

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19597

研究課題名（和文）オルガネラ迅速単離による骨組織形成過程の解明と歯周組織再生医療への応用

研究課題名（英文）Rapid organelle isolation and its application to periodontal tissue

研究代表者

岩山 智明（Tomoaki, Iwayama）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80757865

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）：本研究では骨組織形成の初期過程において重要な役割を担っている基質小胞について、その性状解析と形成メカニズムの理解を進めることを目的に、培養骨芽細胞およびマウス生体から単離した細胞から、基質小胞の形成オルガネラであるリソソームを単離・解析した。その結果、基質小胞がミトコンドリアとリソソームの相互作用によって形成されていることが示唆された。加えてマウス生体から基質小胞を特異的に単離できる手法が開発された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、硬組織形成初期過程の基本的なメカニズムである基質小胞の形成機序の一端が解明された。さらに基質小胞を生体から単離・解析することが可能になったことから、さらなる研究を通じて、近年、組織再生効果が注目されているエクソソーム同様に、基質小胞を生物学的製剤として応用する、骨関連疾患に対する新たな治療法開発にも繋がる基盤情報を提供するものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we isolated and analyzed osteogenic lysosomes from cultured osteoblasts and cells isolated from mice in order to understand the formation mechanism of the matrix vesicles. The results suggest that matrix vesicles are formed by the interaction between mitochondria and lysosomes. In addition, a novel technology was established to specifically isolate matrix vesicles in vivo.

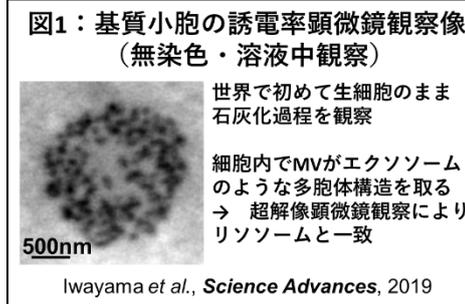
研究分野：歯周病学

キーワード：石灰化 基質小胞 オルガネラ リソソーム ミトコンドリア

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

骨組織形成の初期過程においては、骨芽細胞がリン酸カルシウムを含む基質小胞 (Matrix vesicle : MV) を分泌し、その MV がコラーゲンなどの細胞外基質の間に入り込むことが必須であると考えられてきた。しかしながら、この過程の詳細な解析は電子顕微鏡による観察に依存し、その固定操作の過程で MV が結晶化しアーチファクトを生むことから、先の仮説提唱から 50 年以上、解析が進んでいなかった。最近我々は、生細胞をナノレベルで観察できる走査型誘電率顕微鏡や超解像顕微鏡といった新技術を導入することでこの過程の観察に取り組み、培養骨芽細胞のリソソームに MV が形成・蓄積され、細胞外に分泌される過程を明らかにした (Iwayama *et al.*, *Science Advances*, 2019、図 1)。これらの手法により MV の直接観察が可能になったものの、MV はリソソームから放出後もしくは組織固定操作で容易に結晶化するため、細胞外へ分泌後の性状解析や生体の組織学的解析は極めて困難であった。最近になって、リソソームの膜タンパク Tmem192 にエピトープタグ (HA-Lyso) を発現させ、HA タグに対する抗体ビーズを用いてリソソームの免疫沈降 (IP) を行う新規リソソーム単離法 LysoIP (Abu-Remaileh *et al.*, *Science*, 2017) が開発された。そこで、分泌前の MV を細胞内からその形成オルガネラであるリソソームごと単離することができれば、これまで困難であった MV の性状解析の進展が期待できるものと考え、本研究を着想した。さらに、培養細胞と同様にリソソームの迅速単離が可能なマウスを作製することができれば、マウス生体から間葉系細胞を単離し、さらに同細胞中のリソソームを単離することにより、生体内で形成中の MV をも解析できるものと考えた。一方で、細胞内で MV 同様に多胞体構造を形成するナノ粒子として、エクソソームが挙げられる。近年エクソソームは生物学的製剤として注目されており、同様の構造を持つ MV を細胞内で生産し、細胞外基質とともに投与する、骨関連疾患に対する治療法を開発できるのではないかと着想した。



2. 研究の目的

本研究では、新規リソソーム単離法による MV の性状解析を進め、MV 形成メカニズムの理解を進展させ、骨関連疾患に対する新たな治療法開発の可能性を検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では骨組織形成の初期過程において重要な役割を担っている MV について、培養骨芽細胞およびマウス生体から単離した細胞から、基質小胞の形成オルガネラであるリソソームを単離・解析するとともに、分取した基質小胞を用いた歯周組織再生療法の可能性を検討する。具体的には以下の 2 つの研究を行った。

