

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18948

研究課題名（和文）骨細胞のPTH応答性を利用した、新たな骨リモデリング調節因子の探索

研究課題名（英文）Investigation of novel bone remodeling regulators using PTH responsiveness of osteocytes

研究代表者

林田 千代美（Abe, Chiyomi）

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：40710900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、骨基質に埋まった骨細胞を培養し、RNAを抽出し、骨細胞の機能を調べることに重点を置いた。骨基質から分離培養された骨細胞ではPTHの作用によりsclerostinの発現が抑制されることが既知のため、同様の反応を示すか否か確認するために骨基質に埋まった骨細胞にPTHを作用させた結果、同様にSost mRNA発現の抑制が認められた。本研究期間中、幾度も培養を行い、RNAを抽出したが、成功率が低かった。最終年度、一定量のRNA回収の成功頻度が増え、RNA-seq法による網羅的遺伝子発現解析実験のサンプルにすることが可能になった。RNA-seq法による遺伝子発現解析の結果は分析の途中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、骨細胞の本来の存在様態のように骨基質に埋まった状態で骨細胞を培養し、RNAを抽出し、骨細胞の機能を調べることにある。骨細胞を骨組織から分離した状態で培養する研究が多く行われてきた背景には、骨基質に埋まったまま骨細胞を培養することが困難であるという理由があるが、それだけではなく、硬い骨基質中で培養した後、有意な量の遺伝子を採取し回収することに成功することが難しいことが考えられた。最終年度、ようやく一定量のRNA回収の成功頻度が増え、RNA-seq法による網羅的遺伝子発現解析実験のサンプルにすることが可能になった。継続することで、骨細胞の機能解析は進展し社会に貢献すると考える。

研究成果の概要（英文）：This study focused on culturing osteocytes embedded in bone matrix, extracting RNA, and examining osteocyte function. Since it is known that sclerostin expression is suppressed by the action of PTH in osteocytes isolated and cultured from the bone matrix, PTH was applied to osteocytes buried in the bone matrix to confirm whether or not the same reaction would be exhibited. As a result, suppression of Sost mRNA expression was similarly observed. During the period of this study, culture was performed many times and RNA was extracted, but the success rate was low. In the final year, the frequency of successful recovery of a certain amount of RNA increased, and it became possible to use samples for comprehensive gene expression analysis experiments using the RNA-seq method. The results of gene expression analysis by RNA-seq method are in the process of analysis.

研究分野：骨代謝研究

キーワード：骨細胞

1. 研究開始当初の背景

成人の骨では、常に、骨単位での局所的な改造(リモデリング)が行われ、強靭さが維持される。骨の細胞には、リモデリングにおいて骨吸収を担う破骨細胞、骨形成を担う骨芽細胞の他に、骨細胞(Osteocyte)が存在する。破骨細胞と骨芽細胞は骨表面に存在し、骨吸収・骨形成のそれぞれの役割を実行する姿がみられ、注目され、多くの機能が解明されてきた。しかし骨細胞は、骨構成細胞の9割強を占め、細胞突起により隣接する細胞とネットワークを形成し、骨への荷重を感知し、リモデリング全体の統制役と推測されているにもかかわらず、唯一、骨基質中に埋め込まれた細胞であり、埋め込まれる前の起源が骨芽細胞であるため、その機能解明が遅れている。近年、骨細胞の未知の機能が少しずつ明らかにされ、骨芽細胞による産生因子とだけ考えられていたものが、実は、骨細胞が主要な産生者だということがわかる{例えば RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand)}など、これまでの説を考え直す場面が出てきており、骨リモデリングの研究は長年行われているが、まだ解明すべき点が多い。

骨リモデリング機構の破綻により惹起される代表的な疾患は、骨粗鬆症であり、加齢により骨吸収が増えるのに対し骨形成が不足し発病する。骨粗鬆症治療薬は既にいくつか開発され臨床応用されているが、骨の細胞に直接作用するものとしては、やはり破骨細胞または骨芽細胞を標的として開発されており、骨細胞を標的として開発されたものはない。

当初臨床応用されていた骨粗鬆症治療薬については、破骨細胞活性を抑制する骨吸収抑制剤の全ての副作用として、抜歯等の外科的処置後に顎骨壊死(BRONJ/ARONJと呼ばれる)の誘発が認められている。BRONJ/ARONJの発生頻度は骨粗鬆症患者で5000人に1人と高くはないが(癌の骨転移治療のための静脈内注射の場合は100人に1~2人で高い)、歯科の臨床においては、観血的処置だけでなく、う蝕や歯周病などから波及する歯内療法(根管治療)においても歯根の先端の顎骨に治療器具が触れる場合があるため BRONJ/ARONJ のリスクを考慮する必要があり、厄介な薬剤と言える。

