

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19287

研究課題名（和文）Dscr1が骨芽細胞の遺伝子発現調節機構に与える影響の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effect of Dscr1 on the gene expression regulation mechanism of osteoblasts

研究代表者

笠原 由紀（Kasahara, Yuki）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：50822558

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）：本研究ではダウン症候群の原因となる21番染色体上にコードされるDown syndrome critical region1(Dscr1)のカルシニューリン阻害活性に着目し、Dscr1バリエーション特異的な発現変調が骨代謝機能へ及ぼす影響を検討した。実験結果では、Dscr1.v2タンパクの発現量が細胞内cAMP濃度の上昇とともに増加し、骨の形態形成に関連している可能性が示唆された。また、Dscr1.v2の過剰発現により石灰化能に変化が見られた。しかし、Dscr1変異体安定株による機能発現領域の特定には至らず、Dscr1.v2過剰発現トランスジェニックマウスの骨形態計測解析でも変化は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨芽細胞におけるDscr1バリエーション特異的な発現変調およびDscr1.v2の過剰発現が骨の代謝機能へ関連することが示唆されたことにより、ダウン症候群の骨形態形成不全に関する新たな理解、病態解明に向けた基礎研究の進展に寄与したと考える。また、ダウン症候群における治療法の開発に向けた基盤となるだけでなく、骨代謝異常や骨疾患の治療法の開発にも役立つ可能性がある。また、骨形成に関与するメカニズムの理解は、一般的な骨の健康管理にも応用できると考える。総じて、本研究はダウン症候群の病態解明に寄与するだけでなく、骨形態形成不全への治療法開発や骨の健康状態の向上に向けた展望を提供できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the calcineurin inhibitory activity of Down syndrome critical region 1 (Dscr1), encoded on chromosome 21, which is associated with Down syndrome. We investigated the impact of Dscr1 variant-specific expression dysregulation on bone metabolism. The experimental results revealed that the expression level of Dscr1.v2 protein increased with the elevation of intracellular cAMP concentration, suggesting its involvement in bone morphogenesis. Additionally, overexpression of Dscr1.v2 led to changes in calcification ability. However, attempts to identify the functional expression domain through stable expression of Dscr1 variants were unsuccessful, and no significant changes were observed in bone morphology analysis of Dscr1.v2 overexpressing transgenic mice.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Dscr1 骨芽細胞 ダウン症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は全出生児の約 1/800 に発症し、知的障害、小頭症、低身長および特徴的な顔貌を特徴とする先天性疾患である。顎顔面口腔領域においても、歯の先天性欠如や萌出遅延を高頻度に伴い、種々の不正咬合が起きると報告されている。そのため、わが国でも厚生労働大臣が定める疾患として、平成 14 年より保険適用での矯正歯科治療を行っている。先行研究により、ダウン症患者の顎態は頭蓋底の平坦化、中顔面の後退、上顎骨の発育不全などを伴う上下顎骨の不調和に起因した骨格性の反対咬合や開咬を示す割合が高いと報告されている。近年、ダウン症患者の寿命は医療の進歩により飛躍的に伸び、平均寿命が 60 歳と言われていることから、患者の QOL 向上を考えると、ダウン症患者の咬合機能の獲得を目的とした矯正歯科治療の重要性はますます増してきている。しかし、ダウン症候群において顎顔面形態の不調和を引き起こす原因は未だ不明である。

一方、ダウン症候群における合併症の原因解明のため、ダウン症候群の主な病因としてトリソミーとなる 21 番染色体上の遺伝子解析が行われている。なかでも Dscr1 は、心臓、中枢神経筋など多くの臓器で発現が上昇しており、先天性心疾患、消化器疾患、内分泌疾患など様々な合併症を引き起こす可能性が指摘されている。Dscr1 はカルシニューリン阻害活性を有することが知られており、カルシニューリン-NFAT シグナルは、骨芽細胞の分化に重要な役割を果たすことが示唆されている。しかしながら、Dscr1 トランスジェニックマウスにおいては免疫低下が報告されているが、骨に対する解析は行われていない。また、ダウン症候群モデルマウスである Ts65Dn においては、神経頭蓋、顎顔面骨の形成不全が起こるとの報告から Dscr1 の発現上昇はダウン症患者の顎顔面骨の形成にも関与する可能性がある。また、Dscr1 ノックアウトマウスにおいては破骨細胞数が増加し骨量が低下するとの報告から、Dscr1 の正常レベルでの発現は骨の形態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