(1) 培養骨芽細胞 KUSA-A1 を用いた解析

レンチウイルスベクターを用いてリソソーム膜タンパク質である Tmem192 のリソソーム外膜側 (細胞質側) に HA タグを付与した融合タンパク質を発現させた培養骨芽細胞株 Lyso-KUSA を作製した。細胞免疫染色を用いて、同細胞のリソソームを Lamp1 抗体にて標識し、HA に対する抗体を用いてその共局在を検討した。ついで HA タグに対する抗体ビーズを用いてリソソームの免疫沈降を行った。免疫沈降後のサンプルについて、ウェスタンブロット法にて他のオルガネラの混入なくリソソームが単離できているか検討した。リソソームマーカーとして Lamp1、ミトコンドリアマーカーとして VDAC、ゴルジ体マーカーとして Golgin-97、細胞質マーカーとして HPRT に対する抗体をそれぞれ使用した。さらに同サンプル中のベータヘキソサミニダーゼ活性を全細胞と比較し、リソソームの濃縮がなされているか検討した。さらに Lyso-KUSA を石灰化誘導培地で培養した後にリソソームを単離し、全細胞もしくは単離リソソームのタンパク質溶解液を石灰化誘導の有無で回収し、ショットガンプロテオミクス解析を実施した。さらにリソソームとミトコンドリアの相互作用を担う分子群について CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術によりノックアウト細胞を作製し、走査型誘電率顕微鏡観察することで MV 形成に与える影響を検討した。

(2) リソソーム単離用トランスジェニックマウスの作製

培養細胞と同様に HA-Lyso を発現するトランスジェニックマウスを作製するため、発現プラスミドを作製した。プロモーターとして Ubc を選択した。さらに研究開始後に HA-Lyso をコンディショナルに発現させることのできる LysoTag マウスが発表され、米国ジャクソン研究所から購入可能となったため、同マウスを導入し、Twist2-Cre マウスと掛け合わせることで、間葉系細胞のリソソームが HA タグで標識されるノックインマウスを作製した。同マウスから骨芽

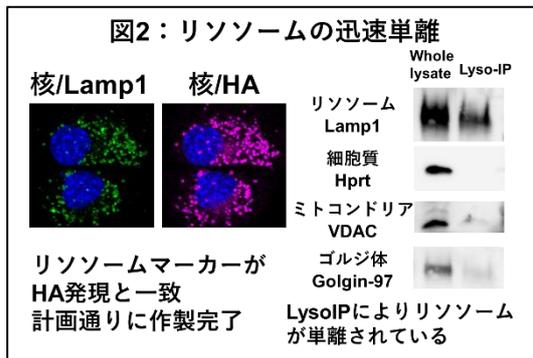
細胞を単離し、さらに HA タグに対する抗体ビーズを用いてリソソームの免疫沈降を行った。

4. 研究成果

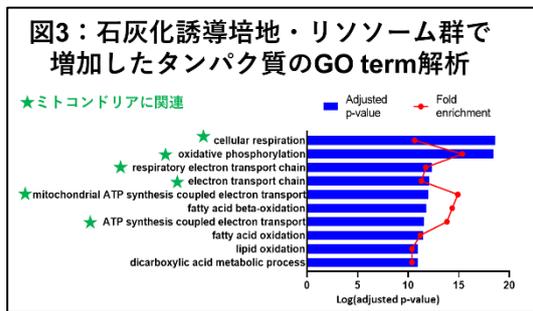
(1) 培養骨芽細胞 KUSA-A1 を用いた解析

HA-Lyso 発現レンチウイルスベクター導入後、KUSA を樹立した。細胞免疫染色により HA タグがすべての細胞に導入されており、同細胞のリソソームと HA タグの局在が一致することを確認した (図 2)。リソソームを効率よく単離できる LysoIP プロトコルの検討を行った後、全細胞および LysoIP サンプルのオルガネラマーカータンパク質のウェスタンブロットを行い、LysoIP 後に他のオルガネラの混入なく、リソソームが純度高く単離できていることを確認した (図 2)。LysoIP サンプルが全細胞に比べて 17 倍高いベータヘキソサミニダーゼ活性を持っていたことから効率の良いリソソームの単離が確認された。

puromycin 添加選択培地にて培養し、Lyso-



石灰化誘導培地で培養した Lyso-KUSA からリソソームを単離し、含まれるタンパク質の網羅的解析を行ったところ、予想通りコラーゲンなどの細胞外基質や骨関連タンパク質が含まれていた上、CD81 および CD9 といったエクソソーム関連テトラスパンニン分子が多く存在していた。通常培地・リソソーム群と比較して、石灰化誘導培地・リソソーム群で 500 個以上のタンパク質が有意に多く検出され、これらのタンパク質を GO term 解析を実施したところ、ミトコンドリアに関連するタンパク質が多く含まれていた (図 3)。このことから MV はミトコンドリアとリソソームの直接コンタクトによって形成されている可能性が示唆された。



