

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06335・19K21419

研究課題名(和文) Podoplanin cKOマウスを応用した新しい骨石灰化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of new bone mineralization mechanism using Podoplanin cKO mouse

研究代表者

高良 憲洋 (Takara, Kenyo)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：30824164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ポドプラニンコンディショナルノックアウトマウスCol1a11-Cre;Pdpn を世界に先駆けて確立した。Col1a11-Cre;Pdpn 骨芽細胞の石灰化はPdpnflマウス由来骨芽細胞においてCLEC-2で抑制され、Col1a11-Cre;Pdpn 骨芽細胞はCLEC-2で抑制されなかった。Pdpnfl由来骨芽細胞の石灰化物産生とアルカリホスファターゼ活性はCLEC-2で抑制されたが、Col1a11-Cre;Pdpn 由来骨芽細胞の石灰化物とアルカリホスファターゼ活性は抑制されず、ポドプラニンは硬組織発生に必須ではないが、CLEC-2で骨形成量を調節される機能分子であることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポドプラニンを骨において石灰化を制御する可能性のある新しい分子として位置づける事のできる成果を見出した可能性がある。これからの骨の研究に新しいツールを確立したと考える。ポドプラニンは血小板のCLEC-2と結合すると細胞の突起形成や骨格形成が弱まる事が知られており、本研究から、血小板が骨細胞に作用すると骨形成を抑制する可能性が考えられた。新しい骨の研究の道筋を作ったかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We established the podoplanin conditional knockout mouse Col1a11-Cre; Pdpn for the first time in the world. Calcification of Col1a11-Cre; Pdpn osteoblasts was suppressed by CLEC-2 in Pdpnfl mouse-derived osteoblasts, while Col1a11-Cre; Pdpn osteoblasts were not suppressed by CLEC-2. Calcium production and alkaline phosphatase activity of Pdpnfl-derived osteoblasts were suppressed by CLEC-2, but calcification and alkaline phosphatase activities of Col1a11-Cre; Pdpn -derived osteoblasts were not suppressed. We found that podoplanin was not concerned with hard tissue development although podoplanin was considered to be a functional molecule that regulates bone formation by CLEC-2.

研究分野：障害者歯科

キーワード：ポドプラニン CLEC-2 骨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1997年、Podoplanin は puromycin 誘導ネフローゼラット系球体の足細胞萎縮を担う候補として同定された、高いシアル酸含有量を有するムチン型 O-グリコシル化 I 型膜貫通タンパク質である (1)。1988年、ラット I 型肺胞上皮細胞抗原 T1alpha (2)、1998年、ラット I 型肺胞上皮細胞抗原 RT140 (3)、1992年、マウス末梢リンパ組織間質細胞の gp38 (4,5)、1999年、ヒトリンパ組織 gp36 (6)、1999年、皮膚腫瘍細胞株抗原 PA2.26 (7)、また 2003年、血小板膜タンパクの C 型レクチン様受容体 c-type lectin like receptor-2 (CLEC-2) と結合して血小板を凝集させる腫瘍細胞シアロ糖タンパク質アグラス aggrus (8,9) として同定された。Podoplanin は、アクチン細胞骨格再配列による細胞突起の伸長および収縮において、RhoA ファミリーシグナル伝達を介した細胞質リンカータンパク質 ezrin との結合に重要な役割を果たすこと、細胞突起伸長は podoplanin の細胞膜における発現と膜結合型 Rho-GTPase 活性化によるリン酸化 ezrin による podoplanin の F-アクチンへの結合を助長、アクチン細胞骨格の乖離と細胞の弛緩を誘導するのは CLEC-2 であると報告された (10,11)。Podoplanin KO マウスの樹立は 2003年、Schacht らによってなされ、podoplanin KO マウス胎仔は、肺胞管の末端に podoplanin 陽性 I 型肺胞上皮細胞を有する肺胞嚢がなく、肺萎縮で生下時致死である (11, 12, 13)。私の 2018 年の報告まで podoplanin cKO マウスの報告がなかった。Podoplanin の機能の詳細は Cre マウスを応用した生体組織における解析が進んでなく、ほとんどわかっておらず、*Pdpm* フロックスマウスの報告は 2018 年まで私と 1 グループのみである。Podoplanin は骨細胞マーカーとしても注目されているが、硬組織発生と石灰化で果たす機能は解明されていない。本研究では、そのような podoplanin の研究に、画期的な前進を施した私の podoplanin マウスの石灰化研究である。

2. 研究の目的

骨細胞マーカー・後期成熟骨芽細胞マーカー podoplanin の骨形成における役割を解明する。

3. 研究の方法

2018 年度

1) *Colla1* プロモーター・エンハンサーがドライブする Cre リコンビナーゼによる骨芽細胞のポドプランニンコンディショナルノックアウトマウス *Colla1-Cre;PdpnΔ* を世界に先駆けて確立した。

2) *Colla1-Cre;PdpnΔ* マウスの骨と歯の形成を、川本法による無脱灰凍結切片作製とキーエンス顕微鏡ならびに共焦点レーザー顕微鏡を用いて検索した。