一方、骨芽細胞を標的として開発された骨形成促進剤には、骨芽細胞の分化と増殖を亢進させるPTH製剤のPTH1-34が用いられており、用量依存的に嘔吐・頭痛・高カルシウム血症の副作用が現れることがあるが、BRONJ/ARONJという副作用はない。

近年の研究で、骨細胞に特異的に発現するsclerostinが近傍の骨芽細胞に作用して骨形成を抑制することが明らかにされた。また、PTHは骨細胞に作用してsclerostinの分泌を抑制することも明らかになっている。従って、現在臨床応用されているPTH製剤は、骨細胞にも作用しsclerostinの骨形成抑制作用を阻害することによっても骨形成を促進するという見方も追加されている。しかし、PTHの作用により発現が増加する因子は不明である。

そこで、申請者は骨細胞を骨基質から単離せず、骨基質に埋入したまま培養する方法を開発済みである(Hayashida C, et al. *J Biol Chem*, 289:11545-55, 2014.) ため、これを用いることで、PTHの作用により発現が増加する因子を解明できると考えた。

骨細胞由来因子は、SOST(sclerostin)、RANKL、DMP1(Dentin matrix protein 1)、FGF23(fibroblast growth factor 23)、OPG(Osteoprotegerin)、TGF- β (Transforming growth factor- β)、PHEX(phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome)、KTN(Keratocan)、IFN- γ (interferon- γ) (IFN- γ については申請者が見出した。Hayashida C, et al. *J Biol Chem*, 289:11545-55, 2014.) などが知られているが、本研究ではこれらの変化だけでなく、骨細胞にPTHを作用させた場合に発現の増加する、未知の因子があるのかどうかを確認したいと考えている。PTHを作用させることがなかったら、骨細胞での発現が全くみられないが、PTHの作用により初めてその発現がみられるという因子をも発見しようとするのが、本研究の学術的独自性と創造性を示す点である。

また、骨細胞研究の進展が、他の骨の細胞に比べて遅れをとっていた一因として、骨細胞が骨基質中に埋め込まれて存在するため、それを単離し培養に用いることが難しかったことが考えられるが、申請者はこれまでの研究歴で一貫して骨細胞を扱う中で、骨基質中に存在するからこそ骨細胞であり、骨基質中で培養したいという考えから試行錯誤を重ね、骨基質から骨細胞を単離させることなく、マウス大腿骨骨片中に骨細胞を埋まったまま培養する「OEBFs (Osteocyte-enriched bone fragments)の培養法」を開発している。このOEBFsを用いて本研究を行いたいと考える。

PTHという、現在臨床に用いられている薬剤の素材を用いて新たな骨細胞の機能を明らかにし、その機能を応用した治療法を開発できれば、骨粗鬆症だけでなく、歯科のインプラント治療や義歯治療時に骨が脆弱であったり不足している場合にピンポイントで骨量増加や骨質改善を可能にする治療薬など、新たな薬剤の迅速な開発につながると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが開発した、骨細胞を骨基質から単離せず、骨基質に埋入したまま培養する方法を用いることによって、PTHの作用により骨細胞での発現が増加する因子を探ることである。PTHを骨細胞に作用させることで骨細胞からの分泌が亢進する因子を探索し、その因子(因子は複数存在する可能性が考えられる)に骨形成促進作用、または骨吸収抑制作用があるか否かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、申請者らが開発した、骨細胞を骨基質から単離せず、骨基質に埋入したまま培養する方法によって得られる「骨基質に埋まった骨細胞; OEBFs (マウス大腿骨骨片中に埋まったままの骨細胞)」を調整し、PTH存在下で培養し、PTHの作用により骨細胞での発現が増加する因子を探す研究である。骨基質に埋まった骨細胞の機能を調べることに重点を置いた。

本研究では、計画では ~ として、研究段階を4段階の進捗に分けて計画していた。

まず、 ~ として、“「骨細胞にPTHを作用させた場合に発現が増加する因子があるのか。それは既知の因子か、それとも、PTHの作用により初めてその発現がみられる、または亢進するというような未知の因子か。」について調べる。 *In vitro* で、OEBFs (マウス大腿骨骨片中に埋まったままの骨細胞)にPTHを作用させる群と作用させない群をつくり1日培養後、OEBFsのRNAを抽出し、マイクロアレイ解析(タカラバイオ株式会社に委託)を行い、遺伝子発現を網羅的に解析する。OEBFsの培養には、Transwellシステム(Corning社)を用いる。”という実験を計画していたが、実際にはなかなか実験が成功せず、進捗状況は遅れ、以下のように研究を行った。

