

令和 4 年 4 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10404

研究課題名(和文)新規三次元骨細胞分化誘導培養法を応用した骨代謝疾患へのアプローチの提案

研究課題名(英文) Suggestion for an approach to metabolic bone disease by applying the culture system for inducing differentiation into osteocyte

研究代表者

村田 有香 (Murata, Yuka)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：90755068

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)：骨細胞は、骨代謝の中心的役割を果たしていると考えられているにも関わらず、科学的知見は乏しい。本研究は、骨細胞分化に必須の転写因子を同定し、これらを用いた新規骨細胞分化誘導法を確立することを目的とした。骨細胞特異的に標識したマウスの頭蓋冠から採取した初代培養骨細胞と骨芽細胞を用いて培養したところ、骨細胞と骨芽細胞の共培養群では単独培養群と比較して、骨梁様の構造を伴う著しい石灰化を認めた。さらに、三次元培養では高い石灰化を示した。本研究により、骨細胞の分化において骨細胞と骨芽細胞の相互作用が関与していることが明らかとなり、骨細胞の分化に必須の転写因子を探索する新たな手掛かりが見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨細胞分化に関する研究はこれまでに多数行われており、骨細胞の単離や骨細胞分化系の確立に向けた取り組みがなされてきたが、骨細胞は依然として未解明な謎を秘めた細胞である。本研究では、骨細胞の分化において骨細胞と骨芽細胞の相互作用が関与していることが明らかとなり、骨細胞の分化に必須の転写因子を探索する新たな手掛かりが見つかった点に、学術的に大きな意義がある。本研究の成果から、骨再生治療や骨移植治療において、骨細胞と骨芽細胞の相互作用を応用することで、骨形成を著しく促進できる可能性が示され、今後の骨代謝疾患への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Although osteocytes play an important role in bone metabolism, there are little scientific findings about osteocytes. In our study, we aimed to identify transcription factors which are vital for the differentiation into osteocytes and establish a novel method for differentiating and inducing osteocyte using these transcription factors. We isolated primary mouse calvarial cells, which consist of osteocytes and osteoblasts, from the transgenic mice. A mixed culture group of osteocytes and osteoblasts showed remarkable mineralization with the formation of the trabecular structures compared with single cultures. In the mixed culture group with three-dimensional cell culture, high mineral deposition was also obtained. In this study, we revealed that the interaction between osteocytes and osteoblasts had influenced the differentiation into osteocytes and found a new clue for identification of transcription factors.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：骨細胞 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

骨細胞への分化は未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化に始まる。骨芽細胞は分化に伴ってマトリックスタンパク質(骨基質)を産生し、骨基質はやがて石灰化される。この基質の中に埋もれた一部の骨芽細胞が骨細胞となる。骨基質に埋没した骨細胞は、骨組織を構成する細胞の大多数を占め、骨代謝の中心的役割を果たしていると考えられているにも関わらず、科学的知見は乏しい。その理由は、骨という硬組織そのものが研究の障壁となり、骨細胞にアプローチする困難さが、その機能や分化メカニズムの解明を阻んできたからである。一方で、形態的特徴に関しては解析が進んでおり、神経細胞様の多数の突起を伸ばして骨細胞間あるいは他の細胞とのネットワークを形成していることが知られている。この特異的な形態を足掛かりに、今日では細胞間ネットワークが骨に対するメカニカルストレスやホルモン・サイトカインなどの感受・応答を可能にしていることが知られ、このバランスが破綻することで様々な骨疾患に繋がることまで明らかになってきている。すなわち、骨細胞は骨量の調節による骨の恒常性制御の主役であり、骨代謝における細胞間のコミュニケーションネットワークを担っていると考えられている(Bonewald, J. *Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005)が、依然として未解明な謎を秘めた細胞である。

これまでも、骨細胞の単離や骨細胞分化系の確立に向けた取り組みが行われてきた。なかでも未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞および骨細胞へと分化させる分化誘導系について、様々な条件が試行されてきた。研究代表者は、2015年度の基盤研究(C)により MC3T3-E1 細胞の三次元培養を行い、そこへリン酸添加や低酸素条件は元より、さらに別の骨細胞分化誘導因子を作用させることで、効果的に未分化幼若骨芽細胞を骨芽細胞および骨細胞へと分化誘導させる新たな手法を検討した。

