

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29年度）

所属研究機関名称		奈良先端科学技術大学院大学	機関番号	14603
研究代表者	部局	バイオサイエンス研究科		
	職	助教		
	氏名	北川 教弘		

1. 研究種目名 基盤研究(C)(一般) 2. 課題番号 17K11008

3. 研究課題名 Siglec-15-DAP12複合体の骨代謝における意義とその作用機構の解明

4. 補助事業期間 平成29年度～平成31年度

5. 研究実績の概要

シグナルモチーフITAMを有するDAP12は成熟破骨細胞形成に必須であるが、その制御機構は未だ不明な点が多い。研究代表者は、培養細胞系ではSiglec-15がDAP12会合受容体として機能し成熟破骨細胞形成に必須であることをこれまでに報告している。またSiglec-15-DAP12複合体を一分子で模倣するキメラタンパク質改良型SSDKAの作出に成功している。以上を踏まえて、今年度は以下2点について検討し、一定の成果をあげた。

1) 我々はこれまでにSiglec-15遺伝子欠損マウスならびに破骨細胞特異的に改良型SSDKAを発現するトランスジェニックマウスを樹立している。本研究では両マウスを交配させ得られた産仔の骨組織を解析することで、改良型SSDKAの発現がSiglec-15遺伝子欠損マウスの呈する大理石骨病を回復する可能性を検討する。本年度は1-1) 各遺伝子型のメスマウスから骨組織を採取した。また培養細胞系を用いた解析から、トランスジェニックマウス由来破骨細胞では1-2) 改良型SSDKAの発現は前駆細胞では認められず分化に伴い誘導されること、1-3) 成熟破骨細胞が形成し得ないSiglec-15遺伝子欠損マウス由来破骨細胞が改良型SSDKAの発現により回復すること、を確認した。

2) マウスマクロファージ細胞株RAW264を用いて、ゲノム編集により複数のDAP12遺伝子欠損細胞の樹立に成功した。DAP12遺伝子欠損マウス由来破骨細胞と同様にDAP12遺伝子欠損RAW264細胞株では成熟破骨細胞の形成が認められなかった。これら細胞株にDAP12を強制発現させると成熟破骨細胞の形成が回復した。さらに改良型SSDKAをDAP12遺伝子欠損細胞株に発現させると成熟破骨細胞の形成がITAM依存的に回復した。以上の結果はSiglec-15が破骨細胞におけるDAP12会合受容体として十分条件であることを強く支持する。

6. キーワード

骨代謝 糖鎖 シグナル伝達 免疫学 破骨細胞

7. 現在までの進捗状況

区分 (2) おおむね順調に進展している。

理由

1) 平成29年度内にSiglec-15遺伝子欠損背景における破骨細胞特異的改良型SSDKAの発現が骨代謝に及ぼす影響についてμCTを用いた検証を行う予定ではあったが、本年度は統計解析に十分な数のマウス骨組織の採取までにとどまった。これは1) 飼育施設のキャパシティーに限られていること、2) 材料採取に用いる遺伝子型メスマウスの出現頻度が低いこと、があげられる。

2) 予定よりも早くDAP12遺伝子欠損RAW264細胞株が作成されたので、本来平成30年度に予定していた改良型SSDKAの遺伝子導入実験を先行させることができた。改良型SSDKAを遺伝子導入したDAP12遺伝子欠損RAW264細胞では成熟破骨細胞形成能を回復していることから、破骨細胞におけるDAP12会合受容体はSiglec-15が十分条件であることを示し得た。この知見から次年度以降に計画していたDAP12遺伝子欠損マウスを作成・導入し、破骨細胞特異的に改良型SSDKAを発現するトランスジェニックマウスと交配させることで、破骨細胞におけるDAP12会合受容体はSiglec-15が十分条件であることをマウス個体レベルで示し得る可能性が高まった。

3) 計画当初は改良型SSDKA会合タンパク質の探索を予定していたが、本年度はSiglec-15細胞質内機能領域の探索を先行させ、その結果現在鍵となるアミノ酸配列が明らかになりつつある。本知見はSiglec-15-DAP12複合体の制御機構を理解する上で新たな視点となりうることから、申請当初の予想される結果に比べてより質の高い研究が推進できると期待される。

3版

8. 今後の研究の推進方策

- 1) 前年度採取した各種遺伝子型マウス由来大腿骨および脛骨の構造をμCTにより解析し、Siglec-15遺伝子欠損背景における大理石骨病が破骨細胞特異的に発現する改良型SSDKAにより回復するかを検討する。改良型SSDKAはDAP12を介さずに一分子でSiglec-15-DAP12複合体を模倣するため、回復が認められた場合はSiglec-15が破骨細胞内でDAP12会合受容体として機能することを生体骨組織で示すことが可能となる。また回復が認められた場合は、Siglec-15遺伝子欠損マウスとトランスジェニックマウスを交配し、得られた産子の骨形態計測を外部機関に依頼する。
- 2) DAP12遺伝子欠損マウスを保有する研究室に共同研究を申し出て、同マウスを本学遺伝子実験施設で飼育する。共同研究が成立しなかった場合、本学動物実験施設にてゲノム編集により遺伝子欠損マウスを独自に作成する。ゲノム編集用ベクターは作成済みであり、前年度の研究からRAW264細胞を用いた研究で使用実績があるものを利用する。
- 3) 我々は前年度にST6GALNACX (仮称) 遺伝子ゲノム編集ベクターを導入・クローン化したRAW264細胞を樹立している。本年度はこれらクローンのゲノム配列を確認し、遺伝子欠損細胞を同定する。得られたクローンを分化誘導し、その表現型を解析する。
- 4) タグを付加した改良型SSDKAをSiglec-15もしくはDAP12欠損破骨細胞に発現させ、アフィニティー精製法および質量分析法により会合タンパク質を探索し同定する。一般的に糖鎖-レクチンの会合は親和性が低いが、細胞外のみで働く架橋剤を利用することでこの問題を解決する。

9. 次年度使用が生じた理由と使用計画

- (理由) 本年度に予定していた各種遺伝子改変マウス由来骨のμCT解析や骨形態計測の外注が遂行できなかった。また改良型SSDKA会合タンパク質の探索を、「現在までの進捗状況」欄に記載した理由からあえて遂行しなかった。このため、これらに関わる経費が次年度以降に持ち越された結果による。
- (使用計画) 我々はμCT解析を他研究機関との共同研究で遂行する協力体制を確立している。本年度繰り越した経費を用いて、採取した各種遺伝子改変マウス由来骨のμCT解析を共同研究先で解析するための旅費として使用する。またこの結果改良型SSDKAが、Siglec-15遺伝子欠損マウスが呈する大理石骨病を回復しえた場合、骨形態計測を外注した骨代謝マーカーを測定する際の試薬購入費にあてる。また改良型SSDKA会合タンパク質の探索・同定に必要な試薬、学内質量分析サービスの利用に使用する。

10. 研究発表(平成29年度の研究成果)

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Norihiro Ishida-Kitagawa
2. 発表標題 Cell proliferation and differentiation as target of therapy.
3. 学会等名 The 2nd Universitas Muhammadiyah Purwokerto-Pharmacy International Conference(UMP-PIC) And 8th Indonesian Society for Cancer Chemoprevention (ISCC) Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

11. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

計0件(うち出願0件/うち取得0件)

12. 科研費を使用して開催した国際研究集会

計0件

13. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

-

14. 備考

-