

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月23日現在

機関番号：33910

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791786

研究課題名（和文） 破骨細胞と骨組織における Abca5 の発現と生理機能の解析

研究課題名（英文） Validation of the expression and function of Abca5 in osteoclasts and bone tissue.

研究代表者

中川 大 (NAKAGAWA HIROSHI)

中部大学・応用生物学部・講師

研究者番号：40397039

研究成果の概要（和文）：

48種類存在するABCトランスポーターの中で、9種類の発現が破骨細胞の発生と共に上昇し、4種類の発現が低下することを見出した。この中で Abca5 に注目して解析を行った結果、破骨細胞の分化と共に Abca5 タンパク質の発現量も上昇することを明らかにした。また、Abca5 遺伝子欠損雌マウスの骨密度と野生型雌マウスの骨密度との間に有意な差を見出した。この結果は、Abca5 が雌マウスにおいて骨吸収の促進あるいは骨形成の抑制に関与している可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：

The expression of nine and four of 48 ABC transporters were found to be up- and down-regulated during osteoclastogenesis, respectively. Among them, the expression of Abca5 protein was also found to be increased during osteoclastogenesis. Abca5-deficient female mice showed the possibility that Abca5 could activate the bone resorption and/or inhibit bone formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：細胞生物学・生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学、破骨細胞、ABCトランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

近年、マクロファージと樹状細胞における ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの発現と機能に関する知見が蓄積されつつある。また、ABCA1, ABCB1, ABCB2 の発現が TNF $\alpha$ , LPS, IFN- $\gamma$  によって制御されていることもマクロファージを用いた研究において明らかにされている。本研究の対象であ

る破骨細胞は、マクロファージと樹状細胞と分化系譜を共にする近縁の細胞であり、造血幹細胞を起源とする。そして、破骨細胞系譜の分化及び融合・骨吸収機能は、TNF $\alpha$ , LPS, IFN- $\gamma$  による制御を受ける。破骨細胞の発生に必須であるサイトカイン RANKL は、TNF $\alpha$  や LPS と共通のシグナル伝達経路を活性化するので、破骨細胞系譜の分化に伴い ABC トラ

ンスポーターが発現し、破骨細胞系譜の機能に關与していることが十分に考えられる。しかしながら、破骨細胞系譜におけるABCトランスポーターの発現と機能に関しては何一つ明らかになっていない。

申請者は、破骨細胞に発現するABCトランスポーターを解析し、48種類存在するABCトランスポーターの中で、9種類の発現が破骨細胞の発生と共に上昇し、4種類の発現が低下することを見出した（若手研究B、課題番号19791361）。

## 2. 研究の目的

破骨細胞の発生と共に発現が上昇するATP-binding cassette (ABC)トランスポーターAbca5の視点から破骨細胞系譜の生命現象を解明する。具体的には、以下の二つの課題を本研究において定めた。

- (1) 破骨細胞系譜と骨組織におけるABCトランスポーターAbca5の検出
- (2) 骨代謝にたいするABCトランスポーターAbca5の影響の解析

## 3. 研究の方法

- (1) 破骨細胞系譜と骨組織におけるABCトランスポーターAbca5の検出

Mochizukiらの方法(Mochizuki et al. J. Immunol., 177, 4360-4368, 2006)に従って、マウス骨髄細胞からマクロファージ、樹状細胞、破骨細胞共通の前駆細胞(BMM)を調製した。そして、BMMを高密度条件・M-CSF, RANKL, TGF- $\beta$ 存在下で培養し、破骨細胞を調製した。これと並行して、BMMをM-CSF存在下で培養して、マクロファージを調製した。

破骨細胞とマクロファージから細胞溶解液を調製し、これを7.5%SDS-PAGEに供した。そして、ゲル内のタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。このニトロセルロース膜と抗Abca5モノクローナル抗体を反応させ、免疫ブロット法を用いてマクロファージと破骨細胞におけるAbca5の有無と発現量を比較した。一方、破骨細胞を象牙切片上で培養し、免疫電顕法を駆使して破骨細胞におけるAbca5の局在の観察を行った。

一方、骨組織におけるABCトランスポーターAbca5の検出は、受託解析を利用して行った。申請者は、6週齢の野生型雄マウスの骨組織を4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、脛骨と大腿骨を回収した。これをさらに4%パラホルムアルデヒドにて固定し、受託解析先に送付し、免疫組織染色を依頼した。

