

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09540

研究課題名（和文）亜鉛の恒常性の破綻とエキソソームを介した軟骨代謝異常の解析

研究課題名（英文）The exploration of exosome involvement in skeletal abnormalities induced by dysregulation of zinc homeostasis

研究代表者

安原 理佳（Yasuhara, Rika）

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：20453649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：亜鉛の代謝異常は骨格異常や免疫異常をきたす。本研究課題は、亜鉛の恒常性破綻による骨格異常の病態解明を目的とした。亜鉛の細胞内調節を担う亜鉛トランスポーター（ZIP10）欠損細胞では野生型細胞と比較して、骨代謝関連遺伝子群やエキソソームに関わる遺伝子群の発現が変動した。単離エキソソームは、既知のエキソソームマーカーに加えて、間葉系細胞特有マーカーを発現していた。DIAプロテオーム解析からZIP10欠損細胞の単離エキソソームにdevelopmental processに関与する1798個のタンパク質が同定された。亜鉛はエキソソームを介して骨代謝関連細胞の分化を制御する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

必須微量因子である亜鉛の代謝異常は骨格異常や骨粗鬆症、さらに免疫力の低下をきたし、老化に関わる事が示唆されている。亜鉛の細胞内濃度は亜鉛トランスポーターを介して調節される。本研究課題は、ZIP10欠損マウスを作製し、亜鉛欠乏した骨関連細胞で発現する遺伝子をRNA-sequence法を用いて網羅的に解析した。さらに、細胞からエキソソームを回収し、LC-MS/MSを用いてエキソソームに含まれるタンパク質の解析を行った。亜鉛のエキソソームに対する作用の解明は、報告が少なく、本研究課題の成果は、骨格形成のみならず、関節疾患の病態メカニズムや治療法開発に新たな知見と理解をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Abnormal zinc metabolism leads to skeletal and immune abnormalities. The purpose of this research project was to elucidate the pathogenesis of skeletal abnormalities caused by disruption of zinc homeostasis. ZIP10 (zinc transporter) deficient cells, which are responsible for intracellular regulation of zinc, showed higher variation in bone metabolism-related gene clusters and gene clusters related to vesicles and exosomes compared to wild-type cells. Isolated exosomes expressed mesenchymal cell-specific markers in addition to known exosome markers, and DIA proteome analysis identified 1798 proteins involved in the developmental process in isolated exosomes of ZIP10-deficient cells. Zinc may regulate bone metabolism-related cell differentiation via exosomes.

研究分野：細胞分子機能病理学

キーワード：骨格形成 軟骨 細胞・組織 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨軟骨成長に亜鉛の恒常性の維持が必須である。

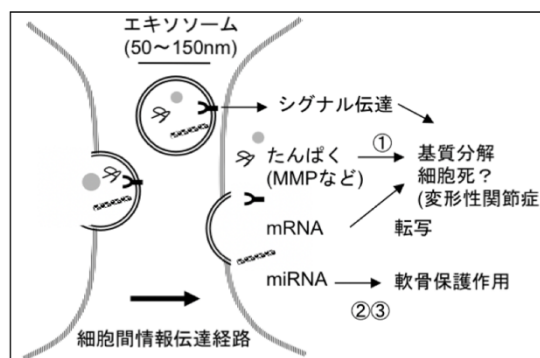
亜鉛の欠乏は骨粗鬆症を招くことや、胎生期からの亜鉛欠乏は骨格の成長障害を招く事が知られている。亜鉛欠乏が骨芽細胞の骨形成能を低下することで骨代謝回転に不均衡を来すことから亜鉛の骨代謝への関与が示唆されている。一方で、骨格成長は軟骨内骨化で制御されるが、骨軟骨代謝機構に対する亜鉛の生理的意義はまだ十分に解明されていない。細胞内の亜鉛濃度は2つの亜鉛輸送体:ZIPとZnTトランスポーターによって制御されている。申請者は、骨軟骨特異的にZIPトランスポーター(ZIP10)を欠損させたマウスの解析から、ZIP10を介した骨格形成メカニズムが存在することを明らかにしてきた。さらに、次世代シーケンズ法を用いたGene Ontology解析から、ZIP10を欠損させた骨軟骨組織では、Vesicle(微小小胞体;MV)やExosome(細胞外小胞体/エキソソーム;MVB)に関わる遺伝子群の変動が高く、亜鉛が小胞輸送やタンパク分泌を制御する可能性が高い。

(2) エキソソームのパラクラインな作用は病態発現にも深く関与する。

エキソソームは50~150nmほどの小さな膜小胞であり、細胞膜や細胞質内の種々のタンパク質、mRNAやmiRNA(マイクロRNA)を取り込み、細胞外へ排出することから、サイトカインやホルモンに相当する細胞間コミュニケーションを担う重要な情報伝達経路として注目を集めている。エキソソームを介した情報伝達経路が関節疾患の病態発現や修復機構、組織の恒常性に関与することが裏付けられている。

2. 研究の目的

本研究課題では、エキソソームの内包性分子や放出量は生理的ないし病的な環境に対する細胞応答に依存して変化することから、亜鉛の恒常性の破綻による骨格異常に対するエキソソームの関与について解明することを目的とした。



3. 研究の方法

ZIP10 欠損マウスの骨格の組織学的解析と細胞内亜鉛濃度の低下による遺伝子発現変動を RNA-sequence 法を用いて網羅的に解析した。また、初代培養細胞からエクソソームを回収し、DIA プロテオーム解析によりエクソソームの構造や局在、内包分子を網羅的に解析した。

4. 研究成果

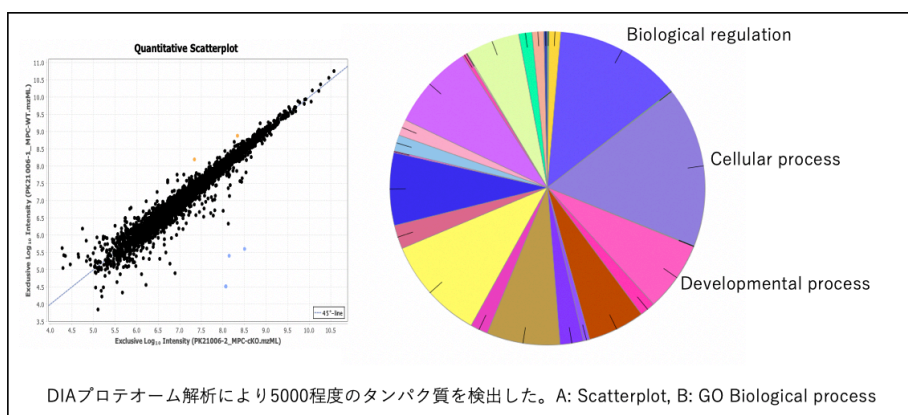
ZIP10 欠損マウスは四肢の短縮による骨格成長障害をきたし、顎顔面頭蓋骨の縮小、口蓋骨や歯胚の形成障害を認めた。

ZIP10 欠損した細胞では、RNA-sequence 法を用いた網羅的発現解析の解析結果から、骨代謝調節に関わる遺伝子群や Vesicle (微小小胞体;MV) や 細胞外小胞体/エクソソーム;MVB に関わる遺伝子群の変動が高く、亜鉛が小胞輸送やタンパク分泌を制御する可能性が示唆された。

初代培養細胞の培養上清中に含まれるエクソソームを超遠心法により 1mg 程度回収し、LC-MS/MS を用いた DIA プロテオーム解析を行った。5000 個近くのタンパク質を同定した。回収したエクソソームは既知のエクソソームマーカーに加え間葉細胞に特異的なエクソソームのマーカータンパク質を発現することが明らかとなった。

GO 解析では、Biological process, molecular function に対する種々の酵素活性に対するタンパク質の発現が変動を検出し、ZIP10 欠損細胞の単離エクソソームに developmental process に関与する 1798 個のタンパク質を同定した。

これらの結果は、亜鉛はエクソソームを介して骨代謝関連細胞の分化を制御する可能性が示唆された。亜鉛のエクソソームに対する作用の解明は、報告が少なく、本研究課題の成果は、骨格形成のみならず、関節疾患の病態メカニズムや治療法開発に新たな知見と理解をもたらすと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yasuhara Rika, Usami Yu, Enomoto-Iwamoto Motomi	4. 巻 NA
2. 論文標題 Wnt Signaling in Cartilage Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Bone Biology.	6. 最初と最後の頁 575 ~ 588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-801238-3.11187-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takakura Ikuko, Kujiraoka Satoko, Yasuhara Rika, Tanaka Junichi, Ide Fumio, Mishima Kenji	4. 巻 NA
2. 論文標題 Assessment of MEF2C as a novel myoepithelial marker using normal salivary gland and pleomorphic adenoma: An immunohistochemical study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2022.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katada Ryogo, Tanaka Junichi, Takamatsu Koki, Hata Kenji, Yasuhara Rika, Ohnuma Shintaro, Takakura Ikuko, Nishimura Riko, Shirota Tatsuo, Mishima Kenji	4. 巻 586
2. 論文標題 Induction of salivary gland-like cells from epithelial tissues transdifferentiated from mouse embryonic fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.064.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakai Kento, Shiga Takahiro, Yasuhara Rika, Sarkar Avijite Kumer, Abe Yuka, Nakamura Shiro, Hoashi Yurie, Kotani Keisuke, Tatsumoto Shoji, Ishikawa Hiroe, Go Yasuhiro, Inoue Tomio, Mishima Kenji, Akamatsu Wado, Baba Kazuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 In vitro monitoring of HTR2A-positive neurons derived from human-induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-95041-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka J, Takamatsu K, Yukimori A, Kujiraoka S, Ishida S, Takakura I, Yasuhara R, Mishima K.	4. 巻 63(1)
2. 論文標題 Sox9 function in salivary gland development.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Oral Biosci.	6. 最初と最後の頁 8-13.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.01.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima A, Yasuhara R, Akino R, Mishima K, Nasu M, Sekizawa A.	4. 巻 6(3)
2. 論文標題 Engraftment potential of maternal adipose-derived stem cells for fetal transplantation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon.	6. 最初と最後の頁 1-9.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e03409.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima A, Oba T, Yasuhara R, Sekiya B, Sekizawa A.	4. 巻 40(6)
2. 論文標題 Cytokine profiles in maternal serum are candidates for predicting an optimal timing for the delivery in early-onset fetal growth restriction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Prenat Diagn.	6. 最初と最後の頁 728-737.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e03409. eCollection 2020 Mar.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goto Yuriko, Ibi Miho, Sato Hiroataka, Tanaka Junichi, Yasuhara Rika, Aota Keiko, Azuma Masayuki, Fukada Toshiyuki, Mishima Kenji, Irie Tarou	4. 巻 62
2. 論文標題 PLAG1 enhances the stemness profiles of acinar cells in normal human salivary glands in a cell type-specific manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Junichi, Mabuchi Yo, Hata Kenji, Yasuhara Rika, Takamatsu Koki, Kujiraoka Satoko, Yukimori Akane, Takakura Ikuko, Sumimoto Hidetoshi, Fukada Toshiyuki, Azuma Masayuki, Akiyama Haruhiko, Nishimura Riko, Shimane Toshikazu, Mishima Kenji	4. 巻 382
2. 論文標題 Sox9 regulates the luminal stem/progenitor cell properties of salivary glands	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111449 ~ 111449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.05.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakabayashi M, Kawashima A, Yasuhara R, Hayakawa Y, Miyamoto S, Iizuka C, Sekizawa A.	4. 巻 8(1):15883
2. 論文標題 Massively parallel sequencing of cell-free DNA in plasma for detecting gynaecological tumour-associated copy number alteration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34168-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Kawashima Y, Mabuchi Y, Hata K, Nakamura S, Yasuhara R, Takamatsu K, Irie T, Fukada T, Sakai T, Inoue T, Nishimura R, Ohara O, Saito I, Ohba S, Tsuji T, Mishima K.	4. 巻 9(1):4216
2. 論文標題 Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06469-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 安原理佳
2. 発表標題 唾液腺の再生医学:オルガノイド作製とその再生医療への応用
3. 学会等名 第65回日本唾液腺学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhara Rika, Kang Seya, Yukimori Akane, Tanaka Junichi, Kujiraoka Satoko, Mishima Kenji.
2. 発表標題 Identification of salivary gland-derived myoepithelial cells using lineage tracing analysis.
3. 学会等名 第109回日本病理学会オンライン総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuhara Rika, Kang Seya, Yukimori Akane, Tanaka Junichi, Kujiraoka Satoko, Mishima Kenji.
2. 発表標題 Mouse salivary gland-derived myoepithelial cells differentiate into ductal lineage via Notch signaling.
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rika Yasuhara, Akihiro Kawashima, Akane Yukimori, Junichi Tanaka, Satoko Kujiraoka, Toshiyuki Fukada, Motomi Enomoto-Iwamoto, Kenji Mishima
2. 発表標題 Loss of ZIP10 impairs skeletal development via osteochondrocyte functions.
3. 学会等名 ASBMR 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rika Yasuhara, Toshiyuki Fukada, Motomi Enomoto-Iwamoto, Kenji Mishima
2. 発表標題 The essential role of zinc transporter ZIP10 in skeletal formation
3. 学会等名 ANZBMS Annual Scientific Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安原 理佳, 深田 俊幸, 岩本 資己, 美島 健二
2. 発表標題 亜鉛トランスポーターの骨格形成における役割の解析
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	美島 健二 (Mishima Kenji) (50275343)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	
研究分担者	田中 準一 (Tanaka Junichi) (40710166)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	
研究分担者	川嶋 章弘 (Kawashima Akihiro) (10783376)	昭和大学・医学部・講師 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------