

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01793

研究課題名(和文)ポリリン酸によって骨芽細胞の石灰化が促進する情報伝達分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of the cellular signaling by which inorganic polyphosphate promotes calcification on osteoblastic cell

研究代表者

堤 香織 (Tsutsumi, Kaori)

北海道大学・保健科学研究院・助教

研究者番号：80344505

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)：ポリリン酸がマウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1の石灰化を促進する分子機構を明らかにすることを目的とした。アリザリンレッド染色により平均鎖長60のポリリン酸が最も石灰化促進効果が高いことがわかった。ポリリン酸で処理した細胞内のATP濃度の低下し、ミトコンドリアの膜電位が低下した。また、ADP/ATP比が高かった。ミトコンドリアの分裂と融合には変化はなかった。ポリリン酸による石灰化促進効果は、細胞内ATP濃度とミトコンドリア膜電位の低下が一要因である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inorganic polyphosphate (polyP) is a linear polymer containing tens to hundreds of orthophosphate residues and found in all living organisms from bacteria to mammals. In the present study, we examined the molecular mechanism of polyP to promote calcification on MC3T3-E1 osteoblastic cells. Cells cultured with polyP were strongly stained with Alizarin red. Long-chain length of polyP was the most effective chain length. PolyP-treated cells induced the depletion of cellular ATP contents accompany with ADP conversion though treatment with polyP did not affect cell growth. In the polyP-treated cells, the mitochondria was swollen with low dense observed in electron microscopy. Mitochondrial membrane potential was significantly decreased in polyP-treated cells. These results suggested that the depletion of intracellular ATP and the decrease in mitochondrial membrane potential by polyP treatment would be a trigger to promote a cellular calcification.

研究分野：分子生物学

キーワード：ポリリン酸 石灰化 ATP ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

本研究では、生体内においてポリリン酸 (図 1) がどのようなメカニズムで骨再生を促すのか、そのトリガー分子を探索する。ポリリン酸は、生体内の様々な細胞や器官に存在する生体内高分子 (図 1) であるが、その機能の多くは未だに不明な点が多い。しかしながら、近年は形質細胞における血液凝固促進機能や星状グリア細胞の信号伝達機能、多発性骨髄腫におけるアポトーシス誘導作用などの注目すべき作用が明らかとなってきた。

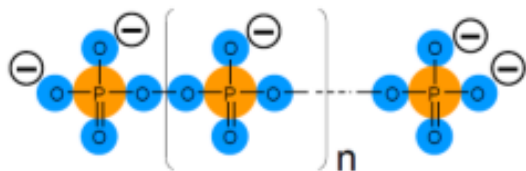


図 1 ポリリン酸の構造

一方、骨再生医療は、歯周病によって失った歯槽骨の再生や、疾病によって欠損した骨の再生、あるいは、高齢によって失った膝軟骨の再生など、失われた骨を修復、再生する医療であり、私たちの生活の質を維持する上で重要であり、社会からのニーズが大きい。近年は、人工多能性幹 (iPS) 細胞への期待が高まり、将来的な臨床利用に向けて国内外で研究が進められているところである。申請者らは、現在多くの医療機関で採用されている自己細胞を利用した移植の補助分子としてのポリリン酸の利用に着目している。

我々はこれまでに、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 をポリリン酸によって処理をすると、オステオカルシンやオステオポンチンの発現上昇し、それによって石灰化が促進されることを生化学的、分子生物学的に観察し報告しており (J. Dent. Res. 2004)、また、ポリリン酸によって処理されたマウス骨芽細胞様細胞の変化を電子顕微鏡によって形態学的にも観察し、ポリリン酸で処理した細胞では発達した粗面小胞体やゴルジ装置が観察され、細胞が骨形成の誘導段階に入っていることを示唆し報告した (PLOS ONE, 2014)。本研究では、組織そのものが保有する骨芽細胞の骨への分化促進剤としてのポリリン酸の効果に期待する。特に、ポリリン酸は、元来生体内に存在する高分子化合物であるため、生体への親和性、安全性も高い。

2. 研究の目的

ポリリン酸は無機リン酸が数個から数千個結合した生体内高分子であり (図 1)、ヒトを含むほ乳類の様々な臓器、細胞内器官に局在する。近年、ポリリン酸による血液凝固の誘導、脳の星状グリア細胞の信号の伝達を仲介する役割、形質細胞や骨髄腫のアポトーシ

ス誘導作用、骨再生効果などが報告されている。骨再生効果は、動物実験によっても既に確認されており臨床への応用が期待されている。しかしながら、詳細な分子メカニズムについては未だ探索の過程である。本研究では、ポリリン酸が骨再生を促すシグナルのトリガー分子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

ポリリン酸による骨芽細胞石灰化促進効果は、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を用いて観察した。ポリリン酸による処理を行うにあたっては、事前に 0.5% の血清を含む培養培地にて 12 時間の前処理を行った。ポリリン酸鎖長による石灰化促進効果の違いは、平均ポリリン酸鎖長 14、60、130 の 3 種類を用いてアリザリンレッド染色によって評価した。細胞にポリリン酸を添加することによる細胞内 ATP 量の変化を CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega 社) を用いた発光量の比較によって測定した。ポリリン酸処理によるミトコンドリア膜電位の変化の観察と生きた細胞のミトコンドリアの細胞染色は蛍光指示薬 Mitotracker (Invitrogen 社) を使用した。ポリリン酸処理後の細胞内 ADP/ATP 比の変化の観察には、ADP/ATP Ratio Assay Kit (Bioluminescent 社) を使用した。細胞の蛍光観察には、蛍光顕微鏡 BZ-9000 (キーエンス社製) を使用した。また、全ての実験におけるポリリン酸処理に対するコントロールとしてリン酸ナトリウム (Na-phosphate, pH6.8) を使用した。

