

令和元年5月30日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11512

研究課題名(和文) 分子イメージングを用いたcPLA2欠損マウスにおける骨代謝異常解析

研究課題名(英文) Bone metabolism disorders of cPLA2 knockout mice

研究代表者

片山 郁夫 (KATAYAMA, Ikuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：80295089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、cPLA2欠損マウス(cPLA2 KOマウス)から得られた破骨細胞は、cPLA2野生型マウス(cPLA2 WTマウス)から得られた破骨細胞と比較してactin-ringを形成しているものが少なく、骨吸収窩の面積は広いことを確認した。このactin-ringの形成や骨吸収に、核内のcPLA2が関与している可能性が示唆された。今後、破骨細胞の核内でのcPLA2の機能解析を行い、骨代謝におけるcPLA2の役割を明らかにしていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、細胞核内の細胞質型ホスホリパーゼA2(cPLA2)が骨代謝に関与する可能性を示した。本来cPLA2は炎症メディエータであるプロスタグランジン類やロイコトリエン類などの基となるアラキドン酸を生体膜から遊離する酵素として知られているが、近年このcPLA2の様々な機能が報告されている。本研究では、cPLA2が破骨細胞の活性化を通して骨代謝に関与している可能性を示した。このことはcPLA2が骨代謝異常解析に対するターゲット遺伝子の1つである可能性を示すものであると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found osteoclasts derived from cPLA2 knockout mice decreased actin-ring formation but increased bone resorption compared with those derived from cPLA2 wild type mice. Nuclear translocation of cPLA2 might be involved in such osteoclast activity. These results suggest a novel function of cPLA2 in the bone metabolism.

研究分野：歯科放射線学

キーワード：細胞質型ホスホリパーゼA2 破骨細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Ca²⁺依存性細胞質型ホスホリパーゼ A2 (cPLA2) の骨代謝における役割についてはこれまで相反する結果が報告されている。破骨細胞については、cPLA2 欠損マウス (cPLA2 KO マウス) の骨髄細胞からは破骨細胞形成がみとめられないという報告 (J Exp Med 197:1303-1310; 2003) がある一方で、cPLA2 阻害剤を用いた実験では cPLA2 の抑制は破骨細胞の形成を促進するという報告 (PLEFA 90:117-123; 2014) がある。また、骨芽細胞については、cPLA2 に特異的な siRNA で cPLA2 を抑制すると骨芽細胞の活性化が抑制されるという結果 (Protein J 34:29-34; 2015) に対し、cPLA2 阻害剤は骨芽細胞の不活性化を抑制するという矛盾する結果 (Oral Dis 13:32-39; 2007) が報告されている。このように相反する結果がみられる大きな要因は、これらの研究がごく特殊な条件下での実験であったことが大きいと思われる。例えば薬剤により誘発された炎症反応であること (J Exp Med 197:1303-1310; 2003)、きわめてシンプルな実験系のみで評価したこと (Protein J 34:29-34; 2015)、特異性の高くない阻害剤を用いた *in vitro* での研究であったこと (PLEFA 90:117-123; 2014, Oral Dis 13:32-39; 2007)、などである。したがって、現時点では、骨代謝の制御における cPLA2 の役割についてはまだ結論に達していないと考える。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨代謝制御における cPLA2 の役割を解明することである。破骨細胞において cPLA2 蛋白の発現が認められることから、この蛋白の骨代謝に対する影響は重要であると想像できる。本研究では、理研との共同研究により確立したコンディショナル cPLA2 ノックアウトマウス (cPLA2 KO マウス) を利用して、骨代謝における cPLA2 の役割を解明することを目的とした。

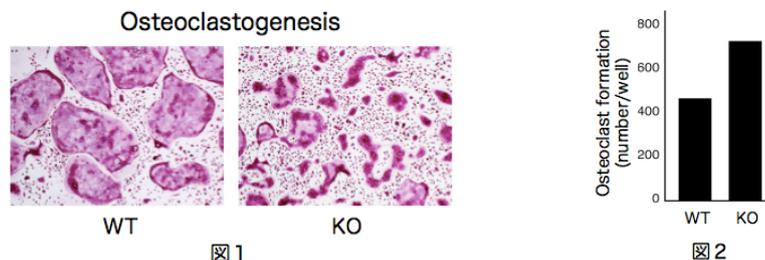
3. 研究の方法

本研究では、cPLA2 KO マウス及び cPLA2 野生型マウス (cPLA2 WT マウス) の脛骨および大腿骨より骨髄を取り出し破骨細胞の前駆細胞を分離し、M-CSF/RANKL によって破骨細胞に分化させた後、以下の(1)~(5)の項目について検討を行った。

