

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09303

研究課題名(和文)腎不全に伴う病的石灰化における基質小胞のプロファイリング

研究課題名(英文)Profiling of Matrix Vesicles obtained from cells in various differentiation states.

研究代表者

伊藤 俊治 (Itoh, Shunji)

関西医療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：50275351

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)：Ca沈着は骨などの形成に必須で、また異所性石灰化は多くの疾患で見られる現象である。しかしその仕組みは正常な石灰化と異所性石灰化のメカニズムが同一かという基本的な点すら未知である。又、石灰化装置である基質小胞(MV)がどんな物質構成なのか、各硬組織での共通性についても議論がある状態である。本研究では、MVの石灰化に関する分子を同定、機能を解明するため、軟骨細胞で研究した。分化した軟骨細胞は無機リンにより石灰化するが、MVは未分化な状態でも形成されていた。また軟骨細胞を関節軟骨様に分化させたところ、MV形成は見られたが石灰化能は見られなかった。これらのMVを比較し石灰化に必要な分子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Calcification is an essential process for the formation of hard tissues. And ectopic calcification causes many diseases. However, the mechanism of calcification has been not cleared yet. It has been unknown whether the mechanisms of normal and ectopic calcification are identical. To identify molecules constituting the MV and elucidate the calcification mechanism, we studied using ATDC5 cells. The calcification of ATDC5 in the differentiated state is stimulated by the addition of inorganic phosphorus (Pi). Our results showed that the MVs were formed in the undifferentiated state. It was suggested that ATDC5 cells formed both MV without calcification ability and MV with calcification ability, depend on their differentiation state. Moreover, when ATDC5 cells differentiating to the articular cartilage-like cell, MV formation was observed but their calcification was not observed. We compared the MVs of these differentiated states and identified molecules necessary for the calcification.

研究分野：分子生物学

キーワード：基質小胞 異所性石灰化

1. 研究開始当初の背景

組織の石灰化は正常の発生においても骨や歯などの形成・維持の過程で起こっているが、そこには基質小胞によるヒドロキシアパタイト形成という共通の仕組みがあるとされている。

基質小胞は細胞外に放出される直径 20～200nm ほどの小胞で、間質に沈着した後、その内部でヒドロキシアパタイト結晶が成長し、組織石灰化の核になると考えられている。基質小胞は最初軟骨で発見されたが、骨芽細胞や象牙芽細胞など幅広く石灰化組織へ分布していることが見出されている。また病的な異所性石灰化でも基質小胞の関与が考えられており、例えば透析患者で認められる動脈中膜の石灰化では、高リン血症が血管平滑筋の骨芽細胞様変化を引き起こし、基質小胞が放出されて石灰化を引き起こす(Reviewed in *Frontiers in Bioscience*,16: 2812-2902, 2011)また腎性骨症でも基質小胞の機能変化が起こって、骨石灰化異常を来し骨線維症を引き起こすことが考えられる。こういった各組織間及び病的な環境における基質小胞の構成分子、石灰化機能の変化等については、どの分子が基質小胞で石灰化に関して機能しているかについてさえ未だ確定されておらず、基質小胞の機能や構成分子の違いについても詳細は明らかでない。

2. 研究の目的

腎不全に伴う腎性骨症や動脈などの異所性石灰化については多くの研究があるが、これらの石灰化の異常に関して、「基質小胞によるヒドロキシアパタイト結晶の制御が、腎性骨症における骨形成および血管石灰化に関係しているがそれがどのような分子メカニズムか」、未だ詳細は不明である。骨などでの正常な石灰化では基質小胞と呼ばれる細胞外小胞による石灰化調整(石灰化防御機構も含めて)がされていることは判っているが、その分子機構の詳細は未だに不明である。また病的石灰化をきたす環境下での基質小胞そのもの(正常の基質小胞と同じ基質小胞なのかどうか)についても解明されていない。本研究では正常な石灰化組織と病的石灰化組織の産生する基質小胞の分子構成・機能の違いについて検討し、基質小胞を介した石灰化を制御する分子を同定、その制御機構を解明することにより、病的石灰化の制御をめざして研究を行った。

