

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11932

研究課題名(和文) 歯の移動による骨改造現象におけるヘッジホッグ応答性転写因子Gli1の機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the involvement of hedgehog-Gli1 axis in the bone remodeling by tooth movement.

研究代表者

大久保 和美 (Ohkubo, Kazumi)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10396715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究グループは、顎顔面骨の骨代謝調節における骨改造現象へのヘッジホッグGli1シグナルの関与を明らかにするため、遺伝子改変マウスとゲノムワイド解析を用いた研究を行った。まず、Gli1-KOマウスを用いたマイクロCT解析の結果、野生型と比較して、頭蓋顔面骨形成の遅延が認められた。また骨髄由来間質細胞を用いた解析の結果、Gli1-KOにより骨芽細胞分化が抑制されることを確認した。次に、ゲノムワイド解析によりGli1の標的遺伝子群を網羅的に解析した結果、Gli1により制御される転写制御領域と機能的な標的遺伝子を得た。以上よりGli1下流のこれらの因子が、骨改造現象へ関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成体の骨組織は、骨基質の吸収と形成というダイナミックな現象(骨改造現象 - 骨リモデリング)により常に再構築され、その形態と機能のホメオスタシスを維持している。本研究では、遺伝子改変技術とゲノムワイド解析を駆使することで、ヘッジホッグ-Gli1経路の骨形成に対する作用を網羅的に研究した。ヘッジホッグシグナルは骨形成と骨吸収を司る重要なシグナル因子であるため、本研究結果は、顎顔面骨の骨代謝調節の基礎的な知見となるだけでなく、将来的に歯科矯正治療へ寄与する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify the involvement of Hedgehog-Gli1 axis in the regulation of bone metabolism in maxillofacial bone, we conducted an integrative study using mouse genetics and genome-wide analysis. First, micro-CT analysis in adult Gli1-KO mice revealed impaired craniofacial bone formation in Gli1-KO mice compared to wild-type mice. In vitro analysis using bone marrow-derived stromal cells confirmed the suppression of the osteoblast differentiation by Gli1-KO. A comprehensive genome-wide analysis revealed Gli1-mediated transcriptional regulatory regions and Gli1's functional target genes. These results suggest that those Gli1's downstream factors are involved in bone remodeling.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯科矯正学 ヘッジホッグ-Gli1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成体の骨組織は、骨基質の吸収と形成というダイナミックな現象(骨改造現象-骨リモデリング)により常に再構築され、その形態と機能のホメオスタシスを維持している。骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞が、骨組織に加わる種々の刺激に応答して、時間的・空間的に協調することで骨改造現象が起こる。骨改造現象に影響を与える重要な刺激の一つにメカニカルストレスが挙げられる。健常人の骨組織は常に適度なメカニカルストレスにさらされ、それによって適切な骨改造現象が行われることでホメオスタシスが維持されている。至適なメカニカルストレス条件下では、骨折治癒や骨延長時の骨形成などが促進されることが知られている。歯科矯正治療による歯の移動も、メカニカルストレスに応答して促進された骨改造現象を積極的に利用したものである。矯正力というメカニカルストレスに応答して、歯槽骨内においては圧迫側の骨吸収と牽引側の骨形成が繰り返され、骨代謝回転が亢進した骨改造現象の結果として歯の移動が達成される。このように、矯正力による歯槽骨の骨改造現象は歯科矯正治療の根幹をなす生体現象であるものの、その分子メカニズムは未だ詳細に明らかにされていないのが現状である。

本研究チームは、これまでヘッジホッグ(Hedgehog; Hh)シグナルに着目し、前述の骨発生のみならず、成体の骨代謝における役割を解析し、重要な知見を発表してきた。Hhシグナルの下流ではたらく転写因子Gliの中で、活性型GliであるGli1に着目して解析を進めたところ、Gli1ヘテロノックアウトマウスの長管骨は、骨形成と骨吸収のアンカップリングを伴う骨量低下を呈することが明らかとなった(1)。本知見は、Gli1が成体の骨改造現象に関与することを示しており、顎顔面骨の生理的な骨代謝調節、歯科矯正力作用時の歯槽骨の骨改造現象においても重要な役割を果たすことを示唆するものである。しかし、これまでにこの点を検証した報告は存在しなかった。

2. 研究の目的

顎顔面骨の骨代謝調節と歯科矯正治療における骨改造現象へのGli1の関与を明らかにすることを目的とする。以下の3つのサブプロジェクトを有する。

- ① 生理的条件下におけるGli1^{+/-}マウスの顎顔面骨代謝の解析
- ② 次世代シーケンサーを用いた骨髄由来間質系細胞におけるGli1下流遺伝子と相互作用分子の解析
- ③ Gli1^{+/-}マウス・Hh作動薬投与マウスの実験的歯の移動モデルを用いた歯科矯正学的・分子生物学的評価