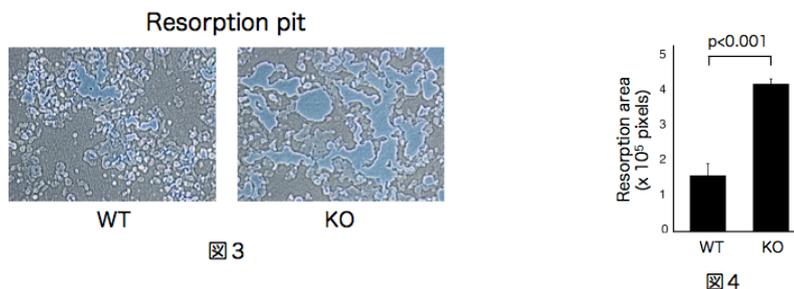
- (1) 破骨細胞の分化について、TRAP 染色を行った。
- (2) 破骨細胞の骨吸収能について、結晶性リン酸カルシウムがコーティングされたシャーレを用い Pit formation assay を行った。
- (3) Actin-ring 形成について、F-actin を蛍光標識したファロイジンで染色し、蛍光イメージングにより観察した。
- (4) Actin-ring の構造について、F-actin を蛍光標識したファロイジンで染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
- (5) Actin-ring と細胞核について、蛍光標識ファロイジンと Dapi の二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) cPLA2 KO マウス及び cPLA2 WT マウス由来の破骨細胞を TRAP 染色したところ、cPLA2 WT マウス由来の破骨細胞のほうが大きい細胞が多く (図 1)、細胞核が 3 個以上の破骨細胞は cPLA2 KO マウス由来の破骨細胞のほうが多いこと (図 2) が確認された。



(2) Pit formation assay においては、cPLA2 KO マウス由来の破骨細胞の方が cPLA2 WT マウス由来の破骨細胞より広い範囲の吸収窩を形成することが確認された (図 3、図 4)。



(3) F-actin を蛍光標識したファロイジンで染色した後、蛍光イメージングにより観察を行った。PLA2 WT マウスおよび cPLA2 KO マウス由来の破骨細胞において、この actin ring を形成している破骨細胞の割合を調べたところ、WT マウス由来では 60%程度の破骨細胞に actin-ring があるのに対し、KO マウス由来では 20%程度であった (図 5、図 6)。

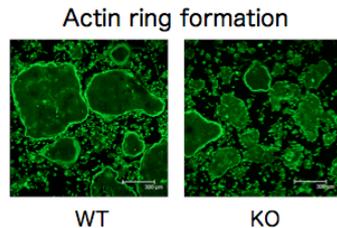


図 5

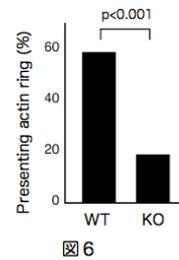


図 6

(4) Actin-ring の構造について、F-actin を蛍光標識したファロイジンで染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。(図 7) において、赤色の矢印で示すように、actin-ring をもたない破骨細胞は、シャーレの底面に近いところでは観察できなかった。一方、actin-ring をもつ破骨細胞では白色の矢印で示すように、シャーレの底面にしっかり付着していることがわかった。この付着性の違いが、破骨細胞の運動性の違いに関与し、骨吸収能に違いがあるのではないかと考えた。

