

令和元年6月26日現在

機関番号：27501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10483

研究課題名(和文)骨形成を制御する新規分泌調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a novel secretion regulatory system to control bone formation

研究代表者

濱中 良志 (Hamanaka, Ryoji)

大分県立看護科学大学・看護学部・教授

研究者番号：60274750

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)：骨芽細胞レベルで、セクレターゼが骨形成を制御していることが、生体内においてもセクレターゼが骨形成に関与している可能性を検証することが今回の主な研究目的である。セクレターゼの遺伝子欠損マウス群を野生型のマウス群の生後のマウスの成長過程と比較したところ、遺伝子欠損マウス群が、野生型マウス群よりも有意に成長が遅延していることが観察された。成長過程の遅延は、下垂体での成長ホルモン放出ホルモン受容体の発現低下により、2次的に成長ホルモンの分泌が減少するためであることが判明した。セクレターゼは、下垂体における成長ホルモン放出ホルモン受容体発現の制御に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セクレターゼは、アミロイドの形成・沈着に関わり、アルツハイマー型認知症の原因遺伝子として認知されてきた。今回の研究で、マウスの下垂体という内分泌の臓器において、成長ホルモン放出ホルモン受容体の発現にも関与しており、セクレターゼが欠損すると、マウスの発育不全を引き起こすことが判明した。このことは、セクレターゼの新たな作用機序の可能性が示唆されるのみならず、セクレターゼを標的として、アルツハイマー型認知症の治療薬を開発する際に、事前に副作用の可能性を示唆し、より安全な治療薬の開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Based on the observation that beta-secretase is involved in bone formation in vitro, we investigated whether beta-secretase plays an important role in bone formation in vivo by using beta-secretase knock-out mice. We observed that knock-out mice grew slower than wild-type mice in terms of weight and height, which is caused by the lower serum level of growth hormone (GH). This GH lower level is turned out to be caused by lower expression level of GH-releasing hormone (GHRH) receptor in pituitary gland in knock-out mice. Together, it is suggested that beta-secretase is involved in the expression of GHRH receptor in pituitary gland.

研究分野：細胞生物学

キーワード：セクレターゼ 発育遅延 成長ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞による I 型コラーゲン (骨基質を構成する) やオステオカルシン (Ca^{2+} の沈着に重要) などの分泌は、骨形成に必須のプロセスである。しかしながら、虚血などのストレスによる骨形成の抑制機構については、不明な点が多い。申請者は、動脈硬化などによる虚血ストレスにより、骨芽細胞において、オステオカルシンや I 型コラーゲンなどの分泌タンパク質の分解が小胞体膜プロテアーゼであるセクレターゼで制御される新規分泌調節機構を見出し、この機構により骨形成が妨げられている可能性が示唆された。骨形成に関する培養細胞の実験では、これまで、マウスの骨芽細胞由来の MC3T3-E1 細胞が用いられてきたが、培養の条件により、骨細胞への分化が不安定であることが問題視されてきた。申請者らは、不安定性を克服するために、マウス頭蓋骨の骨芽細胞から、MN16 細胞を樹立し、骨細胞へ安定的に分化する系を確立した。更に、分担者の協力により、新規分解機構を制御するセクレターゼノックアウトマウスを作製した。

2. 研究の目的

上記のこれまでの研究成果を基に、本研究は、骨芽細胞の骨形成に関するまだ解明されていない基礎研究 (I 型コラーゲン・オステオカルシン等の分泌タンパク質の新規制御機構) を MN16 細胞とセクレターゼノックアウトマウスを用いて解析し、骨折に対する新しい治療法を確立するための基盤となる研究を行う。骨芽細胞レベルで、セクレターゼが骨形成を制御していることが、生体内においてもセクレターゼが骨形成に関与している可能性を今回の研究で検証することが主な目的である。

3. 研究の方法

新しい分泌タンパク質分解機構がどのように骨のリモデリングに関与するかを MN-16 細胞とセクレターゼノックアウトマウスを用いて以下のことを解析する。

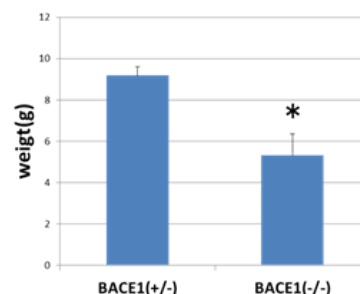
(1) MN-16 細胞からセクレターゼを CRISPA/CAS9 系でノックアウトし、ストレスによる分泌タンパクの低下を回復できるかを ELISA 法で確認する。

(2) 分泌タンパク質の低下が、新規の分解機構によるものかを検討するために、MN-16 細胞を ^{35}S -メチオニン/システインで合成されるタンパク質をラベルし、プレフェルジン A 存在下に経時的に培養し、可溶化させた後、各々の分泌タンパク質の抗体を用いて免疫沈降し、分解の有無を確認する。

(3) 野生型とセクレターゼノックアウトマウスのマウスの発育状態を観察し、骨に対する影響を比較検討する。

4. 研究成果

セクレターゼの遺伝子欠損マウス群をヘテロ型および野生型のマウス群の生後のマウスの成長過程を比較したところ、野生型とヘテロ型のマウスの成長速度において、ほとんど変化を認めなかった。よって、以降の実験では、遺伝子を有するヘテロ群と遺伝子欠損 (ホモ) 群で比較検討した。遺伝子欠損マウス



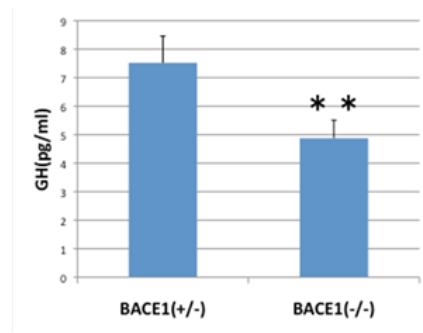
*: $p < 0.05$

図1: 4週齢のBACE1(+/-)雄マウス5匹とBACE1(-/-)雄マウス5匹の体重の比較

(ホモ)群が、セクレターゼ遺伝子を有するヘテロマウス群よりも有意に、身長・体重の発育・

成長が遅延していることが観察された(図1)。

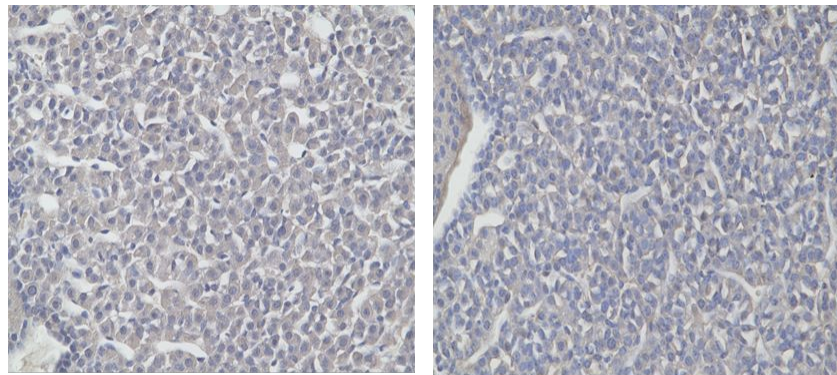
発育に関するホルモンである成長ホルモン(GH)の血中濃度に着目し、ELISA法でヘテロ群とホモ群で比較検討したところ、有意にホモ群のマウスの血中GH濃度が、ヘテロ群と比較して低下していた(図2)。更に、このホモ群でのGHの低下は、mRNAレベルによることが判明した。



** : p<0.01
図2: ELISAによる4週齢のBACE1(+/-)雄マウスとBACE1(-/-)雄マウスの血中GHの比較

下垂体でのGHRH受容体の発現をヘテロ群とホモ群で、免疫染色法にて比較した。セクレターゼを有するヘテロ群の下垂体と比較して、セクレターゼ遺伝子を欠損しているホモ群の下垂体では、GHRH受容体の発現が有意に低下していた(図3)。

以上のことより、セクレターゼは、下垂体におけるGHRH受容体発現の制御に関与していることが示唆された。



BACE(+/-)

BACE(-/-)

図3: BACE1(+/-)とBACE1(-/-)雄マウスの下垂体でのGHRH受容体免疫染色写真(×40)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yano H, Hamanaka R, Nakamura-Ota M, Zhang JJ, Matsuo N, Yoshioka H. Regulation of type I collagen expression by microRNA-29 following ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys.* 57, 41-54 (2018) 査読有

Hijiya N, Shibata T, Daa T, Hamanaka R, Uchida T, Matsuura K, Tsukamoto Y, Nakada C, Iha H, Inomata M, Moriyama M.

Overexpression of cannabinoid receptor 1 in esophageal squamous cell carcinoma is correlated with metastasis to lymph nodes and distant organs, and poor prognosis.

Pathol Int. 67, 83-90, (2017) 査読有

Tsukamoto Y, Fumoto S, Noguchi T, Yanagihara K, Hirashita Y, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Matsuura K, Hamanaka R, Murakami K, Seto M, Inomata M, Moriyama M. Expression of DDX27 contributes to colony-forming ability of gastric cancer cells and correlates with poor prognosis in gastric cancer.

Am J Cancer Res. 5, 2998-3014. (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

西田欣広、濱中良志ら セクレターゼ欠損マウスにおける胎児発育不良と細胞外マトリックスの発現解析 第 41 回日本分子生物学会年会 (2018 年)

西田欣広、濱中良志ら -セクレターゼの欠損は GHRH receptor を介した胎児発育不良と関連している 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年)

西田欣広、濱中良志ら マウスにおいて セクレターゼは胎児発育と関連している 第 39 回 日本分子生物学会年会 (2016 年)

西田欣広、濱中良志ら セクレターゼ欠損マウスは乳腺の発達と関連している 第 38 回 日本分子生物学会年会 (2015 年)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：花田 俊勝

ローマ字氏名：Hanada Toshikatsu

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 10363350

研究分担者氏名：吉岡 秀克

ローマ字氏名：Yoshioka Hidekatsu

所属研究機関名：大分大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 00222430

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。