- (2) 骨代謝にたいするABCトランスポーターAbca5の影響の解析

6週齢になる雄および雌のAbca5遺伝子欠損マウス及び野生型マウス(各10-12匹)から採取した脛骨及び大腿骨をマイクロフォ

ーカスX線CTシステムにて解析した。

## 4. 研究成果

破骨細胞の発生と共に発現が上昇するATP-binding cassette (ABC)トランスポーターAbca5の視点から破骨細胞系譜の生命現象を解明するために、破骨細胞におけるABCトランスポーターの発現解析を行った。免疫ブロット法にて破骨細胞とマクロファージにおけるAbca5の発現を解析した結果、破骨細胞から調製した細胞溶解液中に抗Abca5モノクローナル抗体によって認識されるタンパク質が存在することが見出された。抗Abca5抗体の抗原認識に対する特異性及び当該タンパク質の分子量、マクロファージにおける存在量から、当該タンパク質がAbca5であると断定した。免疫ブロット法ではAbca5を検出することができたが、免疫電顕法および免疫組織染色法を用いた解析では、抗体特異的な染色は認められなかった。この結果は、現在使用中の抗体が未変性のAbca5タンパク質を認識しない可能性も示唆するため、これとは異なる抗体を用いた解析が必要であると考えられる。

一方、Abca5遺伝子欠損マウス及び野生型マウスから採取した脛骨及び大腿骨をマイクロフォーカスX線CTシステムにて解析した結果、得られた解析値の中央に分布する5点を選別して比較すると、Abca5遺伝子欠損雌マウスの骨密度と野生型雌マウスの骨密度との間に有意な差が認められた。この結果は、Abca5が雌マウスにおいて骨吸収の促進あるいは骨形成の抑制に關与している可能性を示している。今後は、測定値のばらつきの原因であると予測している「個体間の体長のばらつき」とAbca5の機能との因果関係について、その可能性を行う必要があると考えている。

## 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4件)

- ① Nakagawa, H., Toyoda, Y., Wakabayashi-Nakao, K., Tamaki, H., Osumi, M., and Ishikawa, T. Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of ABC transporters: A new aspect of genetic polymorphisms and clinical impacts. J. Pharm. Sci., 100, 3602-3619, 2011, 査読有り
- ② Takahashi, K., Ikeda, N., Nonoguchi, N., Kajimoto, Y., Miyatake, S., Hagiya, Y., Ogura, S., Nakagawa, H., Ishikawa, T., and Kuroiwa, T. Enhanced

expression of coproporphyrinogen oxidase in malignant brain tumors: CPOX expression and 5-ALA-induced fluorescence.、Neuro Oncol.、13、1234-1243、2011、査読有り

- ③ Ishikawa, T., Nakagawa, H., Hagiya, Y., Nonoguchi, N., Miyatake, S., and Kuroiwa, T.、Key Role of Human ABC Transporter ABCG2 in Photodynamic Therapy and Photodynamic Diagnosis.、Advances in Pharmacological Science、2011、in press、査読有り

- ④ Wakabayashi-Nakao, K., Tamura, A., Toyoda, Y., Koshihara, S., Nakagawa, H., and Ishikawa, T.、Production of cells with targeted integration of gene variants of human ABC transporter for stable and regulated expression using the F1p recombinase system.、Methods Mol. Biol.、648、139-159、2010、査読有り

[学会発表] (計 27 件)

- ① 中川大, 齊藤光, 山乙教之, 広野修一, 石川智久、ヒトABCトランスポーター ABCG2 によるポルフィリン輸送とその阻害剤のQSAR解析、ポルフィリン - ALA学会、2011年5月7日、東京
- ② 高橋賢吉, 池田直廉, 野々口直助, 梶本宜永, 宮武伸一, 萩谷祐一郎, 小倉俊一郎, 中川大, 石川智久, 黒岩敏彦、アミノレブリン酸 (5-ALA) による脳腫瘍の蛍光強度とその調節因子について、ポルフィリン - ALA学会、2011年5月7日、東京
- ③ 松本健太郎, 萩谷裕一郎, 中川大, 大倉一郎, 小倉俊一郎、アミノレブリン酸を用いたポルフィリン蓄積に関わるトランスポーターの探索、ポルフィリン - ALA学会、2011年5月7日、東京
- ④ Sertel, S., Hartinger, EM., Eichhorn, T., Nakagawa, H., Fricker, G., Simon, CH., Plinkert, PK., und Efferth, T.、Artesunate und seine Derivate in der Anwendung gegen die HNSCC Zelllinie (UMSCC1)、Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V.、2010年5月11-16日、Wiesbaden
- ⑤ 井上裕貴, 池上洋二, 中川大, 佐野和美, 石川智久、ゲフィチニブはABCB1 および