したがって、ダウン症患者における Dscr1 バリエーション特異的な発現変調が骨芽細胞に及ぼす影響をもたらす、骨代謝機能に変化を与えるかを明らかにすることが、ダウン症患者における不正咬合の原因解明の端緒になると共に、顎顔面の正常発育への理解、ひいては新たな創薬標的の発見につながると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的としては「Dscr1 遺伝子の発現変調が骨代謝機能に変化をきたすか」を検証することである。具体的には以下の 2 点を明らかにすることである。

- (1) 正常骨芽細胞における Dscr1 バリエーションの発現調節機構および機能
- (2) 正常骨芽細胞に Dscr1 を過剰に発現させた場合の骨芽細胞形質変化

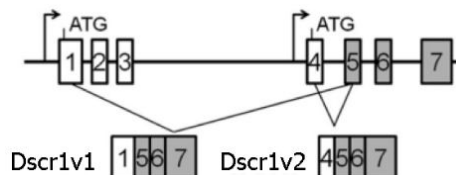
3. 研究の方法

- (1) 骨芽細胞培養による Dscr1 バリエーションの発現調節機構および機能解析

骨芽細胞における Dscr1.v1 および Dscr1.v2 の発現調節機構について 報告者は骨芽細胞株 TMS-12 の細胞内 cAMP 濃度を forskolin 処理によって上げることで、Dscr1.v2 の転写のみが特異的に亢進する結果を得ていた。そこで、細胞内 cAMP 濃度を上昇させた際の Dscr1.v2 タンパク発現量の変化を Western blotting 法を用いて測定した。

Dscr1.v1 または v2 を過剰発現させた骨芽細胞株の樹立および分化誘導実験 Dscr1.v1 および Dscr1.v2 遺伝子を挿入したレトロウイルス発現ベクター (pQCXIP) とウイルスパッケージング用ベクター (pCL10A1) を 293FT 細胞に遺伝子導入し、偽ウイルスを含む 293FT 培養上清を用いて TMS-12 に Dscr1.v1 および Dscr1.v2 遺伝子を導入し安定発現株を樹立する。樹立後、石灰化誘導または骨髄由来単核球との共培養を行い石灰化能および破骨細胞支持能に与える影響を調べる。

③ Dscr1 タンパクの機能発現領域の特定 Dscr1.v1 および Dscr1.v2 では使用する開始コドンがエクソン 1 および 4 にそれぞれ存在している。そこで、配列の異なる N 末端領域に着目し、N 末端領域のアミノ酸に変異を導入するために変異 Dscr1 遺伝子を部位特異的遺伝子変異導入法により作成し、ウイルスベクターによる導入法を用いて Dscr1 変異体安定発現株を樹立する。樹立後、石灰化能、破骨細胞支持能について詳細に検討を行



い、骨芽細胞分化において Dscr1 の重要な領域を特定する。

(2) Dscr1.v2 過剰発現トランスジェニックマウスを用いた骨解析

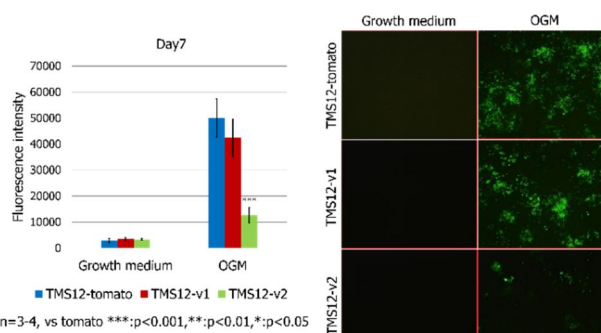
TARGATT 部位特異的遺伝子ノックインシステムを用いて Dscr1.v2 を全身で発現するトランスジェニックマウスを作成し、骨解析を行う。