現在、骨細胞特異的に発現する遺伝子が複数同定されており、骨細胞の分化マーカーとして利用されている。しかし、これらマーカー遺伝子の発現にいたる骨細胞分化に必須な転写因子は未だ解明されていない。一方、その端緒を開くべく研究代表者はすでにマイクロアレイを用いた骨細胞の分化に関わる遺伝子発現解析データを入手しており、骨細胞に有意に発現上昇を認める転写因子の情報を得ていた。一方、軟骨細胞や骨芽細胞ではこれらの細胞分化に決定的な転写因子が既に同定されており、近年それら細胞特異的転写因子の発現誘導を利用した軟骨細胞や骨芽細胞への分化誘導法が報告されている。これにより、従来コストや時間の問題から困難とされていた患者由来細胞からの軟骨細胞や骨芽細胞の誘導が可能となり、軟骨や骨の再生医療への応用が強く期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者が検討した MC3T3-E1 細胞ならびに IDG-SW3 細胞を用いた新規三次元骨細胞分化誘導培養法を応用して、骨細胞の分化に必須の転写因子を同定し、さらにこれらの転写因子を用いた新規骨細胞分化誘導法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 IDG-SW3 の骨細胞分化能の検証

IDG-SW3 を培養し、3日毎に分化誘導因子(アスコルビン酸、 β -グリセロリン酸、デキサメタゾン)を添加した培地の交換を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。また、リアルタイム PCR 法により骨細胞特異的分化マーカー(Dmp1, Sost)の発現の解析を行った。

実験 初代培養骨細胞と骨芽細胞を用いた骨細胞への分化誘導

Dmp1 プロモーターにおいて緑色蛍光タンパク(GFP)を発現するトランスジェニックマウス(Dmp1-GFP マウス)の頭蓋冠から細胞を採取し、蛍光活性化セルソーティング(FACS)を用いて GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞に分離した後、培養を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。骨細胞への分化誘導は、培養液中に分化誘導因子(アスコルビン酸、 β -グリセロリン酸、デキサメタゾン)を添加した。

実験 骨細胞と骨芽細胞の相互作用についての検討

初代培養の骨細胞と骨芽細胞の培養において、骨細胞の培養上清を用いたコンディショニングメEDIUMで骨芽細胞を培養し、アリザリン染色を行った。さらに、初代培養骨細胞と骨芽細胞を混合したフィブリンゲルを使用して三次元培養を行い、Von Kossa 染色を行った。

4. 研究成果

最初に、MC3T3-E1 細胞だけでなく、IDG-SW3 細胞の培養に新規三次元骨細胞分化誘導培養法を応用し、骨細胞への分化能を検討した。IDG-SW3 に分化誘導因子を添加し培養した細胞群では、対照群と比較して、石灰化の亢進、骨細胞特異的分化マーカーである *Dmp1* および *Sost* の遺伝子発現の上昇、*Dmp1* promoter に依存的な GFP の高い発現を認め、骨細胞への分化が確認できた。これらのことから、IDG-SW3 細胞を用いた新規三次元骨細胞分化誘導培養法を応用した培養実験の有用性が示された。

次に、骨細胞特異的に標識した *Dmp1*-GFP マウスの頭蓋冠から採取した初代培養骨細胞と骨芽細胞を用いて培養した。単独培養群では、培養 10 日後において石灰化は認められず、19 日後に石灰化がわずかに認められたが、GFP の発現はほとんど認められなかった。一方、骨細胞と骨芽細胞の共培養群では、培養 10 日後において石灰化が認められ、GFP の発現が上昇していた。19 日後には骨梁様構造を伴う著しい石灰化形成を認め、さらに同部位に GFP 発現細胞の集積を認めた(図 1、2)。これらのことから、骨細胞の分化において骨細胞と骨芽細胞の相互作用が関与している可能性が考えられた。

さらに骨細胞と骨芽細胞の相互作用を確認するために、骨細胞の培養上清を用いたコンディショニングメEDIUMで骨芽細胞を培養した結果、骨芽細胞の分化や石灰化が有意に促進した。次に、三次元培養を行ったところ、骨細胞単独培養群と比較して、骨細胞と骨芽細胞の共培養群では高い石灰化を示した。本研究により、骨細胞の分化において骨細胞と骨芽細胞の相互作用が関与していることが明らかとなり、骨細胞の分化に必須の転写因子を探索する新たな手掛かりが見つかった。