ABCG2 による抗癌剤耐性のどちらをより選択的に克服するのか、日本がん分子標的治療学会、2010年7月7日、東京

- ⑥ Inoue, Y., Ikegami, Y., Nakagawa, H., Sano, K., Yoshida, H., and Ishikawa, T.、Selectivity of gefitinib to ABCB1 and ABCG2 with respect to its potential of transport inhibition and restoration of drug resistance in cancer cells.、日本薬物動態学会、2010年10月7-9日、大宮
- ⑦ 豊田優, 櫻井亜季, 太田郁子, 坂井靖夫, 五味常明, 中川大, アレキサンダーレジヤバ, 中島正洋, 吉浦孝一郎, 林崎良英, 新川詔夫, 石川智久、Genetic polymorphism of human ABCC11 as a determinant of earwax type, axillary osmidrosis, and the risk of breast cancer.、日本人類遺伝学会、2010年10月27-30日、大宮
- ⑧ Wakabayashi-Nakao, K., Aw, W., Nakagawa, H., Furukawa, T., Lezhava, A., Hayashizaki, Y., and Ishikawa, T.、Detection of the SNP Q141K in the ABCG2 gene by the SmartAmp method: Molecular biological rationale and clinical applications for gout risk prediction.、日本分子生物学会、2010年12月7-10日、神戸
- ⑨ Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Toyoda, Y., Furukawa, T., Tamaki, H., Osumi, M., and Ishikawa, T.、ERAD of genetic variants of human ABC transporters ABCG2 and ABCC11. 日本分子生物学会、2010年12月7-10日、神戸
- ⑩ 浅井みどり, 李永實, 中川大, 二宮禎, 小澤英浩, 山口宏二, 米澤貴之, 車炳允, 照屋俊明, 大西素子, 永井和夫, 禹濟泰、骨粗鬆症モデルマウスにおけるfargesinの骨代謝調節作用、日本動物細胞工学会、2011年7月22-23日、東京
- ⑪ 夏目矩行, 米澤貴之, 車炳允, 中川大, 照屋俊明, 永井和夫, 禹濟泰、月桃(ゲットウ)由来の骨代謝調節物質の単離・精製及び生物活性、日本動物細胞工学会、2011年7月22-23日、東京
- ⑫ 吉田将人, 石田恵崇, 竹内久征, 中川大, 土井隆行、固相法を用いたDestruxin類縁体の全合成と生物活性評価、有機合成化学セミナー、2011年8月31日-9月1日、