4 . 研究成果

(1) 骨芽細胞培養による Dscr1 バリエーションの発現調節機構および機能解析

TMS-12 に forskolin(10 μM)および PGE2 (100ng/ml) を作用させ 24 時間後の Dscr1.v2 タンパク発現量を Western blotting 法を用いて測定し、転写レベルと同等の結果を得た。

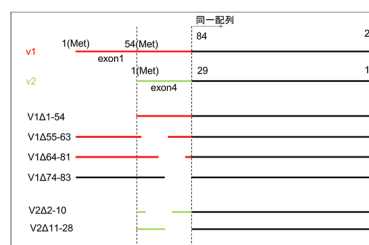
レトロウイルス発現ベクターによって Dscr1.v1、Dscr1.v2 が安定発現した TMS-12 (TMS12-v1 及び TMS12-v2) を樹立し、石灰化能および破骨細胞分化支持能を検討した。石灰化誘導実験では、細胞播種後 1 日目に誘導開始 (day0) し、誘導後 7 日目(day7)に calcein による染色を行い、蛍光強度を測定することで定量化した。(n=3-4) その結果、TMS12-v2 でのみ石灰化の抑制が認められた。



破骨細胞分化支持能の検討には、骨髓由来単核球との共培養系を用い 5 日目に TRAP 染色を行い評価した。(n=3)破骨細胞支持能については TMS12-v1 および TMS12-v2 の両者ともコントロール群と比較し変化が認められなかった。

③TMS12-v2 のみに石灰化抑制が起こったことから、同一の配列である exon4,5,6 にはその機能部位が存在しないことが示唆された。Dscr1 の主な機能であるカルシニューリンの阻害活性は同一配列部位にコードされる SP motif にあると言われるため、Dscr1.v2 の骨芽細胞における石灰化の抑制がカルシニューリン阻害以外の機能によって起こされる可能性が示唆された。

次に、exon1,4 にコードされると想定される機能部位を特定するため、exon1,4 に部分的欠損を有する v1 1-53,v1 55-63,v1 64-81,v1 74-83,v2 2-10,v2 11-28 変異遺伝子を部位特異的遺伝子導入法を用いて作成し、変異遺伝子過剰発現株 (TMS12-) 樹立を試みた。RT-qPCR および western blotting を用いて発現を確認したところ TMS12-v1 1-53,TMS12-v1 55-63,TMS12-v1 64-81,TMS12-v2 11-28 変異遺伝子過剰発現株を樹立した。これらの変異株について石灰化能および破骨細胞分化支持能を検討したが、各株間で変化は認められず、機能部位の特定には至らなかった。



(2) Dscr1.v2 過剰発現トランスジェニックマウスを用いた骨解析

TARGATT 法を用いて Dscr1.v2 を全身で発現するノックインマウスを作成した。ホモ、ヘテロ、コントロール(C57BL/6NcrSlc)の 3 群 (n=4-6) で 8 週齢/雄および 1 年齢/雄について検討した。マウスは安楽死後に大腿骨を採取し、μCT を用いて撮影し骨形態計測解析を行った。BV/TV、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp、BMD 等について 3 群にて比較を行ったが 8 週齢、1 年齢共に有意な差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ishihara Seiko, Usumi-Fujita Risa, Kasahara Yuki, Oishi Shuji, Shibata Kana, Shimizu Yasuhiro, Ishida Yuji, Kaneko Sawa, Sugiura-Nakazato Makoto, Tabata Makoto J., Hosomichi Jun, Taniyama Yoshiaki, Ono Takashi	4. 巻 41
2. 論文標題 Periostin splice variants affect craniofacial growth by influencing chondrocyte hypertrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 171 ~ 181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-023-01409-y	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 該当する

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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