3. 研究の方法

① 生理的条件下におけるGli1^{+/-}マウスの顎顔面骨代謝の解析

Gli1^{+/-}マウス(Gli1-KO)と野生型マウス(WT)の顎顔面骨についてX線撮影にて骨のサイズ、形状をマクロ的に評価した。さらにGli1-KOとWTマウスから間質系細胞を採取・培養して細胞分化実験を行った。ヘッジホッグアゴニストを加えた骨芽細胞分化誘導培地で異なる期間培養した細胞を用いて、アルカリフォスファターゼ染色による基質合成能と、Real time RT-PCRによる骨芽細胞分化マーカーの発現解析を行った。

②次世代シーケンサーを用いた骨髄由来間質系細胞におけるGli1下流遺伝子と相互作用分子の解析

間質系細胞におけるGli1の転写制御機構の解析のため、次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降sequencing(ChIP-seq)を行い、Gli1のゲノム結合領域の網羅的探索を行った。得られたデータを、バイオインフォマティクス的手法(2)を用いて解析することで、Gli1による転写制御機構をゲノムワイドに検討した。得られたGli1結合領域と関連する遺伝子群の機能を推定するため、Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool(GREAT)解析を行った。

次に、Gli1-KOとWT由来の間質系細胞のmRNA発現の比較を、次世代シーケンサーを用いたRNAsequencing(RNA-seq)により行った。さらに、ChIP-seq解析とRNA-seq解析の統合解析によりGli1の標的遺伝子候補を取得した。これらの候補領域におけるGli1の転写制御機構を明らかにするため、レポーターアッセイを行った。具体的には、転写制御領域のDNA配列を合成した後、ルシフェラーゼレポータープラスドベクター(pGL4-MiniP-Luc2)にクローニングした。ゲノムPCRによりDNA配列を増幅した後、サンガーシーケンスにより配列を確認した。その後、大腸菌の大量培養を行い、実験に必要な量のプラスミドDNAを得た。プラスミドDNAを線維芽細胞、間葉系細胞に導入した後、レポーター活性を確認した。

また、得られた候補遺伝子の機能検証のため、各遺伝子の発現ベクターあるいは siRNA ベクターを作製した後、培養細胞に導入して骨芽細胞分化誘導効果に与える影響を検討した。さらに、Gli1 のゲノム上での協働因子を明らかにするため、Gli1 ChIP-seq 解析で得られた Gli1 ゲノム結合領域を用いて、*de novo* モチーフ解析を行った。本解析では、転写開始点から 500 bp 以上遠位に位置する遠位エンハンサー候補領域の top 500 領域を用いて、MEME-ChIP プラットフォームを使用した。

4. 研究成果

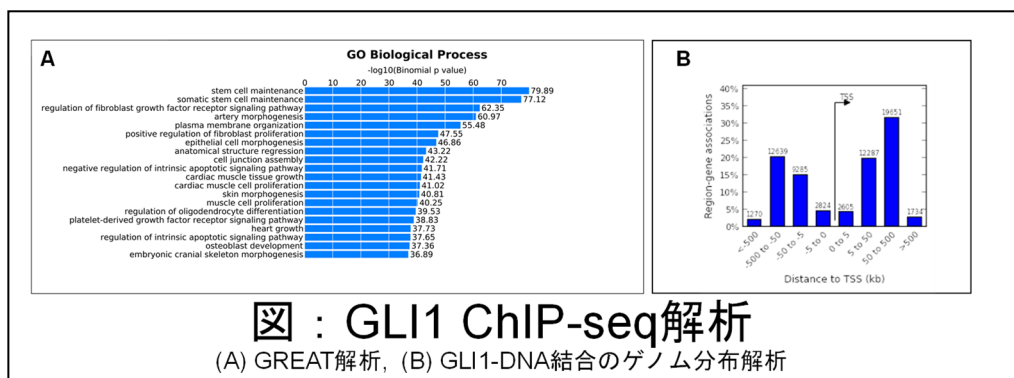
①生理的条件下における Gli1KO マウスの顎顔面骨代謝の解析

8 週齢 Gli1-KO と WT マウスにおいて、X線撮影にて骨のサイズ、形状を評価した。その結果、Gli1-KO において骨格形成の遅延が認められた。そこで、各遺伝型のマウスから採取した間質系細胞を用いて骨芽細胞の分化能を評価した。その結果、培養 7 日間、14 日間いずれにおいても Gli1-KO において骨芽細胞分化マーカーの発現が減少した。また、7 日間培養した細胞において、アルカリフォスファターゼ染色の染色性が Gli1-KO で減少した。