山形

- ⑬ Inoue, Y., Ikegami, Y., Nakagawa, H., Sano, K., Yoshida, H., and Ishikawa, T., The Effect of Gefitinib on Antitumor Activity of Irinotecan.、日本癌学会、2011年10月3-5日、名古屋
- ⑭ Matsumoto, K., Hagiya, Y., Nakagawa, H., Ishikawa, T., and Ogura, S., Screening of transporters involved in porphyrin accumulation after administration of 5-aminolevulinic acid in vitro.、日本癌学会、2011年10月3-5日、名古屋
- ⑮ Toyoda, Y., Nakagawa, H., Nakashima, M., Yoshiura, K., Niikawa, N., and Ishikawa, T., Genetic polymorphisms in human ABC transporter ABCC11 gene.、ABC Symposium 2011 in Kyoto、2011年11月16-17日、京都
- ⑯ Nakagawa, H., Tamura, A., Li, S., Aida-Hyugaji, S., Regasini LO, Bolzani Vda S, Hirose, S., Ishikawa, T., Fricker, G., and Efferth, T., The low polarity and planar structure of guanidine alkaloids contribute to their interaction with human ABC transporter ABCB1.、ABC Symposium 2011 in Kyoto、2011年11月16-17日、京都
- ⑰ Nakagawa, H., Wakabayashi-Nakao, K., Toyoda, Y., and Ishikawa, T., Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of human ABC transporter ABCG2: A new aspect of genetic polymorphisms and clinical impacts.、ABC Symposium 2011 in Kyoto、2011年11月16-17日、京都
- ⑱ Inoue, Y., Ikegami, Y., Nakagawa, H., Sano, K., Yoshida, H., and Ishikawa, T., The Effect of Gefitinib on Antitumor Activity of Irinotecan.、日本薬物動態学会、(2011年11月16-18日、広島
- ⑲ Toyoda, Y., Sakurai, A., Sakai, Y., Gomi, T., Nakagawa, H., Nakashima, M., Yoshiura, K., Niikawa, N., and Ishikawa, T., Genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCC11 and apocrine glands.、The International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics; Integration of Basic Science, Drug Development and Regulation、2012年1月16-18日、東京
- ⑳ Wakabayashi-Nakao, K., Nakagawa, H., Toyoda, Y., and Ishikawa, T., Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of human ABC transporter ABCG2: A new aspect of genetic polymorphisms and clinical impacts.、The International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics; Integration of Basic Science, Drug Development and Regulation、2012年1月16-18日、東京
- 21 Nakagawa, H., Tamura, A., Li, S., Aida-Hyugaji, S., Regasini LO, Bolzani Vda S, Hirose, S., Efferth, T., Fricker, G., and Ishikawa, T., The low polar and planar structure of aminoguanidine alkaloid contributes to the interaction with human ATP-binding cassette transporter ABCB1.、The International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics; Integration of Basic Science, Drug Development and Regulation、2012年1月16-18日、東京
- 22 桂川美咲, 秋山智美, 伊藤守弘, 伊藤康彦, 中川大, 永井和夫, 禹濟泰, 車炳允, 飯田加賀美, 大西素子, U937細胞における抗CD98抗体依存性細胞融合阻害物質の探索、日本農芸化学会、2012年3月22-26日、京都
- 23 夏目矩行, 長谷川森一, 米澤貴之, 車炳允, 中川大, 照屋俊明, 永井和夫, 禹濟泰, 骨芽細胞の分化に対する月桃由来化合物の作用、日本農芸化学会、2012年3月22-26日、京都
- 24 松本健太郎, 萩谷裕一郎, 中川大, 石川智久, 大倉一郎, 小倉俊一郎、アミノレブリン酸添加後のポルフィリン蓄積に関わるトランスポーターの探索. 日本化学会、2012年3月25-28日、東京
- 25 井上裕貴, 池上洋二, 中川大, 佐野和美, 吉田久博, 石川智久、ゲフィチニブによるCPT-11の抗腫瘍効果に対する影響、日本薬学会、2012年3月28-31日、札幌
- 26 Toyoda, Y., Sakurai, A., Sakai, Y., Gomi, T., Nakagawa, H., Nakashima, M., Yoshiura, K., Niikawa, N., and Ishikawa, T., The relationship

between the function of ABCC11 and apocrine gland development in humans.、The FEBS-ABC2012 - 4th FEBS Special Meeting on ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases、2012年3月3-9日、Innsbruck

- 27 Nakagawa, H., Tamura, A., Li, S., Aida-Hyugaji, S., Regasini LO, Bolzani Vda S, Hirose, S., Ishikawa, T., Fricker, G., and Efferth, T.、The combination of isoprenyl and guanidium core structural units influences the affinity level of guanidine alkaloid for human ATP-Binding Cassette Transporter ABCB1. The FEBS-ABC2012 - 4th FEBS Special Meeting on ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases、2012年3月3-9日、Innsbruck

[図書] (計4件)

- ① 豊田優, Wanping Aw, Alexander Lezava, 中川大, 林崎良英, 石川智久. (2011). ヒトABCトランスポーターのファーマコゲノミクス: 迅速SNP検出法の開発. 遺伝子医学MOOK, 株式会社メディカルドゥ, 19, 160-167.
- ② 中川大, 豊田優, 中尾(若林)香菜子, 石川智久. (2011). 小胞体におけるABCトランスポーターの品質管理 —ユビキチン-プロテアソーム経路による新生ABCG2蛋白質の除去—. 遺伝子医学MOOK, 株式会社メディカルドゥ, 19, 230-235.
- ③ 中川大, 禹濟泰. (2011). カテキン. 機能性食品素材の骨と軟骨への応用, シーエムシー出版, 141-149.
- ④ 豊田優, 中川大, 石川智久. (2011). VI-2 ABCC11 遺伝子の機能. 腋臭症・多汗症治療実践マニュアル, 123-129.

[その他]

ホームページ等

[http://www3.chubu.ac.jp/faculty/nakagawa\\_hiroshi/](http://www3.chubu.ac.jp/faculty/nakagawa_hiroshi/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 大 (NAKAGAWA HIROSHI)  
中部大学・応用生物学部・講師  
研究者番号: 40397039

(2) 研究分担者  
無し ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
無し ( )

研究者番号: