

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10114

研究課題名(和文) 副甲状腺ホルモンの骨形成促進作用を仲介する骨細胞由来の骨形成促進因子を同定する

研究課題名(英文) Identification of osteocyte-derived bone formation stimulating factors

研究代表者

佐藤 卓也 (SATO, Takuya)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：00316689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺ホルモン(PTH)の全身性投与は骨量を増やす。PTHは骨芽細胞への直接作用ではなく、骨基質中に埋まった骨細胞に作用し、骨細胞が産生する何らかの因子を介し骨形成を促進する。これまで骨細胞の培養は困難であり、骨細胞の産生する因子の多くは不明であった。本研究ではまず骨細胞培養法の確立を行い、種々の遺伝子発現解析に十分な量の全RNAの回収を可能にした。実際に骨細胞にPTHを作用させ全RNAを回収し、RNA-seq法による網羅的遺伝子発現解析とパスウェイ分析を行った結果、PTH刺激で発現変化する骨細胞の遺伝子リストを得た。このリストは骨形成を局所的に促進する骨細胞由来因子を含むと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副甲状腺ホルモン(PTH)は骨細胞に作用し、何らかの局所因子を介して間接的に骨芽細胞による骨形成を促進すると考えられてきた。本研究は、PTH刺激によって発現が変化する骨細胞の遺伝子リストを得た。このリスト中の遺伝子をさらに解析することで、骨芽細胞による骨形成促進作用を仲介する局所因子の同定が可能で、PTHの骨形成促進機構の解明に寄与する学術的意義がある。またこの因子の局所投与が、歯周病によって失われた歯槽骨を再生できれば歯の保存に役立ち、国民生活のQOL向上に寄与する社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Although systemic administration of parathyroid hormone (PTH) stimulates bone formation, it is desirable to locally apply a factor(s) that can stimulate alveolar bone formation for treatment of periodontal disease. It has been known that PTH stimulates osteocytes embedded in bone to produce a local factor(s) which, in turn, stimulate bone formation. Since it is difficult to culture isolated osteocytes, osteocytes-produced factors are largely unknown. In this study, we intended to establish a culture system of isolated osteocytes, which enables us to utilize RNA-based comprehensive gene expression analysis. We improved our culture system and succeeded in harvesting enough amount of total RNA for the comprehensive analysis. Using this system, we performed RNA-seq and pathway analysis, and got a list of PTH-induced genes, of which translated proteins might stimulate locally bone formation. These data are useful to further develop a new therapeutic agent for alveolar bone reconstruction.

研究分野：骨代謝学

キーワード：PTH 骨細胞 骨芽細胞 骨形成

## 1. 研究開始当初の背景

骨の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスが保たれることによって維持されている。骨吸収は新たに形成される破骨細胞の数によって大きく調節される。破骨細胞形成は、主に骨芽細胞や骨細胞が産生する破骨細胞形成促進因子 (receptor activator of NF-kappaB ligand, RANKL) と RANKL のデコイレセプターである osteoprotegerin (OPG) のバランスによって大きく調節されている。骨形成は、骨芽細胞の分化と骨芽細胞の活性化によって調節されていると考えられている。骨芽細胞分化の強力な調節因子として *Sost* 遺伝子産物である sclerostin が発見されている。Sclerostin は、骨細胞が主に産生する骨芽細胞分化・骨形成の強力な抑制因子であり、骨形成を負に調節する。*Sost* 遺伝子の異常によって sclerostin が正常に機能しなくなると、sclerostin による骨芽細胞の分化抑制が解除され、結果的に骨芽細胞分化・骨形成が促進するところが知られている。一方、このような分化抑制因子の抑制による骨芽細胞分化・骨形成の促進ではなく、骨芽細胞分化・骨形成を積極的に刺激する因子は未だ不明である。

過剰な骨吸収による骨量低下が問題となる有病率が高い疾患として、骨粗鬆症と歯周病が挙げられる。骨粗鬆症の治療薬として、ビスホスホネート製剤や抗 RANKL 抗体など種々の骨吸収抑制剤が実用化され、一定の成果を挙げている。しかしビスホスホネート製剤では強力に骨吸収を抑制し骨密度を上昇させる一方、骨形成を促進する作用を特に持たないため、骨質を低下させるなどの問題点も指摘されている。また、骨粗鬆症患者に対し積極的に骨芽細胞分化・骨形成を促進する薬剤としては唯一、副甲状腺ホルモン (PTH) 製剤が実用化されている。PTH 製剤は全身性に投与する必要があるが、PTH には骨外作用あり、特に血中  $Ca^{++}$  上昇作用は種々の臨床上的問題を起こすため、骨外作用の少ない骨形成促進薬の開発が望まれている。一方、歯周疾患による歯槽骨吸収の場合、感染の結果生じる骨吸収の促進を、ビスホスホネート製剤などによって抑制することは不適切であり、確実な感染源除去によって骨吸収を抑制することが必要である。歯周病治療における問題は、感染がコントロールされ骨吸収が抑制されたとしても、失われた歯槽骨を再生することが困難なことである。これまでにエナメルマトリックス蛋白質や FGF-2 などが実用化されているが、限定的な成果しか得られていないのが現状である。全身性投与による強力な骨形成促進作用が認められる PTH 製剤は、その骨外作用の点から歯科領域では使用が困難である。また多くの動物実験では、PTH 製剤の局所投与はむしろ投与局所での骨吸収を促進し、骨形成を促進しないという結果が得られている。従って、失われた歯槽骨の骨形成を積極的に促進するための局所投与が可能な薬剤の開発が望まれてきた。

PTH が未分化な骨芽細胞系細胞や骨芽細胞に直接作用しても、その骨芽細胞への分化を促進せず、また骨形成も促進されないことが知られている。PTH による骨形成促進の作用機序として、PTH の主な標的細胞は骨細胞であり、PTH が骨細胞に作用すると、骨細胞の sclerostin 産生を抑制することが知られている。PTH による sclerostin 産生の抑制は、抑制因子の抑制による消極的な骨芽細胞分化の促進である。一方、PTH が骨細胞に作用し、骨芽細胞分化・骨形成を積極的に刺激するサイトカインの骨細胞による産生を促進し、間接的に骨形成を促進している可能性については、ほとんど検討されてこなかった。特に骨細胞が産生するサイトカインについてはほとんど検討されていない。その大きな理由として、骨細胞は石灰化した骨基質中に埋め込まれた細胞で分離が困難であり、骨細胞単独での培養実験ができなかったことが挙げられる。数種類の株化骨細胞様細胞もあるが、実際の骨細胞の幾つかの側面を反映しているに過ぎない場合がほとんどであり、骨細胞が PTH 刺激によってどのようなサイトカイン、その他の因子を産生するかを検討するには、ふさわしくないと考えられる。我々は、初代骨細胞を *in vivo* の性質を保ったまま培養できる新たな培養系の開発を続け、その培養系を用いて骨細胞が発現する因子の探索を予備的に行ってきた。

## 2. 研究の目的

我々は、PTH の骨形成促進作用を担っている骨細胞由来のサイトカインの同定を目指している。先行実験として、PTH 刺激によって調節される骨細胞の遺伝子発現を、我々が開発してきている初代骨細胞培養系を用いてマイクロアレイ解析により網羅的に探索した。その結果、無刺激群に比べ 2 倍以上の発現変動が見られた遺伝子を複数見出ししてきた。さらに精度を上げた遺伝子発現の網羅的解析を行うため本研究では、この培養系を用い、RNA-seq 法とパスウェイ分析を行い、PTH によって発現が調節される骨細胞由来の因子の中から、PTH の骨形成促進作用を担うサイトカインを同定し、そのサイトカインの局所投与による骨形成促進作用を示すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### \* 初代骨細胞の培養法：骨細胞のみを含む骨片培養法の改良

本研究課題のカギとなる初代骨細胞培養は、骨細胞のみを含む骨片の準備から始まる。マウス大腿骨を筋肉などの軟組織をきれいに除去した状態で分離する。両骨端を切り離し、27Gの注射針と培地を用いて骨髓をフラッシュアウトする。この骨髓を含み、骨表面（骨膜中）の骨芽細胞系細胞と骨基質中の骨細胞を主に含んだ大腿骨骨幹部を縦断分割し、ハーフパイプ状の骨片とする。この骨片を、コラゲナーゼ溶液とEDTA溶液によって交互に処理し、骨基質表面の細胞をほぼ完全に除去する。この処理によって得られた骨片は、骨基質中の細胞＝骨細胞しか含んでおらず、また骨細胞は骨基質中に埋め込まれたままで、骨細胞ネットワークは基本的に維持され、*in vivo*の状態を比較的良く保っていると考えられる。この骨片を骨細胞のみを含む骨片（osteocyte-enriched bone fragments, OEBFs）として以後の培養に供する。OEBFsは、24ウエルプレート内のウエル内で通常の細胞と同様に培養する。また、トランスウエルを用いて器官培養法に準じた方法での培養も行った。培地には5% FBS含有alpha-MEMを用い、10 nM PTHの存在、非存在下で6時間から18時間培養した。マウス20匹から約～80のOEBFsが準備され、各ウエルに3つのOEBFsを入れ、1群12ウエル用い2群で培養した。培養終了後、OEBFsを回収、RNA回収キットRNeasy付属のRLT plus液中にてポリトロンを用いホモジナイズし、上清からtotal RNAを回収した。

#### \* 培養状態の確認

骨細胞が正常に培養されているかどうかの確認する指標の1つとしてPTHに対する*sost*遺伝子、RANKL遺伝子及びOPG遺伝子の発現状況をモニターした。回収したtotal RNAの一部を用い、real-time RT-PCR法によって各mRNA発現量を調べた。これらの遺伝子発現に対するPTHの骨細胞への作用はすでに確立されており、本培養系でも既知の結果と矛盾がないかどうかを確認し、培養の成否の指標とした。

#### \* RNA-seq法とパスウェイ解析

RNA-seqデータ取得は、Rhelixa社にtotal RNAを送り委託した。Rhelixa社では、Bioanalyzerを用いたRNAの品質確認（QC確認）を行い、品質良好とされた8検体（1群4検体、2群）からRNA-seqデータ取得が行われた。さらにRNA-seqデータの分析として、発現変動遺伝子（DEG, differentially expressed genes）の抽出、GSEA（gene set enrichment analysis）、Gene Ontology（GO）解析が行われた。またパスウェイ解析は、QIAGEN社のIPA（Ingenuity Pathway Analysis）を用いて行った。

### 4. 研究成果

当初の研究計画では、OEBFs単独、骨芽細胞単独、OEBFsと株化骨芽細胞の共存培養を行い、それぞれのパスウェイ分析結果を比較し、PTHによって産生が促進され、骨細胞に特異的で骨芽細胞を活性化する因子の候補を選択する予定であった。そこでまず、OEBFs単独培養の検体を準備したところ、Rhelixa社でのQC確認で、RNAの品質についての問題点が指摘された。これらの問題点は、我々のreal-time PCR法を用いた既知遺伝子の発現変動確認では検出できなかった。RNAの品質問題は、培養、RNA精製、保存・移送の各ステップで生じうる。RNA精製は、ほぼ自動化されており手技的な問題が生じにくく、また他の検体では問題がなかったため、原因とは考えられなかった。一番問題と考えられたのは、OEBFsの培養過程であった。そこで培養条件について、マウスの系統と週令、トランスウエル、培地、血清濃度、コラゲナーゼ/EDTA処理条件などの様々な検討を行った。

