

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 2 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17096

研究課題名（和文）コネキシン43発現調整による骨組織再生メカニズムの解明

研究課題名（英文）The role of Connexin43 in bone cell communication and bone metabolisms

研究代表者

藤井 政樹（Masaki, Fujii）

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30710024

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：骨で細胞間コミュニケーションに重要な働きをきたすコネキシン43（Cx43）に注目し、Cx43が骨芽細胞の分化を調節するメカニズムを明らかにすることを検討することとした。そこで、ドキシサイクリン投与により発現が制御可能なCreリコンビナーゼを使用し、Cx43遺伝子を骨芽細胞特異的にKOを誘導するマウスを作製した。生後4ヶ月齢でCx43KOを誘導しさらに1年後の大腿骨の表現形を調べたところ著名な変化は認められなかった。さらに、骨の遺伝子発現を解析したところCx43遺伝子の有意な低下はCx43cKOマウスで認められなかったことから、KO誘導時期の再設定が必要となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎口腔外科領域において、骨再生をコントロールすることは治療をおこなう上で非常に重要である。骨の代謝は骨を形成する骨芽細胞、骨を溶解する破骨細胞、骨の実質細胞である骨細胞の緊密なコミュニケーションが重要である。骨に発現するギャップジャンクションタンパクであるCx43は細胞間のコミュニケーションをの発現を調節することにより、各細胞間でのコミュニケーションをおこない骨リモデリングを制御していると考えられる。本実験ではCx43の成体における役割を解明することを目的とし、Cx43の発現を制御することで骨再生のコントロールが可能となるのではないかと考えられたが、更なる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, I focused on the role of Cx43 in bone cell communication and bone metabolisms. To do that, I established doxycycline-inducible- and osteoblastic cells-specific-knockout mice. Cx43KO was induced in 4-month-old mice. One year after the induction of Cx43cKO, the femora of mice were analyzed. Unfortunately, there were no significant differences between the phenotype of the femora of cKO mice and that of control mice. RNA expression analysis revealed that doxycycline withdrawal did not significantly reduce Cx43-expression in cKO mice. The conditions for establishing the inducible Cx43cKO mice should be examined. Further experiments will be needed.

研究分野：骨の再生

キーワード：骨の再生 コネキシン43

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

#### 1. 研究開始当初の背景

コネキシンはほ乳類で20種類以上知られており、細胞間コミュニケーションを司る主要な膜タンパク質であるが、骨において主に発現しているのはコネキシン43(Cx43)である。Cx43の古典的なノックアウトマウスは出生直後に心血管の異常により死亡することが知られており、胎生期において骨芽細胞の分化が阻害され成長障害を引き起こすことが見いだされている。また、骨芽細胞特異的なCx43のコンディショナルノックアウトにおいても、骨芽細胞の分化抑制が報告されている。さらに、ヒトのCx43遺伝子の変異は眼歯指形成異常を引き起こしていると考えられている。これらの報告からCx43が骨芽細胞の分化に必須であると考えられるが、その詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。

#### 2. 研究の目的

顎口腔外科領域において、骨再生をコントロールすることは治療をおこなう上で非常に重要である。本研究では特に骨芽細胞の増殖・分化のメカニズムを解析することにより、正常な骨形成を誘導する方法を見いだすことを目的としている。我々は骨での細胞間コミュニケーションに重要な働きをしており、その遺伝子欠損が骨形成異常をきたすコネキシン43(Cx43)に注目し、Cx43が骨芽細胞の分化を調節するメカニズムを明らかにし、Cx43発現を調整することによる骨誘導の可能性を検討することとした。