2019 年度

1) *Colla1-Cre;PdpnΔ* マウス頭蓋冠からプライマリー骨芽細胞を確立した。

2) *Colla1-Cre;PdpnΔ* マウス骨芽細胞の石灰化生成物の量およびアルカリホスファターゼ活性を 1μg/ml および 0.1μg/ml の CLEC-2 を含む石灰化培地において測定した。

3) *Colla1-Cre;PdpnΔ* マウス骨芽細胞の骨関連タンパク産生を精査した。

人権の保護及び法令等の遵守への対応

福岡歯科大学倫理審査委員会承認 207 号・DNA 実験安全管理委員承認 R12011 号、動物実験委員会承認 10023 号、遺伝子組換え生物安全委員会（第二種使用等拡散防止措置）承認 11003 号

4 . 研究成果

1) *Coll11* プロモーター・エンハンサーがドライプする Cre リコンビナーゼによる骨芽細胞のポドプランinconディショナルノックアウトマウス *Coll11-Cre;PdpnΔ* を世界に先駆けて確立した (図 1)

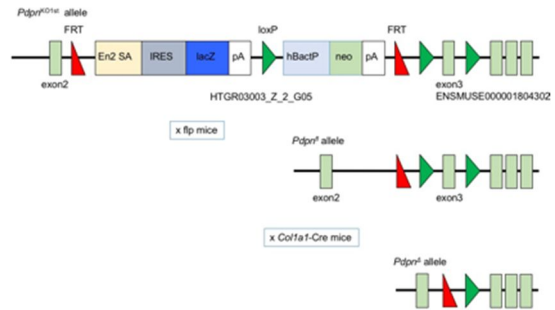


図 1

2) *Coll11-Cre;PdpnΔ* マウスの骨と歯の形成を、川本法による無脱灰凍結切片作製とキーエンス顕微鏡ならびに共焦点レーザー顕微鏡を用いて検索した。骨細胞における podoplanin は見事に cKO されていた。*Coll11-Cre;PdpnΔ* マウスの切歯象牙質および歯槽骨には異常が見られなかった (図 2)。しかし、若干、骨形成過剰が尾骨に見られた (図 3)

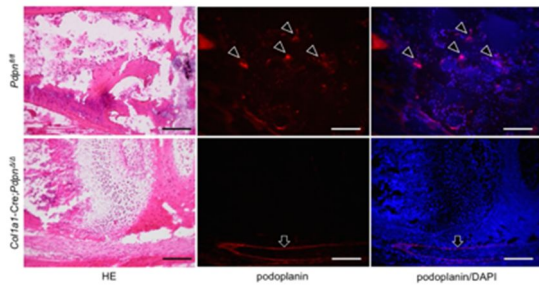


図 2

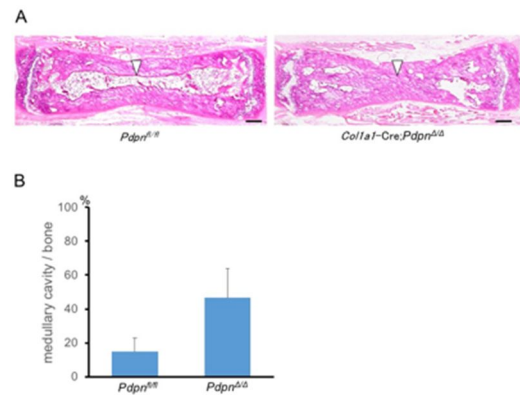


図 3

続いて、*Coll11-Cre;PdpnΔ* マウス頭蓋冠からプライマリー骨芽細胞を確立した (図 4)

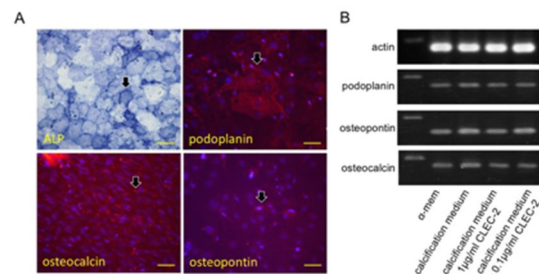


図 4

Coll11-Cre;PdpnΔ 骨芽細胞の石灰化は、表現型ワイルドである *Pdpn^{fl}* マウス由来の骨芽細胞において CLEC-2 によって抑制されたが、*Coll11-Cre;PdpnΔ* 由来の頭蓋冠骨芽細胞においては

CLEC-2 によって抑制されなかった。また、*Pdprfl* 由来の頭蓋冠骨芽細胞の石灰化生成物の量およびアルカリホスファターゼ活性の両方とも、1 μ g/ml および 0.1 μ g/ml の CLEC-2 を含む石灰化培地において、CLEC-2 を含まない石灰化培地におけるよりも有意に少なかった。*Pdprfl* 由来の頭蓋冠骨芽細胞の石灰化生成物の量およびアルカリホスファターゼ活性は、1 μ g/ml よりも 0.1 μ g/ml の CLEC-2 を含む石灰化培地においてどちらも有意に大きかった。CLEC-2 を含む石灰化培地中の *Colla1-Cre;PdprA* からの頭蓋冠骨芽細胞の石灰化生成物の量およびアルカリホスファターゼ活性に有意差はなかったことから、ポドプラニン は硬組織発生に必須ではないが、骨形成量を調節する機能分子であることが考えられた (図 5)。

