

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22713

研究課題名（和文）石灰化過程における細胞内輸送ネットワークの解明

研究課題名（英文）Role of interorganelle communication in mineralization

研究代表者

岩山 智明（Iwayama, Tomoaki）

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：80757865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では細胞内の各オルガネラどうしが直接接触し、相互作用を行う「Interorganelle communication」が、硬組織形成にどのような影響を与えているかについて、ゲノム編集技術を用いて改変した細胞を作製し、超解像顕微鏡を用いたナノレベル観察や石灰化能の解析により検討しました。目的通りの細胞が作製され、リソソーム-ミトコンドリア相互作用が石灰化過程において重要な役割を担っていることが示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、骨や歯といった硬組織形成の基本的なメカニズムに関する理解が深まり、骨粗鬆症や歯周病などの疾患の病態解明や新規治療法の開発につながることを期待されます。さらにオルガネラ相互作用が硬組織形成にも関与していることが明確になれば、既存の概念の一新に繋がる潜在性を持つものと期待できます。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the effect of interorganelle communication, in which organelles in cells directly contact and interact with each other, in the mineralization process. We generated new cell lines using the CRISPR-Cas9 technique, performed nano-level observations using super-resolution microscopy, and evaluated change in mineralizing capacity. Our results suggest that the lysosome-mitochondrial interaction plays a vital role in the mineralization process.

研究分野：歯周病学

キーワード：石灰化 オルガネラ間相互作用 リソソーム ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内の各オルガネラはそれぞれ特定の機能を持った独自の存在として考えられてきたが、最近になって、オルガネラどうしが直接接触し、相互作用を行う「**Interorganelle communication**」がオルガネラや細胞の機能にとって重要であることが相次いで報告されている。例えば、エネルギーの産生を担うミトコンドリアが不要物の分解・排出を担っているリソソームと直接接触する (**Wong et al., Nature, 2018**) などの事例が挙げられる。

(2) 骨芽細胞・セメント芽細胞などの硬組織形成細胞はリン酸カルシウムを細胞内で合成・分泌することで硬組織形成に寄与している。この合成・分泌がどのオルガネラで行われ、どのように運搬され、分泌されるか、という石灰化の初期過程については、硬組織形成の最も基本的なメカニズムであるにも関わらず、その解明が遅れていた。我々は蛍光ラベリング技術を組み合わせることで回折限界を超えてナノレベル観察を実現する超解像顕微鏡などの新技術を用いて、骨芽細胞の石灰化初期過程を詳細に観察し、①リン酸カルシウムを含む小胞がミトコンドリア近傍から生成され、②この小胞の細胞内での動態がリソソームの動態と一致する、ことを示した。このことはミトコンドリアで形成されたリン酸カルシウムがリソソームに受け渡され、細胞内を運搬されていることを示唆する (**Iwayama et al., Sci Adv, 2019**)。すなわち、骨芽細胞においては、不要なものを運搬すると考えられてきたリソソームが、ミトコンドリアとの相互作用を経て、同細胞の主要機能であるリン酸カルシウムの細胞内輸送を担っている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光ラベリング技術と超解像顕微鏡を用いることで、硬組織形成細胞がリン酸カルシウムを細胞内で形成分泌する過程において、リソソームとミトコンドリアの相互作用が果たす役割を明らかにすることを目的とした。さらに、先天性骨系統疾患の患者由来の硬組織形成細胞を単離・培養し、その石灰化初期過程を解析することにより、同疾患の硬組織病態の理解を進展させることも目指した。

3. 研究の方法

主に以下の5つの項目について研究を実施した。

(1) CRISPR-Cas9 を用いたオルガネラ蛍光標識ノックイン骨芽細胞クローンの作製

オルガネラを正確に標識するため、Tild-CRISPR 法 (**Yao et al., Dev Cell, 2018**) を用いて内在性遺伝子座への蛍光タンパク質 (mCherry および mScarlet) のノックイン細胞の樹立を行った。すなわち、ホモロジーアームを有するドナーベクターを PCR クローニングにより作製し、同ベクターを Cas9 タンパク質とノックイン部位近傍をターゲットとした gRNA とともに Neon トランスフェクションによりマウス骨芽細胞に導入後、蛍光タンパク質を発現する細胞をセルソーターにて分取した。まず、Actb 遺伝子への 2A ペプチドおよび蛍光タンパク質のノックイン細胞を作製した。ついで、Lamp1、Sec61、Tom20 の各オルガネラタンパク質に蛍光タンパク質を融合して発現するノックイン細胞を作製した。作製した細胞はシングルセルソーティングによりクローン化した。

(2) CRISPR-Cas9 を用いたオルガネラ相互作用関連分子ノックアウト細胞クローンの作製

オルガネラ相互作用に関連する分子として、これまでに Rab7、Tbc1d15、Fis1 が報告されている。さらにリソソームの維持に重要な分子として、Fig4 に着目した。これらの分子について、gRNA を設計し、Cas9 タンパク質とともに Neon トランスフェクションによりマウス骨芽細胞に導入後、シングルセルソーティングにより単細胞由来のノックアウト細胞クローンを得た。

(3) CRISPR-Cas9 を用いたオルガネラ相互作用関連分子活性化細胞の作製

オルガネラ相互作用関連分子の活性化が石灰化過程に与える影響を検討するため、内在性遺伝子の転写を大きく活性化させる CRISPRa (**Chavez et al., Nat Methods, 2016**) を用いた。まずプラスミドベクターを用いて 293T 細胞中の HBB 遺伝子およびマウス骨芽細胞中の Hbb-bh1 遺伝子の発現が上昇するか検討し、その後、レンチウイルスベクターを用いてオルガネラ相互作用関連分子の発現が安定的に活性化する細胞を作製した。

(4) リソソーム-ミトコンドリア相互作用関連分子が石灰化過程に及ぼす影響の検討

上記にて作製した細胞を石灰化誘導培地にて培養し、石灰化ノジュール形成能をアリザリン染色にて検討した。細胞の観察はリアルタイムに近いフレームレートでタイムラプス撮影が可能な SpinSR10 および精細に撮影可能な N-SIM、さらに LSM 880 with Airyscan を用いた。

(5) 先天性骨系統疾患の患者由来細胞樹立

大阪大学歯学部附属病院・小児歯科を受診した硬組織に異常のある先天性骨系統疾患患者の抜去歯より歯根膜を単離し、初代培養を行った。

4. 研究成果

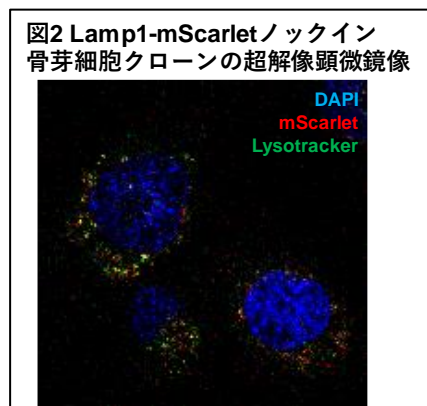
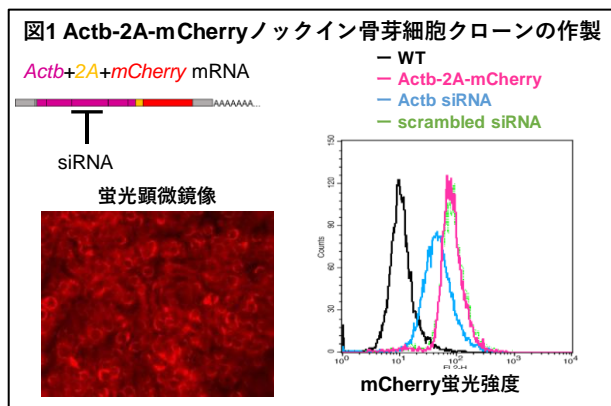
(1) CRISPR-Cas9 を用いたオルガネラ蛍光標識ノックイン骨芽細胞クローンの作製

① Actb-2A-mCherry ノックイン骨芽細胞の作製

マウス骨芽細胞に *Actb* 遺伝子に対する gRNA、Cas9、2A ペプチドおよび mCherry を含むドナーベクターをトランスフェクションしたところ、20%程度の細胞が mCherry を発現しており、高効率でノックイン細胞が得られた。これらの細胞をシングルセルソーティングによりクローン化した。さらに *Actb* に対する siRNA にて、蛍光タンパク質の発現が一過性に低下することから、ノックインが機能していることが確認された (図 1)。

② *Lamp1*、*Sec61*、*Tomm20*-mScarlet ノックイン骨芽細胞の作製

同様にノックイン細胞クローンを作製し、超解像顕微鏡にてその発現局在が、オルガネラ染色と一致していることが確認された (図 2)。



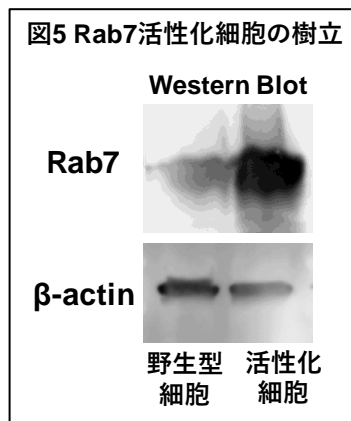
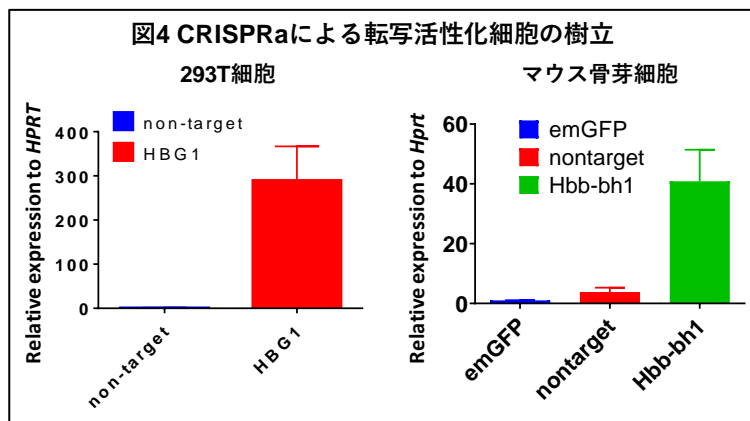
(2) CRISPR-Cas9 を用いたオルガネラ相互作用関連分子ノックアウト細胞クローンの作製

ミトコンドリア-リソソーム相互作用に関わる遺伝子群については、その時間に影響を及ぼすとこれまでに報告のある遺伝子 4 つについて、CRISPR/Cas9 によるノックアウト細胞の作製を行った (図 3)。うち 3 遺伝子についてはノックアウト細胞クローンを複数樹立し、genotyping を行い、ストックを作製した。1 遺伝子については、2 度作製を試みたものの、2 度ともに細胞が増殖せず、細胞の生存に必須の遺伝子である可能性が示唆された。



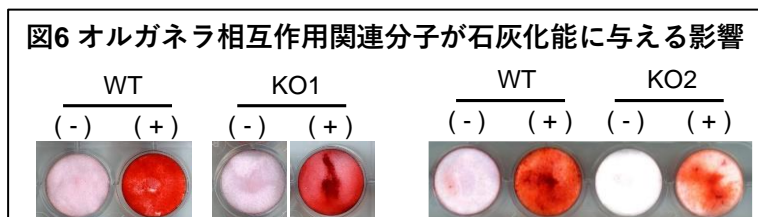
(3) CRISPR-Cas9 を用いたオルガネラ相互作用関連分子活性化細胞の作製

293T 細胞およびマウス骨芽細胞に CRISPR-dCas9-VP64、MS2-P65-HSF1、さらに Golden Gate Reaction を用いて作製した *HBB* 遺伝子および *Hbb-bh1* をターゲットとした sgRNA (MS2) の合計 3 つのプラスミドベクターをトランスフェクションしたところ、コントロールの配列もしくは GFP プラスミドをトランスフェクションした群と比較して、それぞれ 300 倍および 40 倍の mRNA 発現が上昇した (図 4)。さらにウイルスベクターを用いてミトコンドリア-リソソーム相互作用に関わる遺伝子の転写活性化細胞を作製した (図 5)。



(4) リソソーム-ミトコンドリア相互作用関連分子が石灰化過程に及ぼす影響の検討

超解像顕微鏡で観察することにより、目的通りの発現局在を確認した。同細胞を石灰化誘導培地にて培養し、超解像顕微鏡で観察したところ、ミトコンドリア-リソソーム相互作用が増加していることが示唆された。ミトコンドリア-リソソーム相互作用に関わる遺伝子群について、ノックアウト細胞クローンおよび CRISPRa 法により内在性の発現を活性化した細胞を複製し、これらの細胞を石灰化誘導培地で培養したところ、2 遺伝子については石灰化の程度に大きな変化が見られ、ミトコンドリア-リソソーム相互作用が石灰化初期過程に関与している可能性が強く示唆された (図 6)。



(5) 先天性骨系統疾患の患者由来細胞樹立

同意を得られた先天性骨系統疾患患者より、抜去した乳歯の提供を受け、歯根膜組織より初代培養細胞を多数樹立した。外来で術野をよく消毒した上で抜去し、アムホテリシン含有 PBS で洗浄後、静置培養するプロトコルを確立した。自然脱落した乳歯からの細胞単離は困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueda Tsugumi, Iwayama Tomoaki, Tomita Kiwako, Matsumoto Shuji, Iwashita Mizuho, Bhongsatiern Phan, Sakashita Hiromi, Fujihara Chiharu, Takedachi Masahide, Murakami Shinya	4. 巻 11
2. 論文標題 Zbp1-positive cells are osteogenic progenitors in periodontal ligament	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87016-1	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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 T. Iwayama
2. 発表標題 Role of osteoblastic lysosome in mineralization
3. 学会等名 Japan Bone Academy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Iwayama T, Murakami S
2. 発表標題 Analyzing matrix vesicles in mineral-forming cells
3. 学会等名 OKINAWA COLLOIDS 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019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	村上 伸也 (Murakami Shinya) (70239490)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山下 元三 (Yamashita Motozo) (90524984)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	
研究分担者	仲野 和彦 (Nakano Kazuhiko) (00379083)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	大川 玲奈 (Okawa Rena) (80437384)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	

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