骨基質に埋まった骨細胞; OEBFsの調整には、かつて申請者らが開発した当時にはSlc:ddY系統マウスを用いていたが、本研究において、培養後、RNA抽出量が少なく、うまく研究が進まないことが続いたため、方法の改良を検討し、使用マウスの系統を変更した。大腿骨の骨髓腔形態についての観点からC57BL/6J系統マウスを用いることとなった。一度の基本実験単位で、4週齢雄C57BL/6J系統マウス20匹を用いた。Slc:ddY系統マウスの価格と比較し、C57BL/6J系統マウスの価格は2倍以上だが、C57BL/6J系統マウスを用いることで有意な量のRNAを得ることができたため、回収できるRNA量を優先し、C57BL/6J系統マウスを使用した。骨基質に埋まった骨細胞; OEBFsは、コラゲナーゼ処理とEDTA処理によって得た。培養にはTranswell-plateの24well plate・ポアサイズ8 μ m(CORNING)を用いた。一度の基本実験単位でこのTranswell-plateを2枚使用した。PTHの添加濃度は、予備実験と既存のPTH製剤の状況から、100nMとした。1well当たり、3~4個の骨片を、骨片が重ならないようにTranswell-plateのinsert well上に慎重に置き、1日培養後にRNAを抽出した。これが最終的に用いている骨基質に埋まった骨細胞; OEBFsの調整方法であるが、1日(24時間)培養後、有意な量のRNAを抽出・回収できることが成功し、成功回数が安定するために、多くの実験回数と時間がかかった後に、この調整方法とした。

骨基質から分離培養された骨細胞では、PTHの作用によりsclerostinの発現が抑制されることが既に報告されている。このため、骨基質に埋まった骨細胞; OEBFsの培養がうまくできているか否か、骨細胞が機能しているかを検討するために、骨基質に埋まった骨細胞; OEBFsにおいて、PTHの作用によりsclerostinの発現が抑制されるという同様の反応を示すか否かを確認した。結果、骨基質に埋まった骨細胞; OEBFsにPTHを作用させ1日培養後、骨基質から分離培養された骨細胞での報告と同様にsclerostinの発現(*Sost* mRNA発現)の抑制が認められた。

当初の計画ではマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現を網羅的に解析することを計画していたが、マイクロアレイ解析ができるほどの量のRNAを回収できない事象が長く続いたため、別の方法を検討した。繰り返し、改良しつつRNAの回収精度の向上に努めた。本研究期間中、幾度も培養を行い、RNAを抽出したが、成功率が低かった。OEBFsの調整方法や培養方法、細胞や骨基質の粉砕方法の改良を続けたが、マイクロアレイ解析にはサンプル量が足りず、RNA-seq法による網羅的遺伝子発現解析実験には足りる量のRNAを収集できた。改良の結果、一度の実験で、ばらつきはあるが、一群につき5 ng/ μ lから20ng/ μ lのRNAを回収できる状況になった。最終年度、一定量のRNA回収の成功頻度が増え、RNA-seq法による網羅的遺伝子発現解析実験のサンプルにすることが可能になった。

4. 研究成果

最終年度の終盤、一定量のRNA回収の成功頻度が増え、RNA-seq法による網羅的遺伝子発現解析実験のサンプルにすることが可能になった。回収できるRNA量を優先し、C57BL/6J系統マウスを使用した方法に変更し、各種ステップを調節したことで一定量のRNA回収の成功頻度が増えた。改良の結果、一度の実験で、ばらつきはあるが、一群につき5 ng/ μ lから20 ng/ μ lのRNAを回収できる状況になった。RNA-seq法に用いるには足りる量のRNAを回収できるため、遺伝子解析を行うことが可能である。所属研究室にサンプルを提供しRNA-seq法による網羅的遺伝子発現解析実験を試みてもらったが、遺伝子発現解析の結果については内容の分析の途中でまだまだ明らかにできていない。これまで骨細胞を骨組織から分離した状態で培養する研究が多く行われてきた背景に、骨基質に埋まったまま骨細胞を培養することが困難であるという理由を考えていたが、それだけではなく、硬い骨基質中で培養した後に有意な量のRNAを回収するこ

とも難しいため一般に行われていないことが考えられた。本研究期間は修了するが、本研究により、RNA-seq 法の結果を今後分析・検討し、PTH を骨細胞に作用させることで骨細胞からの分泌が増加（あるいは減少）する因子の有無・種類等を明らかにできる見込みができた。骨基質に埋まった骨細胞を培養し、機能解析のために有意な量の RNA を回収できるようになったことは成果である。

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

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