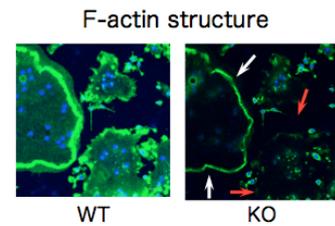


図 7

(5) Actin-ring と細胞核の関係について、蛍光標識ファロイジンと Dapi の二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(図 8) の左に示すように、actin-ring を形成している WT マウスの破骨細胞において、矢印で示す部分、すなわち actin-ring が未完成の部分に核が存在していることが確認された。このように、核が細胞の辺縁に存在するという現象は、actin-ring が完成している部分や、(図 8) 右の actin-ring をもたない KO マウスの破骨細胞ではみられなかった。

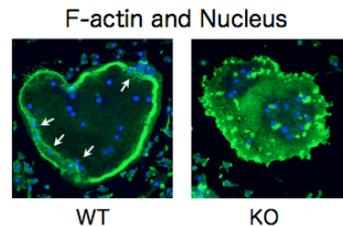


図 8

(6) 以上の結果より、cPLA2 KO マウスから得られた破骨細胞は、cPLA2 WT マウスから得られた破骨細胞と比較して、actin-ring を形成しているものが少なく、骨吸収窩の面積は広いことが確認できた。この actin-ring の形成、細胞の移動による骨吸収に、核内の cPLA2 が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Misa Sumi, Yukinori Takagi, Miho Sasaki, Sato Eida, Ikuo Katayama, Yuka Hotokezaka, Takashi Nakamura, Magnetic resonance perfusion and diffusion characteristics of granulomatous diseases mimic those of malignant lesions: six case reports, Oral Radiol. 査読有, 2018 Jan;34(1):73-82.

DOI: 10.1007/s11282-017-0271-2.

② Ikuo Katayama, Sato Eida, Shuichi Fujita, Yuka Hotokezaka, Misa Sumi, Takashi Nakamura, Perfusion MR imaging detection of carcinoma arising from preexisting salivary gland pleomorphic adenoma by computer-Assisted analysis of time-signal intensity maps, PLoS One. 査読有, 2017 May 22;12(5):e0178002.

DOI: 10.1371/journal.pone.0178002. eCollection 2017.

[学会発表] (計 5 件)

① 佛坂由可、片山郁夫、中村 卓、DNA 損傷と低酸素ストレスに共通する death signal 経路の同定、日本歯科放射線学会 第 59 回学術大会・第 15 回定例総会、2018

② Yuka Hotokezaka, Ikuo Katayama, Sato Eida, Misa Sumi, Miho Sasaki, Takashi Nakamura, Carcinoma ex Pleomorphic Adenoma vs. Pleomorphic Adenoma: Differentiation using Two-Dimensional Time Intensity Curve Mapping, The 21st International Congress of Dental and Maxillofacial Radiology, 2017

③ 佐々木美穂、佛坂由可、榮田 智、片山郁夫、角 美佐、中村 卓、高磁場・超高 b 値における拡散強調撮像法、日本歯科放射線学会 第 58 回学術大会・第 14 回定例総会、2107

④ 片山郁夫、佛坂由可、田代茂樹、氏家眞幸、中村 卓、cPLA2 欠損マウスにおける破骨細胞形成と活性について、日本歯科放射線学会 第 57 回学術大会・第 13 回定例総会、2016

⑤ 佐々木美穂、片山郁夫、佛坂由可、高木幸則、榮田 智、角 美佐、中村 卓、モニタ診断に対応した歯学部臨床実習生への読影教育システムの構築、日本歯科放射線学会 第 36 回関西・九州合同地方会、2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中村 卓
ローマ字氏名：(NAKAMURA, Takashi)
所属研究機関名：長崎大学
部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）
職名：教授
研究者番号（8桁）：30172406

研究分担者氏名：佛坂 由可
ローマ字氏名：(HOTOKEZAKA, Yuka)
所属研究機関名：長崎大学
部局名：病院（歯学系）
職名：講師
研究者番号（8桁）：10244089

研究分担者氏名：佐々木 美穂
ローマ字氏名：(SASAKI, Miho)
所属研究機関名：長崎大学
部局名：病院（歯学系）
職名：助教
研究者番号（8桁）：10437874

研究分担者氏名：榮田 智
ローマ字氏名：(EIDA, Sato)
所属研究機関名：長崎大学
部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）
職名：助教
研究者番号（8桁）：80325662