

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09757

研究課題名(和文) アネキシンA5の中枢と末梢における機能とAAV投与による遺伝子治療への展開

研究課題名(英文) Functional roles of Anxa5 in the central and peripheral nervous systems and application of AAV administration to gene therapy

研究代表者

小松 浩一郎 (Komatsu, Koichiro)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：60153665

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)：Ca結合性アネキシンの1つAnxa5は腱・靭帯の骨付着部(enthesis)に局在し、K0マウスではenthesisで骨増大が起きる。本研究では Anxa5をin vitroでノックダウン後、遺伝子発現の解析、K0マウスで石灰化制御因子の解析から、enthesisでのAnxa5の石灰化制御にはピロリン酸制御因子と機械的刺激が介在する可能性を見出した。enthesisで骨増大を示すK0マウスはうつ病様行動を示すが、新たに運動制御機能の低下を見出した。この表現型は中枢細胞でのAnxa5欠損に起因することが示唆された。K0マウスでの表現型に対しリコンビナントタンパクによるレスキューが課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義： 腱・靭帯の骨への付着部は運動機能の上で重要な機能を担っている。本研究によりAnxa5の末梢、中枢における機能を介したenthesisへの関与を明らかにすることは、enthesisの中枢・末梢における制御機構の解明に寄与できる。マウスにおけるAnxa5のうつ病様行動への影響のメカニズムを明らかにすることにより、海外研究協力者が同定したヒトにおける遺伝子変異を持った患者の病態発症メカニズム解明に寄与できる。社会的意義： Anxa5リコンビナントタンパク投与によるレスキューから得られる結果は、ヒトAnxa5欠損による病態の治療法に応用できる可能性を有すると言う点で、社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：One of the Ca binding proteins, Annexin group, Anxa5 is localized to bone attachments of tendon and ligament (enthesis). We have found that Anxa5 KO mice have bone overgrowths at entheses. The present analyses of gene expression in knockdown cells and immuno-histology using tissue sections of KO mice showed that mineralization at the enthesis may be regulated by pyrophosphates and/or mechanical loading. Anxa5 KO mice with bone overgrowths at entheses exhibit depression behavior. A behavior testing revealed that KO mice exhibit decreases of regulation of physical function. We suggest that this phenotype is due to deletions of Anxa5 localizations in the central nervous system.

Rescue experiment with recombinant protein for the phenotypes of KO mice would be required.

研究分野：硬組織石灰化制御の薬理学的応用

キーワード：腱・靭帯の骨接合部 アネキシン 荷重負荷 石灰化制御因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 腱・靭帯附着部(enthesis)は腱・靭帯と骨の間に線維軟骨層が介在する線維軟骨性の付着と、これらが介在しない線維性の付着に分類されている。
Ca結合性アネキシン類の1つ、アネキシンA5(Anxa5)は、細胞膜裏打ちタンパク質として多様な機能が報告されており、骨芽細胞ではメカニカルセンサーとしての機能が示唆されている。Anxa5は全身のenthesisで発現が認められている。軟骨細胞にも存在し、タイプ 、 、 コラーゲンと結合する。我々はこのアネキシンA5に着目し、Anxa5遺伝子のコード領域にlacZを挿入したAnxa5機能欠損マウス(Anxa5^{-/-})の表現型を調べたところ、興味深いことに生後7週以降でenthesisにおいて野生型に比べ局所的な骨の増大を見出した(Shimada et al., 2018)。更に、Anxa5^{K0}マウス前脛骨筋の腱を切断したところ、enthesisでの表現型発症が減少した。これらの結果はAnxa5がenthesis石灰化を荷重依存性に負に制御することを示唆する。
- (2) 一方、強制水泳試験、尾懸垂試験、十字迷路法のような行動実験の観察から、Anxa5^{K0}マウスはうつ病様の行動を示すことが示唆されている (Yonezawa et al., unpublished)。