3. 研究の方法

「基質小胞の分子構成は生体環境によって変化し、それによって石灰化能が調節される」という作業仮説を検証するために、

石灰化に関連した各種の組織・細胞の基質小胞のプロファイリングをプロテオーム解析、RNA アレイ解析等の手法を用いて網羅的に行った。

次に腎性骨症、動脈石灰化のような病的石

灰化を示す動物モデルから得た組織・細胞などを用いてと同様のプロファイリングを行い、体内環境変化に伴う石灰化能の変化について検討する。

の段階に従って研究を行う。

4. 研究成果

研究は当初計画通り、まず培養細胞を用いた基質小胞の単離、構成要素の分析、石灰化能との関連の検討により予備研究の検証と確認を行い、次いで動物個体を用いた研究を並行して行った。

(1) 培養細胞を用いた研究成果

前述の通り、生理的な石灰化においては基質小胞が関与していることが知られているが、その構成分子や具体的な石灰化メカニズムは明らかではない。

本研究では生理的に石灰化する状態としない状態の両方の生理状態を持つ軟骨細胞に着目して研究を行った。内軟骨性骨化で形成される軟骨は石灰化を示すが、関節軟骨にはそのような石灰化は見られない。そこで、この石灰化能の違いが、基質小胞の産生の違いによるものであろうと考え、検討を行った。

研究代表者らは、これまでの研究により株化培養細胞 ATDC5 を用いて、成長軟骨様細胞に分化させる系と関節軟骨様細胞に分化させる系、また培養液中に無機リンを添加することにより、石灰化を誘導する系を確立していた(図1)ので、この実験系を用いて、各分化条件での基質小胞の産生について検討した。

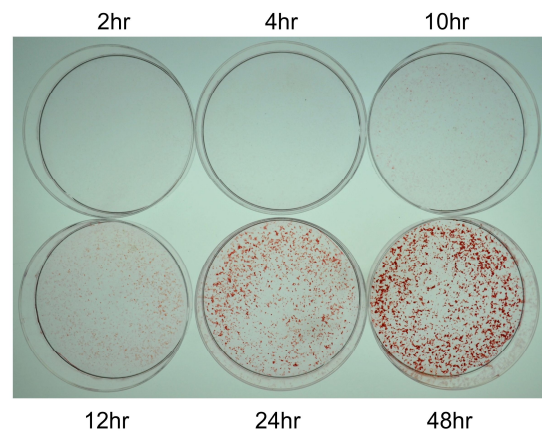


図1 リン添加後の ATDC5 細胞の石灰化の経時的変化。Arizarin Red 染色によって石灰化を示している。

予想に反して、基質小胞の産生は、分化状態や分化方向に関わらず、一定であった(図2)。そこで、石灰化能の違いは基質小胞の構成分子の違いであろうと考えて、各種の検討を行った。

予備実験も含め、様々な分化状態の細胞を用いた cDNA アレイ解析を試みたが、分化状態の違いや経時的变化の影響が大きく、安定的な結果を見いだすことは難しいことが判った。そこで二次元電気泳動による蛋白質の分析を行った結果、いくつかの変化を見いだ

すことが出来た。

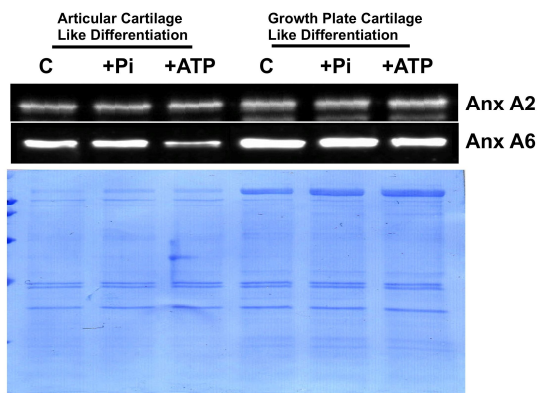


図 2 分化状態・石灰化誘導の違いによる基質小胞産生の変動。培養上清中の基質小胞を単離後、基質小胞マーカーに対する抗体でウェスタンブロットしている。下段は C B B 染色。

さらにいくつかの検討を行った結果、ATDC5 細胞において、その石灰化能と平行に変化する基質小胞上の分子として CD9 蛋白質を同定するに至った。そこで、以後は主に CD9 分子について検討を行った。

検討の結果、CD9 は関節軟骨様に分化誘導した ATDC5 細胞の培養上清から単離した基質小胞にはほとんど含有されていないが、成長軟骨様に分化誘導したものの培養上清中の基質小胞には多量に含有されていた (図 3)。

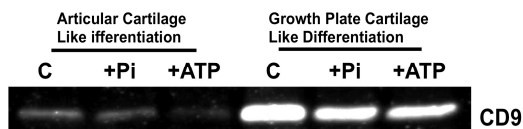


図 3 CD9 蛋白質の分化状態依存性の発現。培養上清中の基質小胞を単離後、CD9 に対する抗体でウェスタンブロットしている。

そこで次に CD9 発現量の改変によって、ATDC5 細胞の石灰化能がどのような影響を受けるかについて検討した。

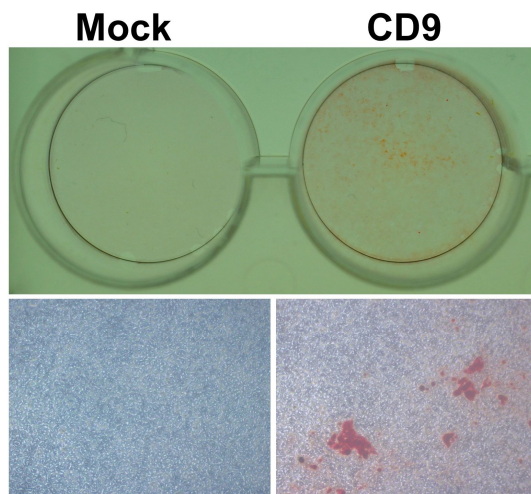


図 4 CD9 の強制発現と石灰化

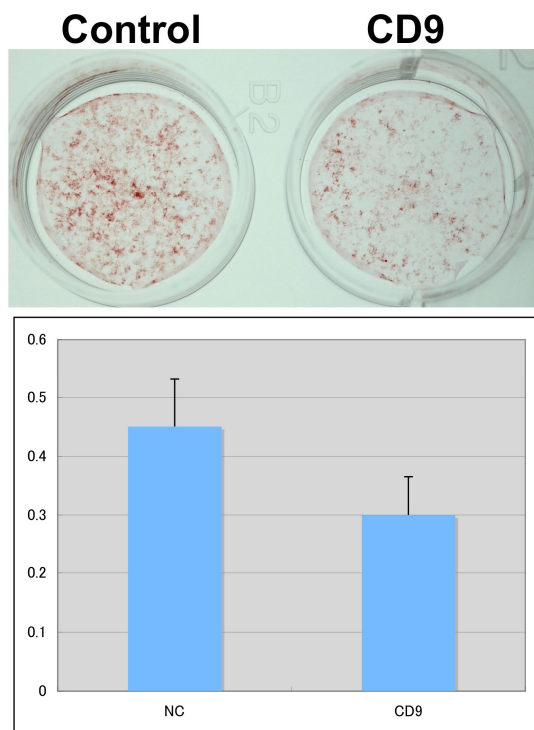


図 5 CD9 の発現抑制と石灰化

ATDC5 細胞で CD9 遺伝子を強制発現させると、無機リンを負荷しなくても石灰化が見られるようになり (図 4)、一方 CD9 の発現を RNAi 法により抑制すると、石灰化は弱まった (図 5)。

なお、CD9 の mRNA 発現についても検討を行ったが、蛋白量と違い、mRNA 量には基質小胞上の蛋白質量のような変動は見られなかった。そこで ATDC5 細胞をプロテオソーム阻害剤で処理する実験を試みたところ、分化条件による CD9 の変動が消失した (data not shown)。このことから CD9 の変化は発現調節ではなく、turnover あるいは localization の制御である可能性を現在検討中である。

また基質小胞の単離にあたっては、主に超遠心法によって行ってきたが、解析を簡便化するために、exosome に用いられている沈殿分離法やフィルター法によって単離できないか、という検討も並行して行った。残念ながら、超遠心法と同じような結果を安定して得ることは成功していない。これは基質小胞を含む細胞外小胞はかなり多様な物性を持つ小胞が含まれており、実験条件が安定しなかったからであろうと考えている。

現在、培養軟骨細胞での成果を取りまとめ、論文投稿の準備中である。

(2) 動物個体を用いた実験結果

培養細胞を用いた実験結果から、CD9 蛋白質は、関節軟骨で作られる基質小胞に含まれて居らず、そのため関節軟骨は石灰化能が低下していることが考えられた。そこで実際に CD9 蛋白質の生体内局在について検討した。