そこで、リソソーム-ミトコンドリア間の直接コンタクトを制御する分子群のノックアウト細胞を作製した。このうち Rab7 遺伝子のノックアウト細胞については、3 回作製を試みたが、いずれもトランスフェクション後に細胞が生存せず、KUSA-A1 細胞の生存に必須の遺伝子であることが示唆された。ついで Rab7 を制御することでコンタクトを外す役割を担う、Tbc1d15 および Fis1 遺伝子のノックアウト細胞を作製した。シングルセルソーティングにより 1 細胞由来のクローンを樹立し、さらに石灰化誘導培地で培養後 MV の形成を走査型誘電率顕微鏡で観察したところ、両遺伝子のノックアウト細胞ではより多くの MV 形成を認めた。このことから MV はリソソーム-ミトコンドリア間の直接コンタクトを介して形成されている可能性が示唆された。

(2) リソソーム単離用トランスジェニックマウスの作製

かけあわせにより Twist2-Cre; LysoTag マウスを作製し、その組織学的解析により、HA タグが同マウスの間葉系細胞のリソソーム中のみ発現していることを確認した。さらに本研究開始後にマウスの歯周組織から高効率に細胞を単離する手法を開発した (Iwayama et al., Development, 2022) ため、同手法を用いて、歯周組織の硬組織形成細胞を単離した上で、同細胞から LysoIP を実施し、生体内で形成中の MV を解析する手法開発を達成した。

以上の結果は、硬組織形成初期過程の理解を進展させ、骨関連疾患に対する新たな治療法開発にも繋がる基盤情報を提供するものと期待できる。ミトコンドリアとリソソームの関与を示す論文報告が相次いでいる (Pei et al., Adv Sci, 2018, Iwayama et al., Sci Adv, 2019, Suh et al., Cell Metab, 2023) もの、未だ MV の形成過程については不明な点が多く残されている。これらの課題を整理し、我々の研究を含む最新の研究結果から MV の形成メカニズムについての仮説を提唱した総説を公表した (Iwayama et al., J Dent Res, 2022)。

本研究によりリソソームを迅速に単離し特異的にその内容物を解析する技術が確立されたことから、他のオルガネラにも同手法は適応できるものと考えられる。例えば、エクソソームは近年様々な疾患に対する治療効果を持つことが明らかとなり、その生物学的製剤としての開発が注目されている。しかしながら、エクソソームは分泌後に細胞外の様々な物質と混合されたり、細胞外で分解を受けることは避けられないことから、その性状が変化したり、不均一になると考えられる。本研究でリソソームに行った様に、エンドソーム内に形成されるエクソソームを intact のまま迅速単離できれば、均一でよく性状解析のなされたエクソソームの大量生産が達成され、生物学的製剤としての応用が進み、再生医療に寄与できる画期的な技術となり得ると考えられる。

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 Iwayama T., Bhongsatiern P., Takedachi M., Murakami S.	4. 巻 101
2. 論文標題 Matrix Vesicle-Mediated Mineralization and Potential Applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1554 ~ 1562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/00220345221103145	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩下瑞穂, 岩山智明, 富田貴和子, 松本修治, パーンボンサティアン, 阪下裕美, 竹立匡秀, 山田聡, 村上伸也
2. 発表標題 定量解析を目的とした歯根膜からの細胞単離法の開発
3. 学会等名 第64回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Phan Bhongsatiern, Tomoaki Iwayama, Hiromi Sakashita, Kiwako Tomita, Shuji Matsumoto, Mizuho Iwashita, Masahide Takedachi, Shinya Murakami
2. 発表標題 Osteoblasts with fluorescent-tagged organelle for live cell imaging
3. 学会等名 The 14th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究分担者	村上 伸也 (Murakami Shinya) (70239490)	大阪大学・大学院歯学研究所・教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小椋 俊彦 (Ogura Toshihiko) (70371028)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員 (82626)	

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