

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成23年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 補助事業期間 平成23年度～平成25年度

5. 課題番号

2	3	5	9	2	2	1	4
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題 破骨細胞における新規DAP12会合受容体の機能解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
3 0 2 9 4 2 8 4	キタガワ ノリヒロ 北川 教弘	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

本申請では破骨細胞における新規DAR分子Siglec-15/RAD10の骨代謝における意義、またその作用機序をin vivoおよびin vitroで明らかにすることを目標とする。
 in vitro 分化誘導系を用いた解析から、Siglec-15遺伝子を発現抑制すると多核細胞形成が顕著に低下することが明らかとなった。これまでの知見とあわせてSiglec-15はDAP12とともに働き、破骨細胞の多核化ならびにアクチンリング形成を制御することにより成熟破骨細胞の形成に必須な働きを担うと結論付け、本成果を学術論文として報告し受理された（研究発表論文参照）。
 骨代謝におけるSiglec-15の機能を検討するため、Siglec-15遺伝子欠損マウスを作成した。交配実験の結果Siglec-15遺伝子欠損マウスはメンデルの法則に従い出現することが確認された。本マウス由来破骨細胞ではSiglec-15タンパク質の発現は認められなかった。Siglec-15遺伝子欠損マウス由来破骨細胞では、Siglec-15遺伝子発現抑制細胞と同様に多核細胞形成の顕著な低下が認められた。本マウスはマウス3系統が混合した遺伝子背景にあるため、戻し交配によりC57BL/6純系の遺伝子改変マウス作成を試みている。
 Siglec-15の機能には他タンパク質と複合体を形成して働くことが予想される。His6タグおよびFLAGタグをタンデムにC末端に付加したSiglec-15を破骨細胞に強制発現させ、その細胞抽出液からNi-NTAレジンならびに抗FLAG抗体ビーズを用いたアフィニティー生成によりSiglec-15複合体を精製する条件設定に成功した。現在会合タンパク質の同定を試みている。

10. キーワード

(1) 破骨細胞	(2) 骨吸収	(3) NFATc1	(4) ITAM
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

本年度はSiglec-15遺伝子欠損マウスの作出に成功したが、本マウスの骨代謝ならびに骨組織の解析は未だなしえていない。これはノックアウトマウス作成時に129系由来ES細胞を用いたため、得られる遺伝子改変マウスの遺伝的背景が通常解析に用いられるC57BL/6とは異なるため戻し交配を行う必要があるためであり、想定内である。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

1. 戻し交配によりC57BL/6純系Siglec-15遺伝子欠損マウスの樹立を行い、骨形態計測や骨代謝マーカーの測定を行うことで、Siglec-15遺伝子の生理的条件下における意義を検討する。可能であればDAP12遺伝子およびFcR γ 遺伝子欠損マウスとの交配し、Siglec-15遺伝子欠損マウスと二重変異マウスの骨形態を比較する。Siglec-15遺伝子欠損マウスが骨量増加を示した際には、Siglec-15/DAP12キメラ変異体を破骨細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成する。
2. Siglec-15会合タンパク質を探索する。見出された会合タンパク質の機能をRNA干渉法により検討する。
3. Siglec-15/DAP12キメラ変異体トランスジェニックマウスをDAP12遺伝子欠損マウスやSiglec-15遺伝子欠損マウスと交配し、これらマウスの骨代謝や骨組織を検討することにより、Siglec-15が破骨細胞における重要なDARとして機能するのかについて検討する。
4. Siglec-15ならびにSiglec-15会合タンパク質に対するモノクローナル抗体を作成し、本抗体をマウスに投与した際の骨形態の変化を検討することで、Siglec-15/DAP12経路を標的とした抗体医薬の可能性を検討する。

(次年度の研究費の使用計画)

平成23年度に未使用額が生じた要因は、研究の進捗状況に合わせ予算執行計画を変更したことに伴うものである。特にSiglec-15遺伝子欠損マウスの骨形態計測ならびに骨代謝の評価するためには当マウスの遺伝的背景をC57BL/6に純化する必要があり、本解析を次年度に繰り越したことが理由である。

次年度の請求額と合わせての執行計画は以下のとおりである。Siglec-15遺伝子欠損マウスの骨組織および骨代謝の解析のために骨形態計測委託費や骨代謝マーカー測定キットなどの消耗品の購入、本マウス系統維持のための凍結サービスに使用する。細胞培養や生化学・分子生物学的手法における消耗品や試薬・酵素類を購入する。また研究成果発表のための雑誌投稿料ならびに学会参加費とその旅費に予算を執行する。

13.研究発表(平成23年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(4)件 うち査読付論文 計(4)件

著者名		論文標題			
Ishida-Kitagawa N, Tanaka K, Bao X, Kimura T, Miura T, Kitaoka Y, Hayashi K, Sato M, Maruoka M, Ogawa T, Miyoshi J, Takeya T.		Siglec-15 protein regulates the formation of functional osteoclasts in concert with DNAX-activating protein of 12 KDa (DAP12).			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
The Journal of Biological Chemistry	有	in press	2 0 1 2	in press	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
-					

著者名		論文標題			
Maruoka M, Sato M, Yuan Y, Ichiba M, Fujii R, Ogawa T, Ishida-Kitagawa N, Takeya T, Watanabe N.		Abi1-bridged tyrosine phosphorylation of VASP by Abelson kinase impairs association of VASP to focal adhesions and regulates leukemic cell adhesion.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Biochemical Journal	有	441	2 0 1 2	889-99	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1042/BJ20110951					

著者名		論文標題			
Morita Y, Ono A, Serizawa A, Yogo K, IshidaKitagawa N, Takeya T, Ogawa T.		Purification and identification of lactoperoxidase (LPO) in milk basic proteins (MBP) as an inhibitor of osteoclastogenesis.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Journal of Dairy Science	有	94	2 0 1 1	2270–9	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.3168/jds.2010-4039					

著者名		論文標題			
Bahtiar A, Nakamura T, Kishida K, Katsura J, Nitta M, Ishida-Kitagawa N, Ogawa T, Takeya T.		The L-Ser analog #290 promotes bone recovery in OP and RA mice.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Pharmacological Research	有	64	2011	203-9	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1016/j.phrs.2011.05.004					

(学会発表) 計(4)件 うち招待講演 計(1)件

発表者名		発表標題		
Norihiro Ishida-Kitagawa		Identification of a novel partner of DAP12 in the regulation of actin-ring formation in osteoclasts		
学会等名	発表年月日	発表場所		
2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting	2011年9月6日	ゴールドコースト、オーストラリア		

発表者名		発表標題		
Norihiro Ishida-Kitagawa		Identification of a novel partner of DAP12 in the regulation of actin-ring formation in osteoclasts		
学会等名	発表年月日	発表場所		
ICPAPS2011(招待講演)	2011年7月19日	ジョグジャカルタ、インドネシア		

発表者名		発表標題		
北川(石田)教弘		破骨細胞における新規DAP12会合膜タンパク質の機能解析		
学会等名	発表年月日	発表場所		
第29回日本骨代謝学会学術集会	2011年7月29日	大阪		

発表者名		発表標題	
北川(石田)教弘		破骨細胞における新規DAP12会合膜タンパク質の機能解析	
学会等名		発表年月日	発表場所
第34回日本分子生物学会年会		2011年12月15日	横浜

〔図書〕計(0)件

著者名		出版社		
書名			発行年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

--