

令和元年6月5日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19771

研究課題名(和文)エクソソームATP応答を基軸とした超初期石灰化の臓器向性研究

研究課題名(英文)ATP dependent exosomes calcification and organ tropism

研究代表者

増山 律子(MASUYAMA, Ritsuko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：60297596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：石灰化はどの様に開始するかを明らかにするために、細胞外小胞へのカルシウム輸送のしくみをとらえ、石灰化初期に出現する変化を調べた。石灰化細胞からは直径100nm程度の小胞の放出が顕著であり、その中にエクソソームが多く含まれていることが明らかとなった。さらに、エクソソーム表面のATP輸送分子は石灰化に依存して変化することから、ATP代謝が小胞カルシウム流入に関与する可能性が示唆された。また、石灰化細胞由来の小胞では、細胞から放出された時点で既に小胞内のカルシウム濃度は上昇していることを見出した。今後の課題として、細胞内で小胞にカルシウムイオンを蓄積させる機構解明が挙げられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康な骨を維持するためには、骨組織内の石灰化が適正に進行する必要がある。その一方で、生命を脅かす深刻な異所性石灰化の進行を未然に防ぐ手段の創出も必要とされており、小胞へのカルシウム輸送機構を解明することは、石灰化のきっかけとなる初期現象の理解を大きく前進させる。本研究では小胞内にカルシウムイオンを流入させる仕組みの解明には至らなかったが、石灰化予定の細胞では(石灰化する前に)細胞内で既に小胞へのカルシウム流入が高まっていることを示唆する結果を得たことから、細胞内で小胞にカルシウム流入機構解明の重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：The process of calcium entry to extracellular vesicle was assessed to clarify mechanisms of initial calcification. Compared to non-calcified cells, release of the extracellular vesicle of around 100nm in diameter exosomes was remarkable from a calcified cell. Furthermore, levels of ATP transport proteins were altered based on calcification, suggesting the involvement of ATP metabolism during initial calcification. In addition, calcium concentration in extracellular vesicles had already risen when it was released. Therefore, cytoplasmic mechanism to accumulate vesicular calcium should be investigated.

研究分野：骨ミネラル代謝学

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム ATP 石灰化 カルシウム

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

1. 研究開始当初の背景

ビタミン D はカルシウム吸収を促進し、性内におけるカルシウム恒常性維持にはたらく。研究代表者はカルシウムや骨恒常性におけるビタミン D 作用の必要性を見極めるために、ビタミン D 作用を欠失したビタミン D 受容体欠損(VDR KO)マウスを作出して以下の検討を行い、研究成果を報告してきた。

- (1) VDRKO マウスに特徴的な骨石灰化障害を、カルシウム吸収を増加させる食事を投与することで、正常化した (*Endocrinology* 142:494-497 2001, *J Bone Miner Res* 18:1217-1226 2003 いずれも研究代表者は筆頭著者で責任著者)。
- (2) VDRKO マウスのビタミン D の作用を小腸上皮のみ局所的に回復させて、カルシウム吸収と骨量を改善した (*Clin Endocrinol Metab* 25:561-572 2011, *Bonekey Rep* 3:496 1-7 2014, *Bone* 81:501-512.2015)。
- (3) 小腸上皮のビタミン D 作用を局所的に欠失しカルシウム吸収が障害されると、全身 VDRKO マウスよりも骨量は低下し、世界に先駆けて ATP-ピロリン酸代謝を介したビタミン D 骨形成抑制作用を見出した (*J Clin Invest* 2012, *Curr Opin Pharmacol* 22:87-99 2015)。

これらの結果は、カルシウムや骨の恒常性におけるビタミン D 作用の功績はカルシウム吸収促進であり、骨の石灰化にはビタミン D 作用は必要無いことを示す。むしろ、カルシウム栄養欠乏時には骨組織でビタミン D が作用することで、骨量の減少はより深刻化することを明らかにした。

また、骨の石灰化を調節するピロリン酸は石灰化本体のリン酸カルシウム生成を阻害するが、ピロリン酸代謝が低下したモデル動物は石灰化抑制が破たんし異所性石灰化を好発するにもかかわらず、他のミネラル代謝の変動に影響されて骨量はむしろ減少する。実は、軟組織に異所性石灰化を好発する他のモデルでも骨量はしばしば減少し、石灰化開始時の結晶生成メカニズムをとらえることは困難である。石灰化は、細胞から放出される小胞内でリン酸カルシウム化合物を形成することで開始するが、ここに関わる小胞へのイオン流入を生み出す決定因子はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

石灰化の素材となるカルシウムやリンの恒常性は厳密に統制され、生命情報システムの基盤を成す様々な細胞内反応を仲介している。それらのイオンが細胞から放出される小胞に取り込まれ、内部で著しく濃度が高められると石灰化が開始する。本来石灰化すべきでない軟組織では、常に小胞の石灰化が抑制されているのだが、このしくみが破綻すると異所性石灰化が出現する。

細胞から放出される小胞の中でカルシウムとリンの濃度が高まり、難溶性化合物(ヒドロキシアパタイト)が生成して石灰化は開始する。ATPase ポンプのような強力な駆動体でなければ、化合物を析出させるまで小胞にイオンを輸送することは不可能であるが、このしくみは不明である。

研究代表者らはビタミン D 作用が ATP-ピロリン酸代謝を促進して石灰化を抑制するしくみを世界に先駆けて明らかにした (*J Clin Invest* 122:1803-1815 2012)。ピロリン酸は細胞周囲のカルシウムとリンとの結合を阻害して、石灰化を抑制する。逆に、ピロリン酸が減少すると石灰化が進行する。このとき、ピロリン酸量の変化とは逆に ATP 量は増加するため、「ATP は石灰化超初期の小胞カルシウム輸送を促進するのではないか」という仮説を打ち立てた。

石灰化は特定の組織に局限する。限られた組織が石灰化する細胞外小胞を放出するのか、あるいは、細胞外小胞にがん転移の臓器向性の様な興味深い現象が存在するのではないか。そこで、局所性を生む要因として、組織から放出される細胞外小胞であり、臓器間の情報を伝達するエクソソームの石灰化への関与を検討する。

そこで、本申請研究では細胞外小胞へのカルシウム輸送と石灰化の臓器向性のしくみをとらえ、石灰化はどの様に開始するかを明らかにするために、石灰化初期に出現する変化を調べた。

3. 研究の方法

- (1) 細胞外小胞における ATP 代謝系分子の局在評価

マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞前駆細胞を培養し、石灰化骨芽細胞へと分化させた。分化誘導刺激前後の培養上清に放出される細胞外小胞を回収し、ATP 代謝分子の局在をウェスタンブロットにより検出した。さらに、異所性石灰化を発症する皮膚組織より弾性繊維細胞を採取し、DMEM 10% FBS 培養液中に放出される細胞外小胞を回収し、骨芽細胞と同様の分子の検出を試みた。

- (2) 培養上清からの細胞外小胞の回収

細胞外小胞は、遠心分画法、限外濾過法、エクソソーム表面のホスファチジルセリンを認識し抽出する方法 (MagCapture™ エクソソームアイソレーションキット PS) の二通りの方法で抽出した。

(3) ATP 依存的な小胞カルシウム流入の検出

マウス頭蓋骨由来骨芽細胞の培養上清より限界濾過法にて抽出した小胞に Fura-2 カルシウムプローブを導入し、カルシウム流入に伴い増加する小胞内イオン化カルシウムの蛍光検出を試みた。Fura-2 導入小胞に ATP を刺激することで、カルシウム流入が誘導されるかを評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞外小胞の回収

マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞前駆細胞、および、皮膚弾性繊維細胞 (異所性石灰化発症細胞、正常細胞) を培養し、培養上清中に放出される細胞外小胞を遠心分画法により回収した。細胞外小胞はアルデヒド固定し、電子顕微鏡を用いて小胞のサイズを計測したところ、石灰化細胞の培養上清に直径 100nm 程度の小胞が多く観察された。

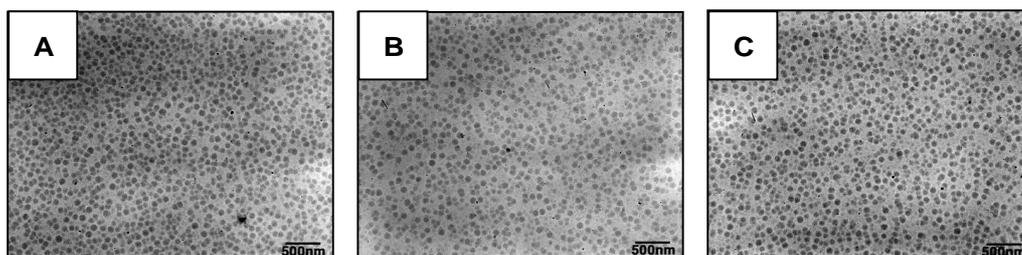


図 1 培養上清に放出された細胞外小胞の電子顕微鏡撮影像
石灰化を誘導した骨芽細胞培養上清由来小胞 (A)、正常皮膚弾性繊維細胞培養上清由来小胞 (B)、異所性石灰化弾性繊維細胞由来小胞 (C) の透過型電子顕微鏡像 スケール 500nm

(2) 細胞外小胞における ATP-ピロリン酸代謝系分子の局在評価

遠心分画法により回収した細胞外小胞に局在する分子をウェスタンブロットにより検出した。ATP 代謝分子の中では V-ATPase が顕著に局在していたが、石灰化、非石灰化細胞由来の小胞間での差は認められなかった。

電子顕微鏡による小胞サイズ計測より、100nm 程度の直径の小胞が多いことから、遠心分画法にて回収した小胞のエクソソームマーカー分子の局在を評価し、エクソソーム表面に特異的に局在する CD9 分子が検出された。そこで、培養上清はホスファチジルセリンアフィニティ精製を行い、細胞から放出されるエクソソームを回収し、ウェスタンブロットによる局在分子の評価を行った。

エクソソームマーカー CD63 の検出シグナルは異所性石灰化細胞で非石灰化細胞と比較して強いことから、石灰化細胞ではエクソソームの放出量が増加することが示唆された (図 2A)。また、興味深いことに、細胞間のギャップ結合の構成分子であるコネクシン (connexin)43 はエクソソームに局在することが知られているが、石灰化細胞由来エクソソームではコネクシンシグナルが減弱する傾向にあった (図 2B)。コネクシン 43 は ATP 放出を調節することも報告されていることから、エクソソーム周囲の ATP 動態を調節する可能性が示唆される。

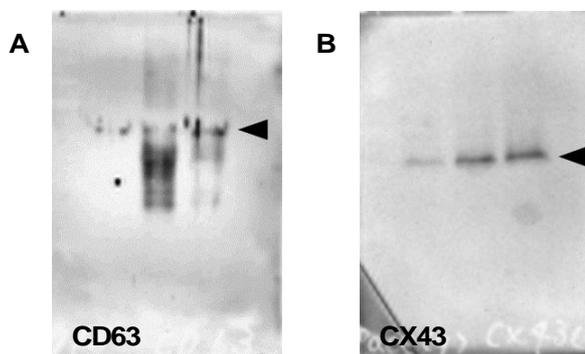


図 2 ホスファチジルセリンアフィニティ精製により回収した培養上清エクソソームのウェスタンブロット

CD63(A)と CX43(B)の局在量を石灰化を誘導した骨芽細胞培養上清由来エクソソーム、異所性石灰化弾性繊維細胞由来エクソソーム、正常皮膚弾性繊維細胞培養上清由来エク

ソソーム で比較した。

(3) ATP 依存的な小胞カルシウム流入の検出

限外濾過により回収した細胞外小胞に Fura-2 プローブを導入し、ATP 依存的な小胞カルシウム流入の検出を試みたが、石灰化弾性繊維由来小胞において ATP 刺激時(矢印)に微弱的なカルシウム濃度上昇を観察したものの、石灰化を開始し得る程度の大きなカルシウム濃度上昇は検出できなかった(図3)。ただし、小胞内カルシウム濃度は ATP 刺激前より石灰化細胞由来小胞で正常細胞由来小胞よりも小胞内カルシウム濃度は顕著に高く検出されたことから、放出時には既に小胞に高濃度のカルシウムが蓄積している可能性も示唆される。

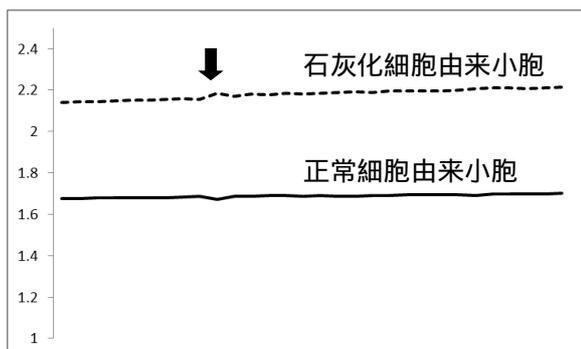


図3 限外濾過法により回収した培養上清小胞への ATP 刺激による小胞内カルシウムイオン濃度の変化

正常細胞由来小胞(実線)と石灰化細胞由来小胞(破線)に Fura-2 を導入し、340nm/380nm 励起における蛍光強度の変化を観察した。矢印: ATP 刺激

以上の研究成果から、石灰化細胞からは直径 100nm 程度の小胞の放出が顕著であり、その中にエクソソームが多く含まれていることが明らかとなった。さらに、エクソソーム表面の ATP 輸送分子は石灰化に依存して変化することから、ATP 代謝が小胞カルシウム流入に關与する可能性が示唆された。また、石灰化細胞由来の小胞では、細胞から放出された時点で既に小胞内のカルシウム濃度は上昇していることを見出した。今後の課題として、細胞内で小胞にカルシウムイオンを蓄積させる機構解明が挙げられる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Vitamin Status and Mineralized Tissue Development. Kimie Nakagawa K, Okubo Y, Masuyama R. Current Oral Health Reports. 5: 89–95. 2018 (査読あり) doi:10.1007/s40496-018-0174-2.

M1 and M2 Monocytes in Rheumatoid Arthritis: A Contribution of Imbalance of M1/M2 Monocytes to Osteoclastogenesis. Fukui S, Iwamoto N, Takatani A, Igawa T, Shimizu T, Umeda M, Nishino A, Horai Y, Hirai Y, Koga T, Kawashiri SY, Tamai M, Ichinose K, Nakamura H, Origuchi T, Masuyama R, Kosai K, Yanagihara K, Kawakami A. Front Immunol. 8:1958. 2018(査読あり)doi: 10.3389/fimmu.2017.01958.

Phosphate-dependent luminal ATP metabolism regulates transcellular calcium transport in intestinal epithelial cells. Uekawa A, Yamanaka H, Lieben L, Kimira Y, Uehara M, Yamamoto Y, Kato S, Ito K, Carmeliet G, Masuyama R. FASEB J. 32:1903-1915. 2018 (査読あり) doi: 10.1096/fj.201700631R.

Calcification in dermal fibroblasts from a patient with GGXX syndrome accompanied by upregulation of osteogenic molecules. Okubo Y, Masuyama R, Iwanaga A, Koike Y, Kuwatsuka Y, Ogi T, Yamamoto Y, Endo Y, Tamura H, Utani A. PLoS One. 11;12(5):e0177375. 2017(査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0177375.

[学会発表](計4件)

Masuyama, Ritsuko Luminal ATP metabolism and intestinal calcium transport. korean society of osteoporosis (招待講演)(国際学会)2018

増山律子 ビタミンD作用応答性ATP代謝による腸上皮炎症制御機構の検討 第72回日本栄養食糧学会 2018

増山律子 カルシウム吸収の調節因子 ビタミンD作用とは無関係な経細胞カルシウム輸送の可能性 第49回日本消化吸収学会(招待講演)2018

増山律子 細胞内外のカルシウム恒常性と骨代謝制御 日本解剖学会(招待講演)2017

〔図書〕(計5件)

増山律子: 動物モデルから見たビタミンDの作用, Clin Calcium. 28:1365-1371. 2018 医薬ジャーナル社

増山律子: ビタミンDと骨・ミネラル代謝, Clin Calcium. 27:1525-1532. 2017 医薬ジャーナル社

増山律子、福田 亨、中川公恵: 骨代謝における脂溶性ビタミン(A,D,E,K)の関与、内分泌・糖尿病・代謝内科,4:38-45. 2017 科学評論社

増山律子: ビタミンDと健康-カルシウム・骨の恒常性における役割- 社会システム研究,77-86. 2017 立命館大学社会システム研究所

増山律子: ビタミンDによるカルシウム代謝調節, THE BONE. 30:17-23. 2017 メディカルレビュー社

〔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:
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:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 山中 仁木
ローマ字氏名: YAMANAKA, Hitoki
所属研究機関名: 信州大学
部局名: 学術研究院総合人間科学系
職名: 准教授
研究者番号(8桁): 30533921

(2)研究協力者 「なし」

研究協力者氏名:

ローマ字氏名：

※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。