この培養法開発当初からマウスの系統として、RNA収量が多かったddy系を使用してきたが、RNA-seqの特性を考慮し、近交系であるC57BL6j系を用いることとした。ddy系と比較した場合、なぜかRNA収量が少ない傾向が見られた。マウス週令については、従来は、6-7週令が骨も大きくRNA収量が多かったが、3-4回に一度程度、極めてRNA回収量が少ない場合があり安定性に欠けていた。そこで骨片が小さく薄い4週令を使用することにした。また、細胞のviabilityをMTT法で検討したところ、ウエル間でばらつきがあった。この原因は不明であるが、当初は用いていなかったトランスウエルを用いた器官培養法に準じた培養法に変更した。この方法によってviabilityのばらつきはある程度抑えられるようになった。細胞のviabilityやRNA収量に対し特に影響が大きいことが判明したのが、コラゲナーゼの種類・ロットであった。当初は、Wako社のコラゲナーゼを使用し良好な結果を得ていたが、それが利用不可となり、Sigma社やRoche社のコラゲナーゼを種々試すことになった。どの製品もWako社製には及ばず、新しいロット毎に確認する必要があることが明らかになった。またWako社以外の製品では、培養時間が6時間を超え10時間以上になるとRNA収量が低下する現象が発生するようになった。この点は改善できず、培養時間を6時間に変更することになった。また、コラゲナーゼとEDTAの処理時間の再検討を行い、従来に比べ短く回数も減らした条件を設定した。以上の検討から、OEBFsの調製には、C57BL6j、4週令マウスの大腿骨骨片を、コラゲナーゼ処理7分、EDTA処理7分、コラゲナーゼ処理7分、EDTA処理7分を行うこととした。コラゲナーゼ処理後の洗浄にはPBSを用い、EDTA処理後の洗浄にはalpha-MEMを用いた。調整したOEBFsは1つのトラ

ンスウエル上に3つ置き、5%FBS添加 alpha-MEM 中 10 nM PTH 非存在、存在下で器官培養法に準じて6時間培養した。このプロトコルが現在最も良い培養条件として確立されたものである。

この条件で培養した後、OEBFs から total RNA を回収し RNA-seq 法の検体とした。1回20匹のマウスを用い得られた total RNA (コントロール群、PTH 処理群) を1回分とし、計7回分14検体(1群7検体、2群)について Rhelixa 社で QC 確認し、状態の良い4回分8検体を RNA-seq 解析に用いることになった。当初の実験計画で予定していた骨芽細胞との共存培養は、6時間の培養時間では意義が薄いと考えられたため、行わないこととした。

RNA-seq データ取得、統計的処理は Relixa 社で行われた。生物学的な統計処理は独立して行われた培養実験4回分のデータをもとに行われた (n=4)。研究期間内に、生物学的意義を有す最も基本的なデータである発現変動遺伝子 (DEG, differentially expressed genes) の抽出、GSEA (gene set enrichment analysis)、Gene Ontology (GO) 解析の結果まで得ることができた。また一部であるが IPA 解析を行った。当初の計画では、これらの遺伝子リストから、PTH が発現を促進しかつ骨芽細胞分化・骨形成を促進する遺伝子候補を抽出し、実際にその因子の作用を検討する予定であったが、期間内に終了できなかった。ここまでの一連の網羅的遺伝子発現解析では、骨細胞との関係が比較的最近になって明らかにされた Semaphorin Neuronal Repulsive Signaling Pathway なども検出されてきているなど、一定の信頼がおけるデータが得られていると考えられた。

今後は、IPA 解析をさらに行い候補遺伝子を選択し、その因子の PTH 刺激に対する応答性の確認、未分化骨芽細胞への作用について検討を進めることで、当初の本研究課題の目的を達成できると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林田 千代美、佐藤 卓也
2. 発表標題 骨細胞のみを含む骨片 (osteocyte-enriched bone fragment, OEBF) 培養系における副甲状腺ホルモンPTH の作用について
3. 学会等名 日本解剖学会第108回関東支部学術集会
4. 発表年 2020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	林田 千代美  (HAYASHIDA Chiyomi)  (40710900)	明海大学・歯学部・講師    (32404)	

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