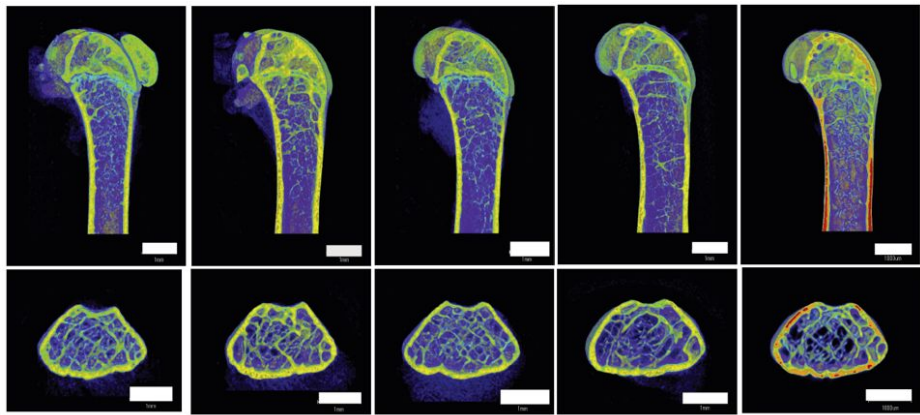
#### 3. 研究の方法

ドキシサイクリン(Dox)存在下ではオステリックスプロモーターにより駆動するCreリコンビナーゼ発現が抑制されるCre発現マウスとCx43遺伝子の第2エクソンの両側にloxP配列をノックインしたCx43<sup>flox</sup>マウスを交配することにより、骨芽細胞系細胞でCx43遺伝子のノックアウトが誘導可能なマウスを得た。今回の実験では、いずれも生後4ヶ月間Dox含有餌で飼育した後、8ヶ月間Dox含有またはDox不含有餌で飼育しそれぞれをコントロール群および実験群とした。これらのマウスから得られた血清中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)とGla型のオステオカルシンをEIAキットを用いて測定した。

#### 4. 研究成果

骨の形態計測を行った結果、コントロールに対して特に変化したパラメーターはなかった。コントロールと比較すると、Cx43をノックアウトしたマウスの血清では、破骨細胞のマーカーである血清中のTRAP活性は高くなる傾向を示した。また、骨形成マーカーであるGla型のオステオカルシンの血清中濃度には差が認められなかった。骨芽細胞系細胞によるCx43発現を確認したところ8ヶ月齢マウス的大腿骨における発現に差はなく、Cx43KOの誘導がうまく行っていない可能性が濃厚となった(図5)。

結果、大腿骨のマイクロCT画像(図1)、皮質骨の形態計測結果(図2)、海綿骨の形態計測結果(図3)を示す。



4M Control 8M Control 8M Cx43cKO 16M Control 16M Cx43cKO

図1 マイクロCT

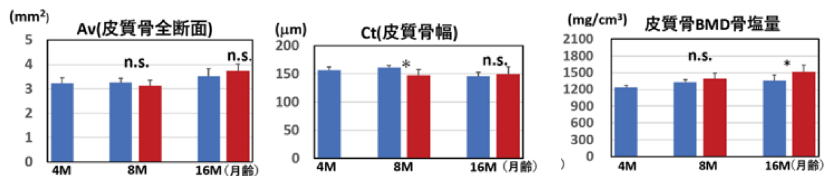
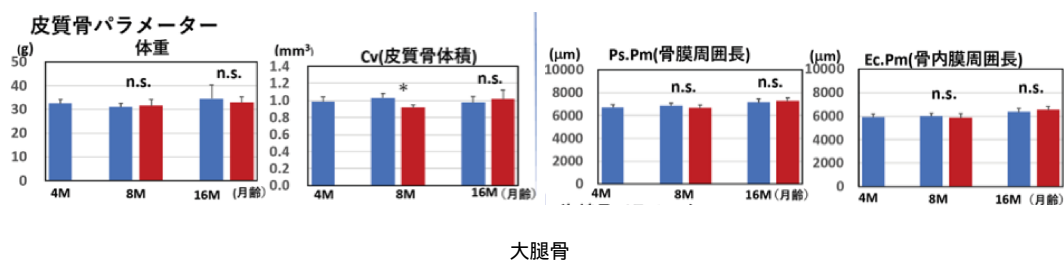