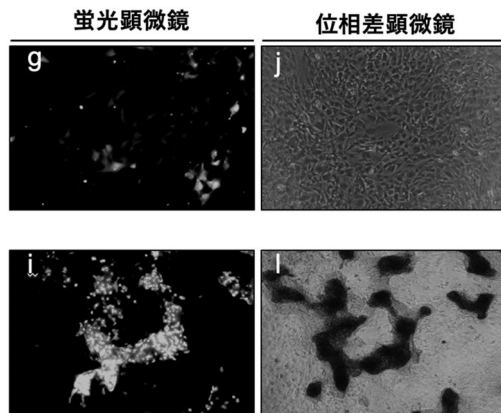


図 1：初代培養骨細胞と骨芽細胞を用いた培養で形成された骨梁構造

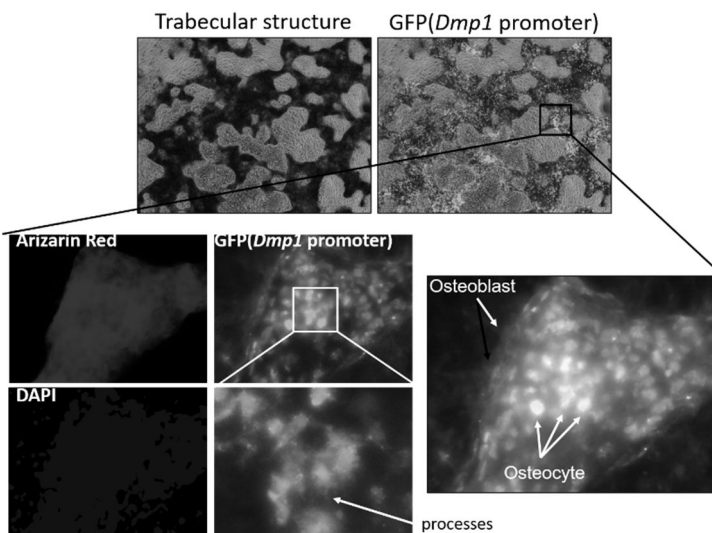


図 2：初代培養骨細胞と骨芽細胞の培養により、石灰化が亢進し骨梁構造に類似した石灰化物が形成された。アリザリン染色部位の中には多数の GFP 陽性細胞が認められ、DAPI 染色ではアリザリン染色部位の外縁に多数の GFP 陰性細胞が認められた。さらに、骨細胞に特徴的な突起のある GFP 陽性細胞が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 草野 慎之介、犬伏 俊博、村田 有香、伊藤 慎将、黒坂 寛、佐々木 淳一、山城 隆
2. 発表標題 骨細胞分化や分化段階の維持におけるWnt- カテニン経路の役割
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 草野 慎之介、犬伏 俊博、村田 有香、佐々木 淳一、森田 知里、伊藤 慎将、黒坂 寛、今里 聡、山城 隆
2. 発表標題 Wnt- カテニンシグナルの骨細胞分化における役割の解明
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinnosuke Kusano, Toshihiro Inubushi, Yuka Murata, Jun-Ichi Sasaki, Shinsuke Itoh, Satoshi Imazato, Takashi Yamashiro
2. 発表標題 The role of Wnt/ -catenin signaling in osteocyte differentiation.
3. 学会等名 the 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 草野 慎之介、犬伏 俊博、佐々木 淳一、村田 有香、今里 聡、山城 隆
2. 発表標題 初代培養骨細胞と骨芽細胞の相互作用による骨形成促進効果の検討
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021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	黒坂 寛 (Kurosaka Hiroshi) (20509369)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	
研究分担者	犬伏 俊博 (Inubushi Toshihiro) (30550941)	大阪大学・歯学研究科・講師 (14401)	
研究分担者	伊藤 慎将 (Itoh Shinsuke) (40633706)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	佐々木 淳一 (Sasaki Junichi) (50530490)	大阪大学・歯学研究科・講師 (14401)	
研究分担者	山城 隆 (Yamashiro Takashi) (70294428)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	

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