2. 研究の目的

上記した様に Anxa5 は enthesi s に局在し、Anxa5^{K0} マウスでは enthesi s で骨の増大が起きる。本研究ではこの表現型の発症メカニズム解析と、うつ病様行動と enthesi s での石灰化亢進との関連性の追求を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) Anxa5 AAV ベクターの作成
予備実験として作成した GFP AAV ベクターをマウスアキレス腱の enthesi s 付近に注射し導入率を調べた。
- (2) *in vitro* 実験にはマウス初代腱細胞、軟骨細胞、骨芽細胞を用いた。
遺伝子発現の解析
初代細胞において siRNA によって Anxa5 ノックダウンをした。ノックダウン細胞及び対照細胞から通法に従い RNA を抽出し、RT-realtimePCR 法によって ANK, ENPP1, ALP 等の遺伝子発現を解析した。
伸展刺激実験
初代培養軟骨細胞を用い、Anxa5 ノックダウン後に伸展刺激を加えた。その後、 に記述した様に遺伝子発現を解析した。
- (3) *in vivo* 実験には Anxa5 WT および K0 マウスを用いた。
免疫組織学
摘出した後肢を固定、脱灰後、enthesis の組織切片を作成した。その切片を用いた免疫組織学によって Anxa5^{K0} による ANK および ENPP1 陽性細胞への影響を解析した。
腱切除実験
麻酔下で、後肢前脛骨筋の腱組織を切除することで、骨への付着部への力学的負荷を軽減した。 で述べた免疫組織学で力学的負荷軽減による ANK, ENPP1 陽性細胞への影響を解析した。
行動実験
尾懸垂試験と強制水泳試験によって、また新たにロタロッド試験によっても、Anxa5 WT および K0 マウスにおける行動を比較解析した。更に Anxa5^{+/-} マウス脳切片を用い LacZ 染色によって観察した LacZ 陽性細胞局在を解析した。

4. 研究成果

- (1) 予備実験において GFP AAV ベクターの導入率が低かった。従って、リコンビナントタンパクによるレスキューを考えている。
- (2) Anxa5 を *in vitro* でノックダウンしたところ、軟骨細胞と腱細胞で ALP 発現の増加及び ANK 発現の低下、ENPP1 発現は軟骨細胞で低下、腱細胞では増加した。K0 マウス enthesi s 組織は ALP 及び ENPP1 陽性細胞の増加と ANK 陽性細胞の減少が認められた。
初代培養軟骨細胞では Anxa5 ノックダウン及び対照細胞共に伸展刺激後に ANK 及び ENPP1 の発現が上昇した。
- (3) Anxa5^{K0} マウス enthesi s 組織は ALP 及び ENPP1 陽性細胞の増加と ANK 陽性細胞の減少が認められた。
腱切除 8 週後に ANK 及び ENPP1 の陽性細胞は WT マウスで腱切除側で腱非切除側と比べ減ったが K0 マウスで腱切除は影響しなかった。

(2)(3)の考察

enthesis での Anxa5 による石灰化制御にはピロリン酸制御因子が介在する可能性が考えられた。また、Anxa は機械的センサーとして働き、石灰化負の制御は機械的刺激によって促進される可能性が考えられた。