4. 研究成果

ポリリン酸による石灰化促進効果に有効なポリリン酸鎖長について選別し、平均ポリリン酸鎖長 14、60、130 の 3 種類を用いて骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 に対する石灰化促進効果をアリザリンレッド染色によって観察したところ、60>14>130 の順で促進効果が高い

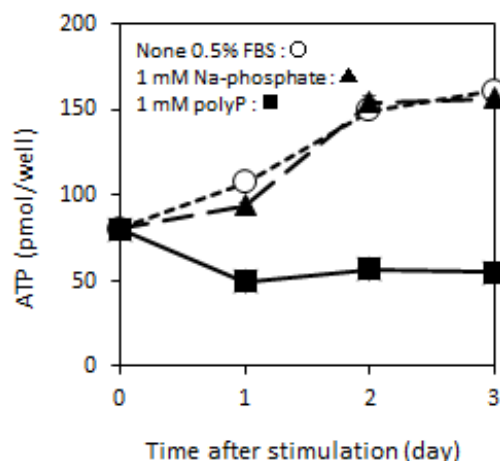


図 2 ポリリン酸処理後の細胞内 ATP 量の変化

ことがわかった。よって、本研究では平均鎖長 60 のポリリン酸を使用することとした。ポリリン酸処理による細胞内 ATP 濃度変化を観察したところ、ポリリン酸による細胞増殖への影響はみられなかったにも関わらず、ポリリン酸処理後 10 分でコントロールと比べて有意な細胞内 ATP 濃度の低下が観察され、ポリリン酸が細胞内ヌクレオチド代謝に影響を及ぼしている可能性が示唆された(図 2)。

また、ミトコンドリアの膜電位依存的にミトコンドリアを染色することの可能な蛍光指示薬 Mitotracker によってポリリン酸処理細胞を染色したところ、膜電位がコントロール群と比較して優位に低下していることがわかった(図 3)。これは、研究者らによる電子顕微鏡的形態観察におけるポリリン酸処理細胞のミトコンドリアの膨潤と一致する結果であった。

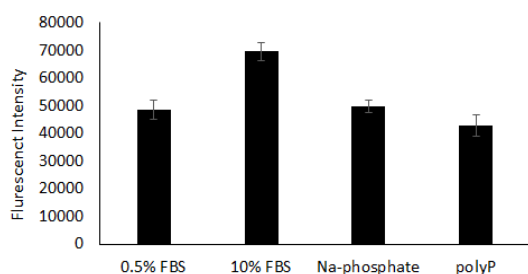


図 3 ポリリン酸処理後のミトコンドリア膜電位の変化

ミトコンドリアの分裂と融合の存在比を 4 段階で評価を行ったがポリリン酸処理細胞とコントロール群に大きな差異は認められなかった。ATP 含有量に対する ADP/含有量の比について検討したところ、ポリリン酸で処理した細胞内の ADP/ATP 比は処理後 3 日目でコントロール群と比較して優位に高く、細胞内 ATP の ADP への変換が細胞内 ATP 量の低下の要因の一つと考えられた(図 4)。

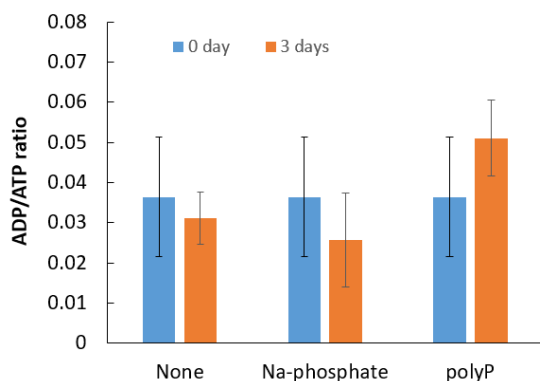


図 4 ポリリン酸処理後の細胞内 ADP/ATP 比の変化

マウス骨芽細胞様細胞株に対するポリリン酸石灰化促進効果は、ポリリン酸処理によって細胞内 ATP 濃度が低下しミトコンドリア膜電位が低下することが石灰化促進の一要因である可能性が示唆された。

以上の結果より、ポリリン酸によるマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に対する石灰化促進効果は、ポリリン酸処理による ADP 変換を伴う細胞内 ATP 濃度の低下によるミトコンドリア膜電位の低下、膨潤が一要因となることが明らかとなった。

本研究課題により、ポリリン酸によって骨芽細胞の石灰化が促進する情報伝達分子メカニズムの一旦を解明することができた。今後、更に詳細について明らかにしたい。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Kaori Tsutsumi, Tatsuya Sasase, Nagahito Saito, Toshikazu Shiba.

PolyP promotes cellular calcification in association with ATP depletion and mitochondrial swelling.

9th World Congress on Targeting Mitochondria., Berlin, Germany. 2018

[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 堤 香織 (ツツミ カオリ)
北海道大学・大学院保健科学研究所・助教
研究者番号：80344505

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()