②次世代シーケンサーを用いた骨髄由来間質系細胞における Gli1 下流遺伝子と相互作用分子の解析

歯槽骨骨髄由来間質系細胞においては次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降 sequencing (ChIP-seq) に必要な細胞数を確保することが困難であったため、同細胞と似た分化能を有している複数の骨格系間葉系細胞を用いて ChIP-seq 解析を行い、Gli1 のゲノム結合領域の網羅的探索を行った。特異的抗体を用いた免疫沈降の効率を最大限高めるため、Gli1 遺伝子と 3xFlag の融合ペプチドをコードする遺伝子の融合遺伝子を細胞に発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。得られたシーケンサーデータの質を Fastqc ソフトウェアで確認した後、bowtie による mapping と cisgenome パッケージを用いたピークコーリングを含むバイオインフォマティクス的手法を用いて、Gli1 のゲノム DNA 結合領域を 33,414 か所同定した。

Gli1 結合領域と関連する遺伝子の機能を推定するために、GREAT 解析を行った。その結果、Gli1 結合領域は、幹細胞性の維持に関わる遺伝子群や骨芽細胞発生、頭蓋骨格形成に関連する遺伝子群との強い関連が示唆された (図 A)。また、Gli1 ゲノム結合領域のゲノム DNA 上での分布を解析したところ、最も近い遺伝子の転写開始点から 5 kb 以上離れた領域に位置することが大部分であった (図 B)。



モチーフ解析の結果、Gli1 ゲノム結合領域において、GLI のコンセンサスマチーフが最もエンリッチしていた。次にエンリッチしていたモチーフは RREB1 であった。しかし、RREB1モチーフのさらなる解析の結果、Gli1 ゲノム結合領域において特異的なエンリッチを示す可能性は低く、バックグラウンドのシグナルである可能性が示された。

次に、Gli1 下流遺伝子の解析を行った。Gli1-DNA 結合プロファイルと、遺伝子発現プロファイル (WT および Gli1KO 細胞の RNA-seq 解析) の統合解析の結果、標的候補遺伝子を複数見出した。これらの遺伝子の転写制御機構を明らかにするため、転写制御領域を有するレポータ遺伝子を構築し、実験に用いた。その結果、骨芽細胞の分化に従って、レポータ活性が上昇することが明らかになった。一方、線維芽細胞においては、骨芽細胞と比較してレポータ活性は低かった。

次に、得られた候補遺伝子の機能検証を行った。その結果、検討した転写因子の一つについて、ノックダウンにより骨芽細胞分化マーカーの発現が有意に減少することが明らかになった。効果の認められた遺伝子について、Gain-of-function 解析を行ったところ、骨芽細胞分化マーカーの上昇が確認された。

現在、得られた候補因子について、目的③Gli1^{+/-}マウス・Hh 作動薬投与マウスの実験的歯の移動モデルを用いた歯科矯正学的・分子生物学的評価のための準備を進めている。

<引用文献>

1. Kitaura Y, Hojo H, Komiyama Y, Takato T, Chung UI, and Ohba S. Gli1 haploinsufficiency leads to decreased bone mass with an uncoupling of bone metabolism in adult mice. *PLoS One* 9, e109597, 2014
2. Hojo H, Ohba S, He X, Lai LP, and McMahon AP. Sp7/Osterix is restricted to bone-forming vertebrates where it acts as a Dlx co-factor in osteoblast specification. *Dev Cell* 37(3), 238-253, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Wang JS, Kamath T, Mazur CM, Mirzamohammadi F, Rotter D, Hojo H, Castro CD, Tokavanich N, Patel R, Govea N, Enishi T, Wu Y, da Silva Martins J, Bruce M, Brooks DJ, Bouxsein ML, Tokarz D, Lin CP, Abdul A, Macosko EZ, Fiscoletti M, Munns CF, Ryder P, Kost-Alimova M, Byrne P, Cimini B, Fujiwara M, Kronenberg HM, Wein MN.	4. 巻 12
2. 論文標題 Control of osteocyte dendrite formation by Sp7 and its target gene osteocrin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26571-7	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