図2 皮質骨の形態計測

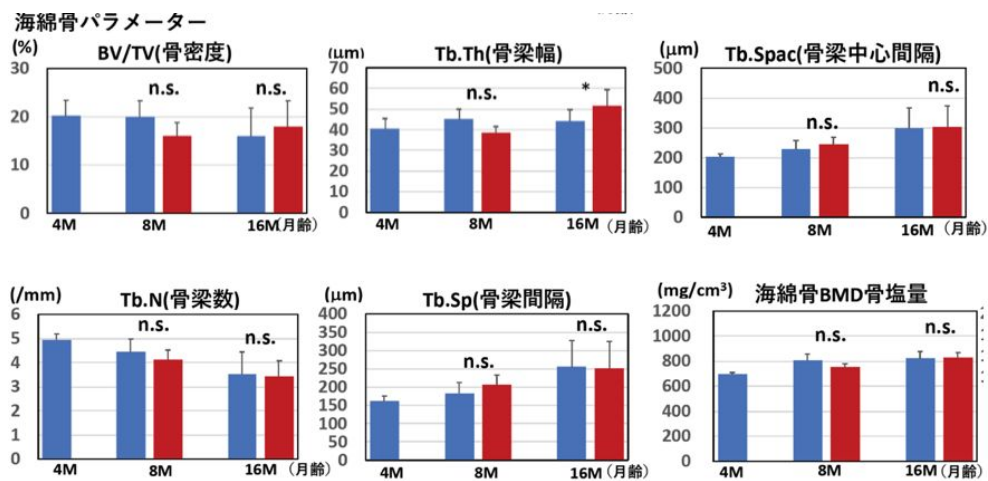


図3 海綿骨の形態計測

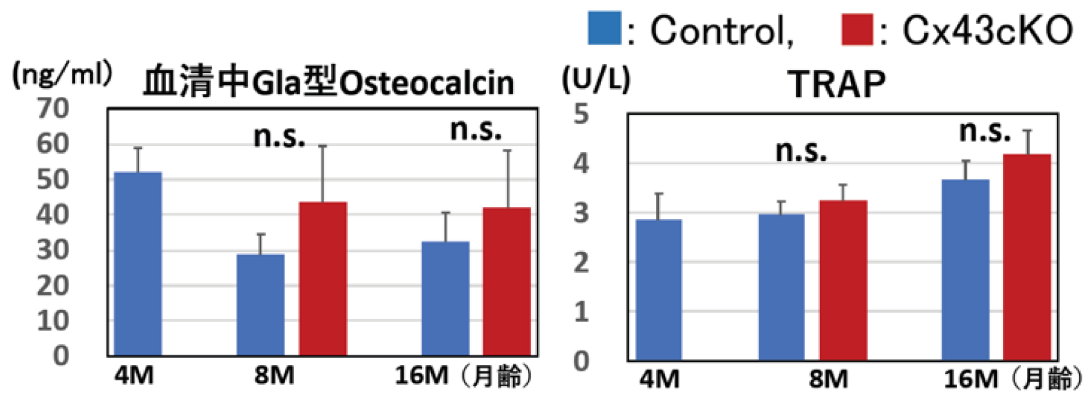


図4血清中の骨形成マーカー、破骨細胞マーカー

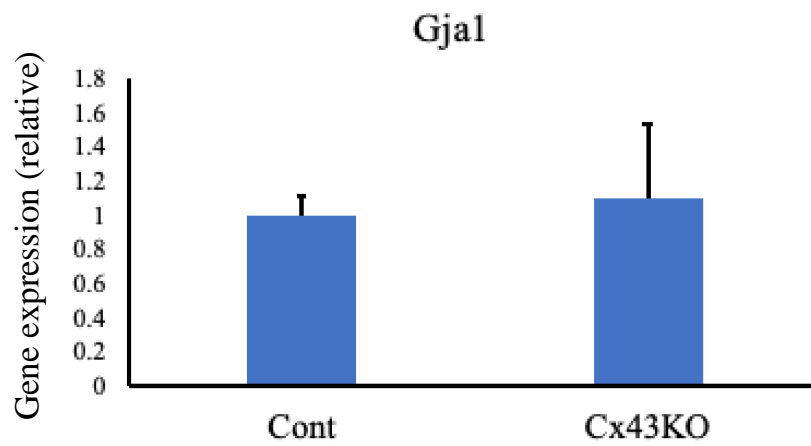


図5 8ヶ月齢マウスの大腿骨におけるCx43の遺伝子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 藤井 政樹, 宗像 源博, 山口 葉子, 三田 稔, 尾関 雅彦	4. 巻 33
2. 論文標題 介護施設においてインプラントのアバットメントの撤去を行った1症例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔インプラント学会雑誌	6. 最初と最後の頁 191-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11237/jsoi.33.191	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 藤井 政樹, 立川 敬子, 宗像 源博, 下岸 将博, 春日井 昇平	4. 巻 19
2. 論文標題 下顎再建症例におけるインプラント周囲組織の評価	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本顎顔面インプラント学会雑誌	6. 最初と最後の頁 71-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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0件

〔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
研究協力者	立川 敬子  (TACHIKAWA NORIKO)		
研究協力者	中濱 健一  (NAKAHAMA Kenichi)		

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
---------	---------