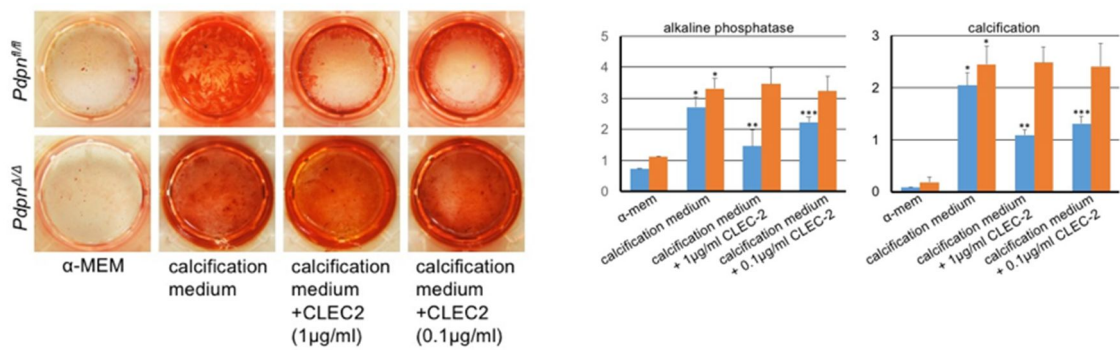


図 5

(図 1-図 5 : すべて投稿準備中の未発表データ)。

<参考文献>

- Breiteneder-Geleff S, Am J Pathol., 151, 1141-1152, 1997.
- Dobbs LG, Biochim Biophys Acta., 970, 146-156, 1988.
- Gonzalez, Biochim Biophys Acta., 1429, 208-216, 1998.
- Farr AG, J Exp Med., 176, 1477-1482, 1992.
- Farr A, J Histochem Cytochem., 40, 651-664, 1992.
- Zimmer G, Biochem J., 341, 277-284, 1999.
- Scholl FG, J Cell Sci., 112, 4601-4613, 1999.
- Kato Y, J Biol Chem., 278, 51599-51605, 2003.
- Kato Y, Sci Rep., 4, 5924, 2014.
- Acton SE, Nature, 514, 498-502, 2014.
- Martín-Villar E, J Cell Sci., 119, 4541-4553, 2006.
- Schacht V, EMBO J., 22, 3546-3556, 2003.
- Takara K, PLoS One, 12, e0171912, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 高良憲洋、梶原 弘一郎、藤田 隆寛、坂上 竜資、小島 寛、沢 禎彦
2. 発表標題 ポドランニン欠損マウスにおけるフェノタイプの検討
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高良 憲洋、梶原 弘一郎、藤田 隆寛、坂上 竜資、沢 禎彦、小島 寛
2. 発表標題 CLEC-2による頭蓋冠骨芽細胞の石灰化抑制
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenyo Takara, Koichiro Kajiwara, Takahiro Fujita, Takenori Kanai, Sachio Tamaoki, Ryuji Sakagami, Yoshihiko Sawa, Hiroshi Kojima
2. 発表標題 CLEC-2 suppresses calcification in calvarial osteoblasts
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高良 憲洋、梶原 弘一郎、藤田 隆寛、坂上 竜資、沢 禎彦、小島 寛
2. 発表標題 CLEC-2を介した頭蓋冠骨芽細胞の石灰化抑制
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koichiro Kajiwara, Kenyo Takara, Takahiro Fujita, Takenori Kanai, Ryuji Sakagami, Hiroshi Kojima, Yoshihiko Sawa, Sachio Tamaoki
2. 発表標題 Effect of TLR4 inhibitors on porphyromonas gingivalis LPS-induced diabetic nephropathy
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原弘一郎、高良憲洋、藤田隆寛、坂上竜資、小島寛、沢禎彦
2. 発表標題 Porphyromonas. gingivalis LPSが誘導する糖尿病性腎症の発症とTLR4阻害剤の効果について
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原弘一郎、高良憲洋、高田俊輔、玉置幸雄、吉永泰周、沢禎彦、坂上竜資
2. 発表標題 P. gingivalis LPSに起因する糖尿病性腎症の発症とTLR阻害剤による 予防効果に関する研究
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kajiwara K, Takara K, Takata S, Tamaoki, Yoshinaga Y, Sawa Y, Sakagami R
2. 発表標題 Study for the diabetic nephropathy promoted by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide and the prevention effect by TLR blocker
3. 学会等名 第66回JADR総会・学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Fujita, Koichiro Kajiwara, Kenyo Takara, Ryuji Sakagami, Hiroshi Kojima, Yoshihiko Sawa, Sachio Tamaoki
2. 発表標題 Development of scar suppression method applying TGF- function of microfibril protein
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----