1. 著者名 Kanazawa Sanshiro, Okada Hiroyuki, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Iwata Junichi, Komura Makoto, Hikita Atsuhiko, Hoshi Kazuto	4. 巻 11
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells in the bone marrow niche consist of multi-populations with distinct transcriptional and epigenetic properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94186-5	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 Hojo Hironori, Ohba Shinsuke	4. 巻 137
2. 論文標題 Gene regulatory landscape in osteoblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115458 ~ 115458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115458	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 -

1. 著者名 Tani Shoichiro, Chung Ung-il, Ohba Shinsuke, Hojo Hironori	4. 巻 52
2. 論文標題 Understanding paraxial mesoderm development and sclerotome specification for skeletal repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental & Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1166 ~ 1177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s12276-020-0482-1	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Onodera Shoko, Saito Akiko, Hojo Hironori, Nakamura Takashi, Zujur Denise, Watanabe Katsuhito, Morita Nana, Hasegawa Daigo, Masaki Hideki, Nakauchi Hiromitsu, Nomura Takeshi, Shibahara Takahiko, Yamaguchi Akira, Chung Ung-il, Azuma Toshifumi, Ohba Shinsuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Hedgehog Activation Regulates Human Osteoblastogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 125 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.05.008	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 -

1. 著者名 Fujihara Yuko, Abe Takahiro, Asawa Yukiyo, Nishizawa Satoru, Saijo Hideto, Hikita Atsuhiko, Hoshi Kazuto	4. 巻 0
2. 論文標題 Influence of Damage-Associated Molecular Patterns from Chondrocytes in Tissue-Engineered Cartilage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEA.2019.0185	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 -

1. 著者名 Zujur Denise, Kanke Kosuke, Onodera Shoko, Tani Shoichiro, Lai Jenny, Azuma Toshifumi, Xin Xiaonan, Lichtler Alexander C., Rowe David W., Saito Taku, Tanaka Sakae, Masaki Hideki, Nakauchi Hiromitsu, Chung Ung-il, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 19 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.010	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 Ohsato Ai, Abe Masanobu, Ohkubo Kazumi, Yoshimasu Hidemi, Zong Liang, Hoshi Kazuto, Takato Tsuyoshi, Yanagimoto Shintaro, Yamamoto Kazuhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 A Comparative Study of Oral Health Status between International and Japanese University Student Patients in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Healthcare	6. 最初と最後の頁 52 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/healthcare6020052	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

1. 著者名 Fujihara Yuko, Kikuta Shu, Sugiyama Madoka, Kubota Keigo, Ishibashi Makiko, Igarashi Masaki, Saijo Hideto, Hoshi Kazuto	4. 巻 30
2. 論文標題 A case of cleft lip and palate associated with unilateral choanal atresia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 538 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2018.06.007	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 -

1. 著者名 Sugiyama M, Nakatsuka T, Saijo H, Fujihara Y, Kanno Y, Hikita A, Takato T, Hoshi K	4. 巻 掲載確定
2. 論文標題 Clinical Findings of a Cantilever Iliac Bone Graft for Secondary Correction of Cleft Lip-Nose Deformities	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Craniofac Surg	6. 最初と最後の頁 掲載確定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SCS.0000000000004070	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 -

1. 著者名 Harata M, Watanabe M, Nagata S, Ko EC, Ohba S, Takato T, Hikita A, Hoshi K	4. 巻 7
2. 論文標題 Improving chondrocyte harvests with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) coated materials in the preparation for cartilage tissue engineering	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 61-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2017.08.002	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hironori Hojo
2. 発表標題 Understanding a mechanism underlying bone repair process and application for bone regeneration
3. 学会等名 SICEM 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hojo H, Saito T, Onodera S, Azuma T, Chung UI, Seki M, Suzuki Y, McMahon AP, Ohba S
2. 発表標題 Runx2 defines the osteoblast chromatin landscape in skeletal development
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北條宏徳、齋藤琢、小野寺晶子、東俊文、鄭雄一、大庭伸介
2. 発表標題 Runx2は骨格発生においてクロマチンランドスケープを規定する
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ichsan M, Kanke K, Hojo H, Chung UI, Ohba S
2. 発表標題 A system level investigation to unravel mechanisms and potential direct targets of the osteogenige small molecule TH
3. 学会等名 EMBL Conference: Mamalian Genetics and Genomics: From Molecular Mechanisms to Translational Applications (国際学会)
4. 発表年 2017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	岡安 麻里 (Okayasu Mari) (10610941)	東京大学・医学部附属病院・病院診療医(出向) (12601)	

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	大庭 伸介 (Ohba Shinsuke) (20466733)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授 (12601)	2022年より大阪大学歯学研究科 教授
研究分担者	西條 英人 (Saijo Hideto) (80372390)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	

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