応用したノックアウト(KO)細胞株および KO マウス作製を行った。培養細胞株にはマウス線維芽細胞株 3T3-L1 細胞を用い、常法に従い培養を行った。CRISPR-Cas9 system は、ゲノム編集用 plasmid PX458 にターゲット配列をクローニング後、エレクトロ

ポレーション (NEPA21) により、トランスフェクションを行った。導入細胞を回収後、ゲノム DNA のシーケンシングにより変異導入を評価した。ノックアウトマウス作製には BDF1 マウス受精卵を用いた。PX458 を鋳型に *in vitro* 転写にて sgRNA を合成し、リコンビナント Cas9 タンパク質とともにエレクトロポレーションにてトランスフェクションを行なった。偽妊娠マウスに移植・出産後産仔テールよりゲノム DNA を取得し、変異導入を評価した。

4. 研究成果

私たちは、本課題の研究過程で、グルタチオン関連分子の合成を制御するタンパク質 A とその受容体 B を見出した。分子 A とポジティブコントロールの NFATc1 のゲノム編集を 3T3-L1 細胞にて行った結果、3T3-L1 細胞のゲノム DNA において、ターゲット部位を中心とした配列に変異が認められた。これらのターゲット配列を持つ gRNA に活性があることが確認できたため、マウス受精卵のゲノム編集を行った。その結果、NFATc1 ゲノム編集マウスは既報の通り、胚の段階で心臓の奇形のフェノタイプが認められた。FGF10 KO マウスは肢芽形成不全により四肢の欠損を引き起こすことが報告されている。FGF10 のゲノム編集マウスを作成した結果、四肢形成不全が認められ、以上より、マウスにおける CRISPR-Cas9 system を応用したゲノム編集が私たちの実験系でも確認された。そこで分子 A および分子 B についてもゲノム編集を行った結果、F0 マウスにおいて、ゲノム編集マウスが得られた。これらのマウスから F1 マウスを取得しようと試みた結果、分子 A については取得できた。しかし分子 B については、取得できなかった。プレリミナリーなデータより、精巢を解析した結果、ゲノム編集マウスにてはっきりとした萎縮が認められた。このことより分子 B は生殖機能に關与することが予想された。分子 A は X 染色体上に位置していたため、F1 マウスオスで KO 個体を得られた。外見的な表現系については目立った変化は認められなかった。現在、破骨細胞の分化および活性について解析を進めており、興味深い結果を得ている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- 1: Inoue J, Fujita H, Bando T, Kondo Y, Kumon H, Ohuchi H. Expression analysis of Dickkopf-related protein 3 (Dkk3) suggests its pleiotropic roles for a secretory glycoprotein in adult mouse. *J Mol Histol.* 2017 Feb;48(1):29-39. doi:10.1007/s10735-016-9703-2. 査読有
- 2: Kato M, Sugiyama T, Sakai K,

- Yamashita T, Fujita H, Sato K, Tomonari S, Shichida Y, Ohuchi H. Two Opsin 3-Related Proteins in the Chicken Retina and Brain: A TMT-Type Opsin 3 Is a Blue-Light Sensor in Retinal Horizontal Cells, Hypothalamus, and Cerebellum. PLoS One. 2016 Nov 18;11(11):e0163925. doi:10.1371/journal.pone.0163925. 査読有
- 3: Ohuchi H, Taniguchi K, Miyaishi S, Kono H, Fujita H, Bando T, Fuchizawa C, Ohtani Y, Ohtani O. Autopsy Case of Bilateral Optic Nerve Aplasia with Microphthalmia: Neural Retina Formation Is Required for the Coordinated Development of Ocular Tissues. Acta Med Okayama. 2016;70(2):131-7. 査読有
- 4: Fujita H, Nagakawa K, Kobuchi H, Ogino T, Kondo Y, Inoue K, Shuin T, Utsumi T, Utsumi K, Sasaki J, Ohuchi H. Phytoestrogen Suppresses Efflux of the Diagnostic Marker Protoporphyrin IX in Lung Carcinoma. Cancer Res. 2016 Apr 1;76(7):1837-46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1484. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 藤田 洋史, 青山 絵理子, 大内 淑代. In vitro において内在性抗酸化物質グルタチオンは破骨細胞分化に關与する. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 (2015.7.23-25.東京)
2. 岡 剛史, 阪田 真澄, 水野 初, 宇都宮 與, 藤田 洋史, 升島 努, 吉野 正. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATL)発症・進展特異的な代謝異常に關するメタボローム解析. 第 55 回リンパ網内系学会学術集会 (2015.07.09, 岡山)
3. 井上 順治, 藤田 洋史, 板東 哲哉, 近藤 洋一, 公文 裕巳, 大内 淑代. 癌抑制遺伝子 Dkk3/REIC のマウス組織における発現解析. 第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (2015.10.3, 大阪)
4. 藤田 洋史, 大野 充昭, 青山 絵理子, 荻野 哲也, 近藤 洋一, 大内 淑代. マウス頭蓋冠におけるリポポリサッカリドによる骨破壊とグルタチオンの効果. BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会 合同大会) (2015.12.1-4.神戸)
5. 藤田 洋史, 大野 充昭, 青山 絵理子, 荻野 哲也, 近藤 洋一, 大内淑代. マウス頭蓋冠における内毒素 lipopolysaccharide による骨溶解と抗酸化物質グルタチオンの作用. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2016.3.27-30. 福島)
6. 藤田 洋史, 大野 充昭, 青山 絵理子, 大内 淑代. 抗酸化物質グルタチオンは炎症性骨破壊を促進する. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会 第 3 回アジア太平洋骨代謝学会議 (2016.7.20-23. 大阪)
7. 藤田 洋史, 永川 恵介, 小淵 浩嗣, 荻野 哲也, 近藤 洋一, 井上 啓史, 執印 太郎, 内海 俊彦, 内海 耕慥, 佐々木 順造, 大内 淑代. ヘム代謝制御に基づく光感受性物質 protoporphyrin IX 蓄積機構の研究. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2016.8.30-31. 仙台)
8. 小淵 浩嗣, 藤田 洋史. ヘム代謝関連遺伝子の RNAi 効果による光線力学療法 of 改善. 第 89 回日本生化学会大会 (2016.9.25-27. 仙台)
9. 藤田 洋史, 井上 順治, 親泊政一, 近藤格, 公文裕巳, 大内淑代. ノックアウトマウス及びプロテオーム解析を用いた DKK3 タンパク質の生理的機能の解明. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2017.3.28-30. 長崎)
10. 小淵 浩嗣, 藤田 洋史. ABCG2 siRNA 導入によるがん細胞のアポトーシス誘導. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (2017.12.6-9. 神戸)
11. 土生田宗憲, 泰江章博, 藤田 洋史, 板東 哲哉, 佐藤恵太, 親泊政一, 田中栄二, 大内淑代. CRISPR/Cas9 システムにより作製したモザイク変異マウスの組織学的解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (2017.12.6-9. 神戸)
12. 藤田 洋史, 長尾 僚祐, 土生田宗憲, 服部 高子, 久保田 聡, 大内 淑代. ゲノム編集マウスを用いた破骨細胞分化におけるロイコトリエン合成関連遺伝子の機能解析. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2018.3.28-30. 東京)
13. 土生田宗憲, 泰江章博, 藤田 洋史, 板東 哲哉, 佐藤恵太, 親泊政一, 田中栄二, 大内淑代. ゲノム編集 Fgf10 モザイク変異体の組織学的解析. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2018.3.28-30. 東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/anatomy>
1/

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 洋史(FUJITA HIROFUMI) 岡山大学・大
学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号:20423288

(2)研究分担者

小淵 浩嗣(KOBUCHI HIROTSUGU) 岡山大学・
大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 10304297

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし