

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K11050
研究課題名(和文) 軟骨代謝機能に及ぼす亜鉛シグナルの役割解明

研究課題名(英文) The role of Zip10 during skeletogenesis

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：従来より亜鉛の代謝異常が骨格成長異常や老化に関わる事が示唆されているが、その詳細は不明である。本研究は、骨格成長における亜鉛の代謝異常がおよぼす影響について解析を行った。解析には、Cre-loxPシステムによる軟骨特異的ZIP10(亜鉛トランスポーター)欠損マウスを作製し、ZIP10が骨格形成に必須であることが明らかとなった。さらに、次世代シーケンサーを用いて発現遺伝子解析を行い、野生型と欠損マウス両者間で発現差異のある遺伝子の網羅的に解析し、ZIP10依存性に変動する遺伝子群の抽出を行なった。本研究より得られた知見は亜鉛を標的とした新しい関節障害の治療法の開発に役立つ事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Zinc deficiency during development causes severe skeletal defects including deformity and a decrease in bone mass. However, the underlying molecular mechanisms have remained unclear. The aim of this study is to investigate the role of zinc transporter ZIP10, an SLC39 family member during skeletogenesis. We generated bone- and cartilage-specific ZIP10 conditional knockout (Zip10-ckO) mice using Cre/loxP system. Zip10-ckO embryos (E16.5-17.5) showed dwarfisms with short limbs, narrow chest space, and deformation of calvaria with decreasing calcification. These results suggest that ZIP10 is essential for skeletogenesis during embryonic development and that ZIP10 plays important roles in the regulation of cell viability/survival and substance transport in skeletal cells, likely via zinc homeostasis.

研究分野：細胞分子機能病理学

キーワード：軟骨 骨格形成 細胞・組織 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨軟骨代謝機構に Wnt/ β -Catenin シグナルが必須である。

関節軟骨(または硝子軟骨)は、表層を覆う数層の扁平な細胞「表層細胞」と深層の硝子軟骨から構成される。申請者はこれまでに軟骨特異的な遺伝子組換えマウスの解析から、四肢の骨格形成や、関節の形成、さらに関節表層細胞の維持と関節疾患の病態発現に Wnt/ β -Catenin シグナルが必須であることを明らかにしてきた。しかし、骨軟骨代謝機構においては複数の重要なシグナル経路が存在し、異なるシグナルがどのようにして相互作用についての詳細は不明である。

(2) 骨格成長不全の原因の1つに亜鉛欠乏症がある。

亜鉛が欠乏すると、様々な炎症や味覚障害、骨格の成長不全が生じることから病態関連因子として亜鉛シグナルが作用することが示唆されているが、骨格成長における亜鉛シグナルの生理的意義はまだ十分に理解されていない。必須微量元素の亜鉛は、様々な酵素や転写調節因子の補酵素として作用する。亜鉛の恒常性は亜鉛輸送体(トランスポーター)によって制御され、それらが統御する亜鉛イオンはシグナル因子(亜鉛シグナル)として機能する。

2. 研究の目的

本研究課題では、亜鉛シグナルという新たな概念に着目し、関節表層細胞の機能維持に重要な Wnt/ β -Catenin シグナルなどの既知の制御機構とどのように相互作用するのか解析して、関節軟骨の再生と修復機構のさらなる理解を目指し、軟骨代謝機能に及ぼす亜鉛シグナルの役割解明を目的とした。

3. 研究の方法

骨・軟骨特異的な ZIP10 欠損マウスの作製と解析を行った。

- 1) 胎生期から経時的に組織を採取し、whole mount にて骨格標本の作製と HE 染色、骨軟骨染色を行った。
- 2) ZIP10 欠損した骨芽細胞や軟骨細胞、表層細胞における網羅的な遺伝子発現解析を RNA-sequence 法を用いて行った。
- 3) 細胞増殖能・細胞死などの機能解析：
BrdU でのラベリング法、PCNA 染色法、細胞死は TUNEL 法、in situ hybridization 法による遺伝子の発現解析と免疫組織化学的に蛋白発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 骨軟骨成長に亜鉛の恒常性の維持が必須である。

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た(図1)。

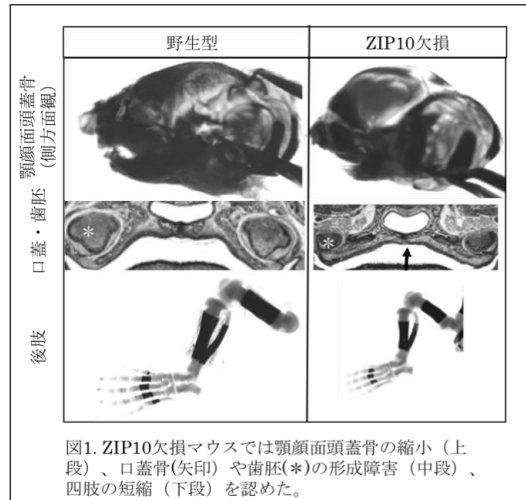


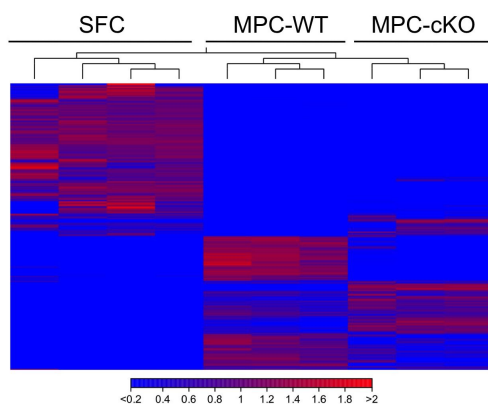
図1. ZIP10欠損マウスでは顎顔面頭蓋骨の縮小(上段)、口蓋骨(矢印)や歯胚(*)の形成障害(中段)、四肢の短縮(下段)を認めた。

骨および軟骨特異的な ZIP10 欠損マウスはいずれも出生率が低く、特に骨特異的な ZIP10 欠損マウスは出生時まで死亡した。骨特異的な ZIP10 欠損マウス胎生 17.5 日齢では、四肢の長さの短縮と太さの縮小、頭蓋骨の変形と骨化不全を呈した。また、肩甲骨の形成不全や、肋骨の変形を認めた。軟骨特異的な ZIP10 欠損マウスは胎生 16.5 日齢で四肢の短縮がみられ、肩甲骨の形成不全と胸腔の狭小化がみられた。

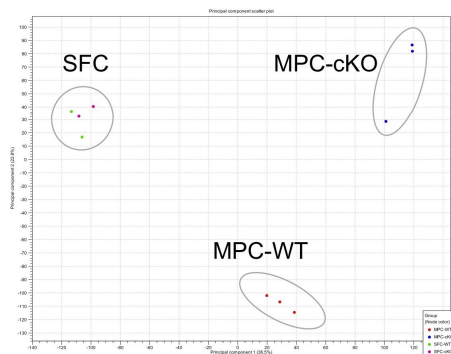
(2) ZIP10 が直接的あるいは間接的に細胞の生存に関わる

次世代シーケンス法を用いた Gene Ontology (GO) 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こと、さらに、細胞死やアポトーシスに関わる遺伝子群の変動が高く、ZIP10 が直接的あるいは間接的に細胞の生存に関わることを見いだした(図 a, b)。

本実験結果は亜鉛および ZIP10 が骨格形成に必須であることを示している。亜鉛は高分子タンパク質に結合して種々の代謝に関わることや、ZIP が亜鉛の細胞内輸送に関与することから、細胞外基質の変化や細胞内シグナルの変化が ZIP10 欠損マウスでみられた骨軟骨代謝異常を誘導したのではないかと推察される。



(a) Heat map解析



(b) PCA分析

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 8 件)

- [1] Yasuhara R., Usami Y, Enomoto-Iwamoto M., Wnt Signaling in Cartilage Development. *Encyclopedia of Bone Biology*. 査読有 (2018) *in press*.
- [2] (総説) 安原理佳、美島健二. 骨恒常性の維持と破綻における β -catenin 経路の役割. *昭和学術雑誌* 査読有 第 77 巻 5 号 501-507 項(2017)
- [3] Yasuhara R. (5/7 番目). Cryopreservation Method for the Effective Collection of Dental Pulp Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 査読有 23(5):251-261. (2017) doi:10.1089/ten.TEC.2016.0519.
- [4] Yasuhara R. (2/10 番目). Extracellular matrix loss in chondrocytes after exposure to interleukin-1 in NADPH oxidase-dependent manner. *Cell Tissue Res*. 査読有 368(1):135-144. (2017) doi:10.1007/s00441-016-2551-2.
- [5] Yasuhara R. (6/14 番目) Alpha 5 Integrin Mediates Osteoarthritic Changes in Mouse Knee Joints. *PLoS One*. 査読有 9;11(6):e0156783. (2017)

- [6] Yasuhara R. (1/9 番目) The β -catenin signaling pathway induces aggressive potential in breast cancer by up-regulating the chemokine CCL5. *Exp Cell Res*. 査読有 338(1):22-31. (2015)
- [7] Irié T. (2/9 番目), Yasuhara R. (4/9 番目), Mishima K. (9/9 番目). ANGPTL4 regulates the metastatic potential of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 査読有 44(2):126-33. (2015)
- [8] Irié T. (2/10 番目), Yasuhara R. (4/10 番目), Mishima K. (10/10 番目) Potential role of hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 査読有 44(2):115-25. (2015)

〔学会発表〕(計 14 件)

- [1.] 安原理佳(1/8 番目). 骨格形成過程における亜鉛トランスポーターの役割. 第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会 ConBio2017 神戸 12/6-9, 2017.
- [2.] 安原理佳(1/3 番目):マウス唾液腺由来筋上皮細胞は唾液腺組織幹細胞/前駆細胞としての性質を有する. 第 62 回日本唾液腺学会学術集会 海外発表支援基金報告講演東京 11/25, 2017
- [3.] Rika Yasuhara (1/4 番目). Myoepithelial cells are one of stem/progenitor cells in mouse salivary gland. Japanese Association for Dental Research(JADR), Tokyo, 11/18-19, 2017
- [4.] 安原理佳(1/4 番目). 筋上皮細胞可視化マウスを用いた唾液腺由来筋上皮細胞の単離と局在解析. 第 28 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会埼玉 8/23-25, 2017
- [5.] 安原理佳: 骨転移性乳癌の発症メカニズムの解明. 第 338 回昭和大学学術会研究紹介講演東京 6/24, 2017
- [6.] Rika Yasuhara (1/5 番目). Mouse salivary gland-derived myoepithelial cells shows stem/progenitor cell properties in vitro. International Society for Stem Cell Research Boston, MA, 6/14-17, 2017.
- [7.] 安原理佳(1/7 番目). 脂肪幹細胞を活用した唾液腺再生メカニズムの解析. 第 106 回日本病理学会総会, 東京 4/27-29, 2017.
- [8.] 安原理佳(4/8 番目). 唾液腺初期発生における Sox9 の機能解析. 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台, 3/7-9, 2017
- [9.] 安原理佳(1/6 番目):唾液腺由来筋上皮細胞の単離と性質解析 Isolation and characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第 61 回日本唾液腺学会学術集会, 2016 年 12 月 3 日
- [10.] 安原理佳(1/6 番目): Isolation and characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30-12 月 2 日, 横浜.
- [11.] 安原理佳、深田俊幸、岩本資己、田中準一、川嶋章弘、入江太朗、関沢明彦、美島健

二:骨軟骨代謝調節機構における亜鉛トランスポーターの役割. 第 2 回骨免疫学会, 2016年7月6-8日, 沖縄

[12.] Yasuhara R(1/6 番目):唾液腺由来筋上皮細胞の単離と性質解析 Characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第105回日本病理学会総会, 2016年5月12-14日, 仙台

[13.] 安原理佳(1/6 番目): 唾液腺由来筋上皮細胞の性質解析 Characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学学会大会, 2015年12月1-4日, 神戸.

[14.] Yasuhara R(1/7 番目): The beta-Catenin signaling pathway induces aggressive potential through CCL5 in breast cancer. 第104回日本病理学会, 2015年4月30日-5月2日, 名古屋

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

深田 俊幸 (FUKADA, Toshiyuki)
徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号: 70373363

入江 太朗 (IRIE, Tarou)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号: 00317570

美島 健二 (MISHIMA, Kenji)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号: 50275343

(4)研究協力者

岩本 資己 (IWAMOTO, Motomi)
メリーランド大学・整形外科・准教授