

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10121

研究課題名（和文）炎症による骨免疫制御に関わるカルシニューリン結合分子の同定とその分子生物学的解析

研究課題名（英文）Identification and molecular analysis of calcineurin binding protein related to osteo immunity by inflammation

研究代表者

杉山 悟郎 (Sugiyama, Goro)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：00722828

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：カルシニューリンは骨免疫システムにおける重要な役割を担う主要なタンパク質ホスファターゼである。骨芽細胞において、NFAT活性化を調べるウエスタンブロットイング法による解析を行った。炎症によりNFATの脱リン酸化は促進され、NFAT-カルシニューリンシグナルの活性化が示唆された。カルシニューリンの結合分子の探索を行い、免疫応答に重要なNMT1と結合することが明らかになった。NMT1はミリストイル化転移酵素であり、カルシニューリンにもこの反応を可能にする特定のアミノ酸配列が認められたことから、ミリストイル化修飾反応を介してカルシニューリンの分子動態や免疫制御機構の変化が生じ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

顎骨骨髄炎などの骨炎症性疾患は難治性であり、その病態や分子生物学的機序はほとんど明らかになっていない。骨表面に存在する骨芽細胞が骨免疫の主体を担うと考えられ、この細胞内分子挙動の解明に繋がれば、病態把握や治療薬へのアプローチとして学術的、社会的意義が大きい。また、予防的に対応する手法や阻害剤などを用いたアプローチへ発展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Calcineurin is major protein phosphatase, which play important role for system of osteo immunity. In osteoblasts, we have experiments of westernblotting analysis, which is investigation for NFAT activity. Dephosphorylation of NFAT is induced, and suggested activation of NFAT-Calcineurin signals. We investigated calcineurin binding protein, and find NMT1, which is important molecule for immuno response. NMT1 is a transferase of protein myristoylation, and calcineurin is also catalyzed by the enzyme because of calcineurin have specific amino-sequence for the reaction. These results suggested that molecular change in calcineurin and in regulatory mechanisms for immunity of osteoblasts.

研究分野：分子生物学

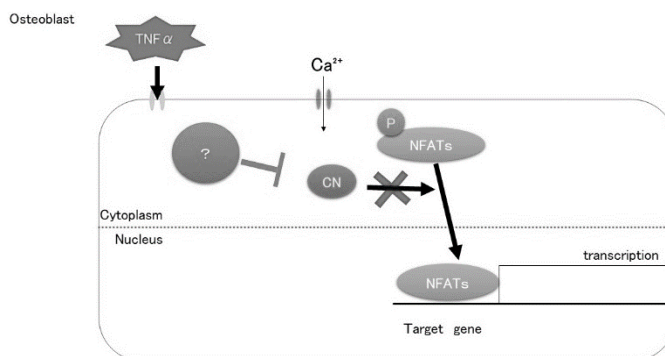
キーワード：骨免疫 骨代謝 骨芽細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫応答を担う分子として NFAT がある。NFAT シグナルは、近年免疫細胞の活性化につながる IL-2 や IL-7 などを生産することから免疫機能の獲得に重要と考えられる。このシグナルの活性化に必須である NFAT の脱リン酸化は、カルシニューリン (Cn) が主に行う。これまで Cn と NFAT の相互作用を解析した報告は散見されるが、NF- κ B シグナルの活性化が Cn と NFAT の相互作用へ及ぼす影響は不明である。このことから、骨芽細胞において NF- κ B シグナルが免疫機能の低下に関わる機序が考えられた。難治性の骨髄炎には、こうした骨の易感染性や炎症の制御困難に寄与している機構が背景にあると考えるに至った。

骨芽細胞において、炎症性刺激により免疫応答システムに変化が生じることが考えられた。免疫応答の中心的役割を担うカルシニューリンはタンパク質ホスファターゼの一つであり、NFAT-カルシニューリンシグナルは主要な免疫シグナルとして知られている。そこで炎症時には骨免疫システムの変化からこのシグナルに変化が生じている可能性があり、カルシニューリンを介した機序が考えられた。そこで、それを可能にするカルシニューリン結合分子を同定し、この分子生物学的な特徴を調べることで、骨免疫に新たな知見を与えることができると考えた。これまで骨芽細胞における骨免疫学的観点からアプローチを行った研究は少なく、学術的、社会的な意義があり、今後この結合分子を標的とした新たな治療法の開発に寄与する可能性が考えられた。



2. 研究の目的

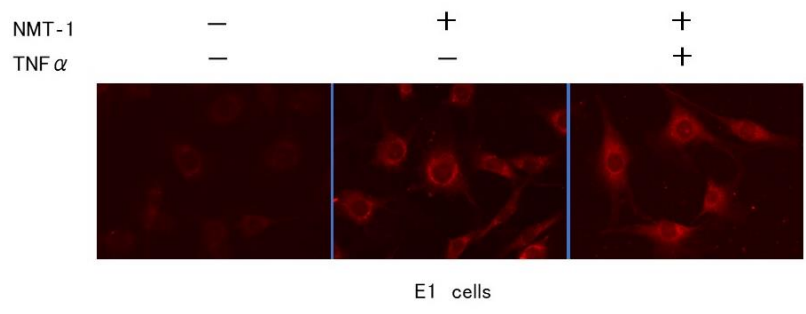
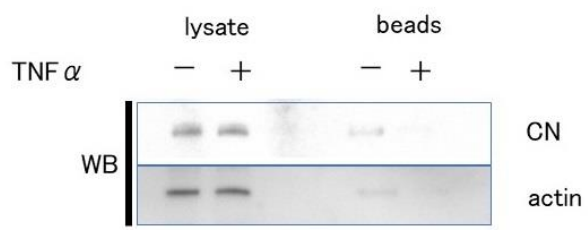
カルシニューリン結合分子を同定することで、骨芽細胞において、炎症性刺激に対する免疫応答システムを解明し、その抑制機序を明らかにすることである。また様々な修飾反応が生じている可能性が考えられ、NFAT-カルシニューリンシグナルを主体としたシグナル経路の活性化状態を解明する。

3. 研究の方法

まず、ウエスタンブロッティング法を用いて炎症性刺激に対する NFAT-カルシニューリンシグナルの活性化状態について検討する。用いる抗体は NFAT のリン酸化抗体やカルシニューリン抗体であり、NFAT のリン酸化状態を定量的に把握することでシグナルの活性化状態について検討する。その上で、細胞免疫染色法を用いて、NFAT やその他の関連分子の細胞内局在などについて検討し、炎症性刺激として TNF α 刺激を用いた実験を行う。最後に抗体を用いた免疫沈降実験を行い、カルシニューリンと結合する分子を網羅的に解析する。

4. 研究成果

ウエスタンブロッティング法では、NFAT の脱リン酸化が炎症性刺激に対して亢進することが明らかになった。またこのとき、結合する分子として NMT1 (N-ミリスチル化転移酵素 1) がカルシニューリンと結合することが明らかになった。カルシニューリンにはこの NMT1 が触媒酵素として作用するミリスチル化配列を有しており、カルシニューリンが NMT1 によってミリスチル化されている可能性が示唆された。また TNF α によって NMT1 の発現量は抑制されることが明らかになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 杉山悟郎	4. 巻 33
2. 論文標題 Other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders of the oral floor induced by methotrexate and tofacitinib: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 297-301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2020.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	藤原 稔史 (Fujiwara Toshihumi) (20644800)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	山田 朋弘 (Yamada Tomohiro) (60335619)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------