胎齢 20 日前後のマウス胎児の指節骨関節をモデルとし、CD9 に対する免疫組織科学的解析を行ったところ、予想通りに軟骨原基末端の関節軟骨領域には CD9 のシグナルが認められなかった(図 6)。

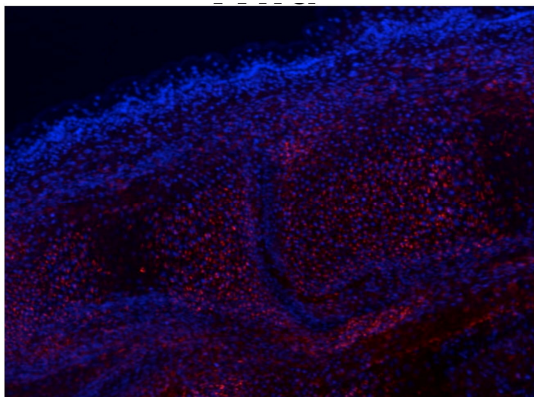


図 6 抗 CD9 抗体によるマウス指節骨関節の免疫染色

そこで、この基質小胞石灰化のメカニズムが生物個体内でも働いていることについての検討を行った。

具体的にはモデル動物に高リン血症を誘発し、それによって惹起する異所性石灰化とそれに伴って生成される基質小胞を単離して、その構成分子を検討することを試みた。

当初、健常マウスで 5/6 腎摘を行ったりそれに加えて高リン含有餌を給餌したりして条件検討を行ったが、期待したほどには血中リンは上昇せず、異所性石灰化もほとんど観察されなかった。そのため、遺伝子異常マウスの使用を試みた。研究グループで保有している副甲状腺由来遺伝子 psp の欠損マウスについて検討したところ、雄性不妊とともに、中年期以降に強い腎機能異常が観察された。そこで、この psp null マウスに高リン含有餌を給餌して、血中のリン動態について調べた。残念ながら、この系においても血中リン濃度の上昇はあまり見られず、腎や動脈にも異所性の石灰化は観察されなかった。

また最近、亜鉛が腎臓結石の要因となるとの研究が報告された (Chi T et al. PLoS ONE 10(5):e0124150, 2015) ことから、並行して研究中の亜鉛負荷マウスでも同様の検討を行ってきたが、やはり異所性石灰化は観察されなかった。

現在、FGF23 シグナル伝達系の変異マウスを用いた実験を計画するとともに、血管平滑筋細胞の培養系での実験を企画している。

さらに本学で行われている中高年者の臨床検査データの分析に参加し、ヒトの異所性石灰化、とくに動脈石灰化に繋がる因子について探索中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

戸村多郎, 坂口俊二, 伊藤俊治, 宮井信行

中高年者の五臓スコアと臨床検査データによるコホート研究. 関西医療大学紀要, 11, 19-27, 2017

〔学会発表〕(計 6 件)

伊藤俊治 骨折治癒の分子メカニズム. 第 17 回日本スポーツ整復療法学会大会, 2015

伊藤俊治, 鍵弥朋子, 荒川裕也, 宇野誠, 早田荘, 椎崎和弘, 畑村育次 Psp 遺伝子の破壊は老齢マウスで腎臓の空胞化を引き起こす. 第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会 (BMB 2015) 2015

伊藤俊治, 鍵弥朋子, 荒川裕也, 畑村育次 新規精巢形成因子 Psp の欠損は精巢ヒストンのアセチル化に影響しアポトーシスを引き起こす. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016

伊藤俊治, 深澤洋滋, 荒川裕也, 紀平為子 低亜鉛が神経・筋に及ぼす影響のマウスを用いた予備的検討. 第 28 回日本微量元素学会学術集会, 2017

Yuya Arakawa, Shunji Itoh, Junko Kohmoto, Masaya Hironishi, Hidefumi Ito, Tamako Kihira MicroRNAs characteristic to the high incidence area of ALS in the Kii Peninsula. XXIII World Congress of Neurology 2017

伊藤俊治, 鍵弥朋子, 畑村育次 分化状態に依存した軟骨細胞の石灰化メカニズム ConBio2017 2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 俊治 (ITOH, Shunji)

関西医療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号: 50275351

(2) 研究分担者

畑村 育次 (HATAMURA, Ikuji)

関西医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号: 80336883

鍵弥 朋子 (KAGIYA, Tomoko)

関西医療大学・保健医療学部・助教

研究者番号: 50717650