- (4) Anxa5 KO マウスでのうつ病様行動は行動実験によって再確認した。また新たなロタロッド試験の解析から Anxa5 欠損が運動制御機能や疲労耐性を低下させることを見出した。更に、大脳皮質、視床、視床下部、第三脳室と側脳室の上皮細胞、小脳に LacZ 陽性細胞が認められた。従って、これらの表現型は中枢特定細胞での Anxa5 欠損に関係することが示唆された。
- (5) 海外協力者が見出した Anxa5 に突然変異を持つ患者は関節痛とうつ病様症状を示す。本プロジェクトは Anxa5KO マウスがこの病態に対する有望な動物モデルとなる可能性を明らかにした。KO マウスでの類似表現型メカニズム解析から、病因は主として局所 Anxa5 欠損であろうが中枢と末梢の相互作用の可能性も残る。
- (6) リコンビナントタンパクによる KO マウス表現型に対するレスキューは非常に興味あるところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akemi Shimada, Koichiro Komatsu, Mototsugu Chiba	4. 巻 24
2. 論文標題 Measurement of tissue pressure within the tooth socket, using a servo-controlled counterpressure system, of the rat incisor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Journal of Scientific & Technical Research	6. 最初と最後の頁 17939-17947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26717/BJSTR.2019.24.003991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hisashi Ideno, Kazuhisa Nakashima, Koichiro Komatsu, Ryoko Araki, Masumi Abe, Yoshinori Arai, Hiroshi Kimura, Yoichi Shinkai, Makoto Tachibana, Akira Nifuji	4. 巻 137
2. 論文標題 G9a is involved in the regulation of cranial bone development through activation of Runx2 function during development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akemi Shimada, Hisashi Ideno, Yoshinori Arai, Koichiro Komatsu, Satoshi Wada, Teruhito Yamashita, Norio Amizuka, Ernst Pöschl, Bent Brachvogel, Yoshiki Nakamura, Kazuhisa Nakashima, Hiroaki Mizukami, Yoichi Ezura, Akira Nifuji	4. 巻 33(8)
2. 論文標題 Annexin A5 involvement in bone overgrowth at the enthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Bone Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1532-1543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbmr.3453	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Komatsu K, Ideno H, Arai Y, Wada S, Nakashima K, Yamashita T, Nifuji A.
2. 発表標題 Annexin A5 KO promotes the mineralization of tendon/ligament entheses
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小松浩一郎、出野 尚、中島和久、新井嘉則、江面陽一、二藤 彰
2. 発表標題 アネキシンA5と荷重負荷による腱・靭帯付着部におけるANK及びEnpp1の制御
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hisashi Ideno, Koichiro Komatsu Kazuhisa Nakashima, Yoshinori Arai, Yoichi Ezura, and Akira Nifuji
2. 発表標題 Annexin A5 is involved in biomineralization at enthesis thorough regulation of ANK expression by mechanical stimuli
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島和久、小松浩一郎、出野 尚、山下照仁、宇田川信之、二藤 彰
2. 発表標題 タンパク質の過剰発現は破骨細胞前駆細胞の分化・融合を抑制する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、今西康雄、雨宮俊彦、新井嘉則、江面陽一、二藤 彰
2. 発表標題 Annexin A5は咬合力誘導性の骨増大、歯根膜拡大ならびにエナメル質咬耗を抑制する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、立花 誠、木村 宏、二藤 彰
2. 発表標題 G9aはRunx2の機能を調節してマウス頭蓋の骨形成を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、江面陽一、二藤 彰
2. 発表標題 Annexin A5はenthesisの細胞外ピロリン酸と力学的負荷に対する反応の調節により石灰化を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松浩一郎、出野 尚、中島和久、山下照仁、宇田川信之、立花 誠、二藤 彰
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素G9aは破骨細胞分化を負に制御する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisashi Ideno, Yoshinori Arai, Koichiro Komatsu, Kazuhisa Nakashima, Satoshi Wada, Teruhito Yamashita, Ernst Poschl, Bent Brachvogel, Yoichi Ezura, Akira Nifuji
2. 発表標題 Annexin A5 prevents force-mediated bone ridge overgrowth at the enthesis
3. 学会等名 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島和久、小松浩一郎、出野 尚、山下照仁、宇田川信之、二藤 彰
2. 発表標題 タンパク質の過剰発現は破骨細胞前駆細胞の融合を抑制する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陳 文、内田萌菜、米澤智洋、小松浩一郎、中島和久、出野 尚、二藤 彰、汾陽光盛
2. 発表標題 アネキシンA5欠損マウスに認められる行動の変化に関するパイロットスタディ
3. 学会等名 第4回日本アネキシン研究会
4. 発表年 2018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	出野 尚 (Ideno Hisashi) (40435699)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	
研究分担者	米澤 智洋 (Yonezawa Tomohiro) (10433715)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	中島 和久 (Nakashima Kazuhisa) (90252692)	鶴見大学・歯学部・講師 (32710)	

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	江面 陽一 (Ezura Yoichi) (50333456)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師 (12602)	
研究分担者	二藤 彰 (Nifuji Akira) (00240747)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	

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