

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32525

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19988

研究課題名(和文)VIおよびXII型コラーゲンによる新規骨基質制御機構の解析

研究課題名(英文)Elucidation of novel bone matrix regulatory system by collagens VI and XII.

研究代表者

伊豆 弥生 (Izu, Yayoi)

千葉科学大学・危機管理学部・講師

研究者番号：90431949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨の「質」の制御メカニズムの解明を目指し、骨を作る骨芽細胞の細胞間コミュニケーション制御に着目し研究を行った。私たちはこれまでにVI型コラーゲンあるいはXII型コラーゲンが欠損すると骨芽細胞の形が変形し、骨量および骨質が低下することを明らかにした。本研究では、骨形成時に骨芽細胞が構築する細胞間ネットワークの形成において、VI型コラーゲンとXII型コラーゲンが協調的に働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to elucidate the control mechanism of bone quality, focusing on regulation of bone forming osteoblast cell-cell communication. We have elucidated that lack of collagen VI or collagen XII induces osteoblast shape change thereby decreased bone quality. In this research, we found that cooperative regulation of collagens VI and XII form osteoblast cell-cell communication network.

研究分野：骨生理学、細胞生物学

キーワード：VI型コラーゲン XII型コラーゲン 骨形成 骨芽細胞 骨芽細胞ネットワーク

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会に突入した我が国において、要介護の危険性が高まる骨粗鬆症の克服は喫緊の医療課題である。骨粗鬆症は骨強度低下による骨折の危険性が高まる病態であり、骨強度は骨の量と質に規定される。我々はこれまでに、マイナーコラーゲンである VI 型コラーゲンや XII 型コラーゲンが骨芽細胞の形や細胞間の結合・コミュニケーションを制御することで骨質の制御に関与していることを見出した。興味深いことに、これらの VI 型コラーゲン遺伝子あるいは XII 型コラーゲン遺伝子の変異はともに筋肉や腱に障害をきたすウルリッヒ病の原因遺伝子であることが我々の研究で明らかになった。しかしながら、VI 型コラーゲンと XII 型コラーゲンの関連性については不明である。

### 2. 研究の目的

本研究は、骨質制御メカニズムの解明を目指し、骨を作る骨芽細胞の細胞間コミュニケーション制御機構における VI 型コラーゲンと XII 型コラーゲンの協調的な働きについて検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞の細胞間コミュニケーション確立における VI および XII 型コラーゲンの相互的作用の解析：培養した骨芽細胞を用いて、骨形成を誘導し、この間における VI 型と XII 型コラーゲンの発現分布について解析する。

(2) VI および XII 型コラーゲンに制御される分子の同定：VI 型あるいは XII 型コラーゲンに結合、またはこれら 2 つのコラーゲン分子が共通して制御する標的分子を、RNA シークエンス解析により同定する。

(3) VI および XII 型コラーゲン標的分子の骨芽細胞動態における機能解析：上記実験 2 で同定された標的分子を欠損させたマウスを作成し、骨質の評価を行う。

### 4. 研究成果

(1) 骨芽細胞の細胞間コミュニケーション確立における VI および XII 型コラーゲンの相互的作用の解析：新生仔マウスから単離した初代培養骨芽細胞を骨形成培地で培養し、VI および XII 型コラーゲンの局在を蛍光免疫染色法にて継時的に解析した。また、*Col6a1* 欠損および *Col12a1* 欠損マウスから得られた初代培養骨芽細胞を用いて、マトリックスブリッジ形成を解析した。さらに、マトリックスブリッジ形成細胞数を計測し、統計学的に解析した。

#### 結果

細胞外の VI および XII 型コラーゲンは、骨芽細胞と骨芽細胞の間に局在し、細胞と細胞を結ぶマトリックスブリッジを形成することが明らかとなった (Fig.1,2)。また、このマトリックスブリッジにおいて、VI およ

び XII 型コラーゲンは共局在した。この時、骨の主要なコラーゲンである I 型コラーゲンは、細胞表面に局在し、マトリックスブリッジ形成に関与しなかった (Fig.2)。

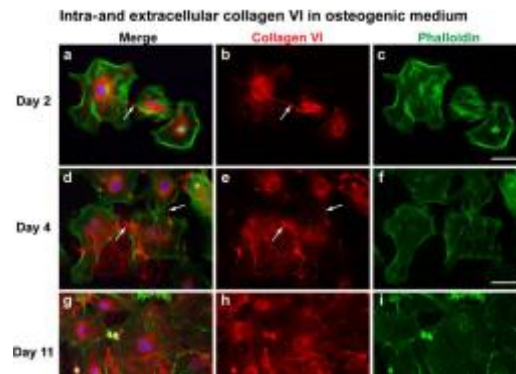


Fig.1 VI 型コラーゲンは骨芽細胞間にマトリックスブリッジを形成する

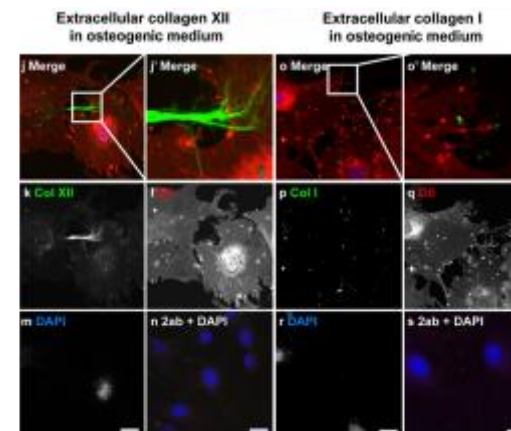


Fig.2 XII 型コラーゲンはマトリックスブリッジを形成するが、I型コラーゲンはこれに関与しない。

さらに、*Col6a1* 欠損および *Col12a1* 欠損マウスから得られた初代培養骨芽細胞を用いて、マトリックスブリッジ形成を解析したところ、いずれの欠損においてもこれが障害されたことから、両コラーゲンの存在がマトリックスブリッジ形成に不可欠であることが明らかとなった (Fig.3)

#### 考察

骨形成過程において、骨芽細胞は骨形成部位に移動、接着し、隣接する骨芽細胞とギャップ結合により結合する。これを介して細胞間コミュニケーションを行っている。骨形成過程において、骨芽細胞間のコミュニケーションは適切な骨量および骨質を伴った骨形成に必須である。本研究は、VI および XII 型コラーゲンが骨芽細胞の細胞間ネットワーク形成に重要な役割を担うこと明らかにした。

VI および XII 型コラーゲンは、骨形成過程において、骨芽細胞間に細胞と細胞をつなぐマトリックスブリッジを形成する。I 型コラーゲンは骨の主要なコラーゲンであるが、マトリックスブリッジ形成には関与せず、この時期には、細胞表面に局在し、その後、細胞周囲全域に認められる。

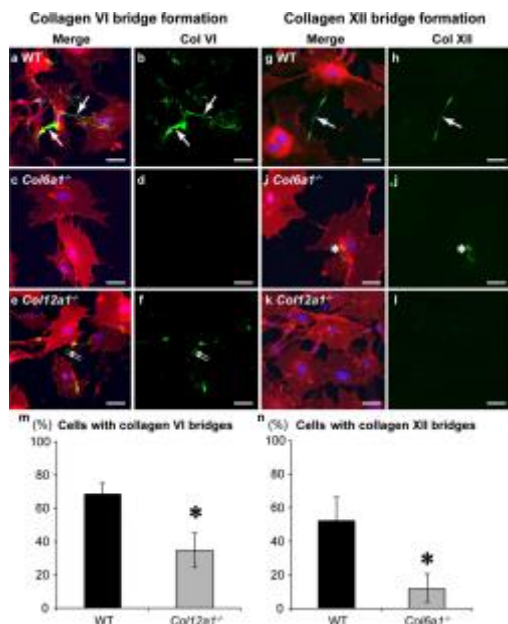


Fig. 3 VIあるいはXII型コラーゲン欠損はマトリックスブリッジ形成を障害する。

このようなマトリックスブリッジ形成は、Col6a1あるいはCol12a1を欠損した骨芽細胞では認められないことから、VIおよびXII型コラーゲンが骨芽細胞の細胞間をつなぐマトリックスブリッジを形成において協調的に働くことが示唆された。

また、これまでの研究から、XII型コラーゲンを欠損した骨芽細胞では、ギャップ結合を介したコミュニケーションが障害されることが明らかになっていることから、VI・XII型コラーゲンのコンプレックスが骨芽細胞の細胞間コミュニケーション構築に必須であることが明らかになった。

本研究は、VIおよびXII型コラーゲンが協調的に働くことを初めて明らかにしたものであり、ウルリッヒ病およびベスレム筋症の病態発生におけるさらなるメカニズムの解明が期待される。(Izu et al 2016 Cell Tissue Research In press)

(2) VIおよびXII型コラーゲンに制御される分子の同定：VI型あるいはXII型コラーゲン欠損骨芽細胞と野生型骨芽細胞を用いて、結合、RNAシーケンス解析を行い、標的となりうる細胞外マトリックス分子、膜貫通型分子等が同定された。

(3) VIおよびXII型コラーゲン標的分子の骨芽細胞動態における機能解析：XII型コラーゲンと標的分子との関連性を解析するために、XII型コラーゲンを発現する細胞で、標的分子を欠損させることができるCol12a1floxマウスの作成を行った。(Aida and Izu et al. BMC Genomics 2016)

## 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 2件)

- (1) Aida T., Nakade S., Sakuma T., Izu Y., Oishi A., Mochida K., Ishikubo H., Usami T., Aizawa H., Yamamoto T., Tanaka K. Gene cassette knock-in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *GMC Genomics* 28;17(1):979. 査読あり DOI 10.1186/s12864-016-3331-9
- (2) Izu Y., Ezura Y., Koch M., Birk DE., Noda M. Collagens VI and XII form complexes mediating osteoblast interactions during osteogenesis. *Cell Tissue Res.* 364(3):623-635. 査読あり DOI 10.1007/s00441-015-2345-y

[学会発表] (計 5件)

- (1) 伊豆弥生, XII型コラーゲンは腱細胞の細胞間コミュニケーションネットワークに参与する。第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪、平成28年7月、骨代謝学会ポスター賞受賞
- (2) Yayoi Izu, Collagens VI and XII Matrix bridges mediate osteoblast cell communicating networks during bone formation. The 37th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research. Seattle, Washington, USA, 平成27年9月
- (3) 伊豆弥生, VI型およびXII型コラーゲン複合体による骨芽細胞間コミュニケーションネットワークの制御。第33回日本骨代謝学会、東京、平成27年7月
- (4) 伊豆弥生, VI型およびXII型コラーゲン複合体が骨形成過程における骨芽細胞間コミュニケーションネットワークを制御する。第35回日本骨形態計測学会、岡山、平成27年6月
- (5) Yayoi Izu, Collagens VI and XII form complexes mediating osteoblast interaction during osteogenesis. The 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry, Tokyo, Japan, 平成27年3月

○出願状況 (計 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 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

伊豆 弥生 (IZU, Yayoi)  
千葉科学大学、危機管理学部、講師  
研究者番号：90431949

### (2) 研究協力者

相田 知海 (AIDA, Tomomi)  
Massachusetts Institute of  
Technology • Research Scientist

### (3) 研究協力者

Birk DE (BIRK, David E.)  
University of South Florida • Professor

### (4) 研究協力者

Koch Manuel (KOCH, Manuel)  
University of Cologne