

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21687

研究課題名(和文) 転写ネットワーク解析を基盤とした硬組織再生細胞の最適化システム構築

研究課題名(英文) Construction of optimization system for hard tissue regenerating cells based on transcription network analysis

研究代表者

上條 竜太郎(Kamijo, Ryutaro)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：70233939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経堤由来細胞のごく一部の細胞は、成長後も幹細胞としての性質を維持し多分化能をもつことから、再生医療の新しい細胞ソースとして期待される。本研究ではGFPを発現する遺伝子改変マウス(P0-Cre/GFPマウス)に存在する神経堤由来細胞を用いて骨芽細胞を誘導する。神経堤由来細胞から誘導した骨芽細胞の遺伝子発現を詳細に解析し、結果に立脚した骨形成誘導に応用する細胞ソースとしての価値を明らかにする。その際、従来のトランスクリプトーム解析に加え、オープンクロマチン領域を同定することにより転写制御の網羅的解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体性幹細胞である神経堤細胞を再生医療で用いる利点として腫瘍のリスクが低く、安全性が高い、多分化能という特性のみならず、臓器の障害や機能低下を修復改善する治療効果を有している場合が多く、成体の障害臓器に対する細胞治療として効率が良く、また、採取される細胞のバックグラウンドが明確であるため、標的とする組織に対する組織特異性を高めることができるなどがある一方、資源が有限であり、品質の維持、中でも均一な幹細胞の採取が困難であるなどの欠点が挙げられる。そうした、組織再生における問題点を克服するために、使用する細胞の特性、中でも遺伝子発現様式の網羅的解析は重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A part of the neural crest-derived cells maintain their properties as stem cells even after growth and have pluripotency, so they are expected to be a new cell source for regenerative medicine. In this study, we use neural crest-derived cells present in transgenic mice (P0-Cre / GFP mice) that express GFP, and induce osteoblasts using neural crest-derived cells. The gene expression of osteoblasts derived from neural crest-derived cells will be analyzed in detail, and the value as a cell source applied to the induction of bone formation based on the results will be clarified. At that time, in addition to the conventional transcriptome analysis, a comprehensive analysis of transcriptional regulation was performed by identifying the open chromatin region.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経堤由来細胞のごく一部の細胞は、成長後も幹細胞としての性質を維持し多分化能をもつことから、再生医療の新しい細胞ソースとして期待される。再生医療へ応用可能なリソースを得るためには、純度の高い神経堤由来細胞を低侵襲的に効率よく採取し、目的の細胞に分化誘導することが肝要と考えられる。また、体性幹細胞から移植細胞への分化過程における細胞内の様々な分子動態、中でも分化制御の中心的役割を果たしている転写制御の挙動を明瞭化することが肝要である。

2. 研究の目的

体性幹細胞である神経堤細胞を用いる利点として腫瘍のリスクが低く、安全性が高い、多分化能という特性のみならず、臓器の障害や機能低下を修復改善する治療効果を有している場合が多く、成体の障害臓器に対する細胞治療として効率が良い、採取される細胞のバックグラウンドが明確であるため、標的とする組織に対する組織特異性を高めることができるなどがある一方、資源が有限である、品質の維持、中でも均一な幹細胞の採取が困難であるなどの欠点が挙げられる。

本研究では GFP を発現する異なる遺伝子改変マウス (P0-Cre/GFP マウス) に存在する神経堤由来細胞を用いて骨芽細胞を誘導する。神経堤由来細胞から誘導した骨芽細胞の遺伝子発現を詳細に解析し、結果に立脚した骨形成誘導に応用する細胞ソースとしての価値を明らかにする。

3. 研究の方法

P0-Cre/GFP マウス

本研究では P0-Cre/GFP マウスを用いる。胚発生時期の神経堤細胞特異的に活性化するミエリンプロテインゼロ (P0) 遺伝子のプロモーターにより Cre リコンビナーゼが発現し、遺伝子組み換えが起こる。その結果、神経堤細胞がその後分化しても GFP が産生され、各組織に存在する神経堤細胞由来は GFP 陽性細胞として検出できる。その後、マウスより採取した細胞を単離し、GFP 陽性細胞を培養する。

遺伝子発現様式の解析

神経堤由来細胞より分化誘導させた骨芽細胞、DNA マイクロアレイ解析により解析する。また、各分化段階における転写制御の網羅的解析として、ATAC-Seq 法を用いる。ATAC-Seq 法は Transposase を用い、核内オープンクロマチン領域を濃縮後、NGS (次世代シーケンス) 解析を行うことによりゲノムワイドな転写制御様式を明らかにし、各分化段階で発現する遺伝子の制御転写因子を予測することなどが可能となる解析方法である。

4. 研究の成果

マウスにおいて、神経堤由来細胞が成体でも GFP をレポーターとして検出できる P0CreGFP トランスジェニックマウスを用い、採取した GFP 陽性細胞を骨芽細胞分化誘導培地 (BMP2 およびアスコルビン酸とデキサメタゾン) にて処理した際の遺伝子発現様式の解析を、定量的 RT-PCR 法およびマイクロアレイ解析を用い行った。その結果、MC3T3-E1 細胞などの骨芽細胞株や初代培養骨芽細胞を処理した際にもその上昇が認められる Alp などの骨芽細胞マーカー遺伝子に関して発現の上昇が認められ、また、骨芽細胞分化の際に認められる石灰化の上昇が認められた。神経堤由来細胞が GFP でトレースできるマウスより採取した神経堤由来細胞を骨芽細胞分化誘導培地で分化誘導した際の、細胞内遺伝子発現様式を検討するために cDNA マイクロアレイ解析を行ったところ、転写因子 C/EBP delta や Klf15 などの発現上昇が認められた。次に、分化制御の中心的役割を果たしている転写制御の挙動を明瞭化することを目的とした ATAC-Seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin-Sequence) 解析を行い、従来のトランスクリプトーム解析に加え、オープン

ンクロマチン領域を同定することにより転写制御の網羅的解析を行った。その結果、骨芽細胞分化誘導培地で誘導された神経堤由来細胞で遺伝子のプロモーター付近に特異的なピークコーリングが認められた遺伝子にCcne1などが存在した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Y, Koyama S, Ohkubo C, Ogura S, Kamijo R, Sato S, Aida J, Izumi Y, Atsumi M, Isobe A, Baba S, Ikumi N, Watanabe F	4. 巻 20
2. 論文標題 Dental implant care and trouble among dependent patients based on the questionnaire survey among Japanese dental practitioners.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 335-341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-020-01279-0.	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 -
1. 著者名 Takimoto R, Suzawa T, Yamada A, Sasa K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Sasama Y, Tanaka M, Kinoshita M, Ikezaki K, Ichikawa M, Yamamoto M, Shirota T, Kamijo R	4. 巻 162(3)
2. 論文標題 Zoledronate promotes inflammatory cytokine expression in human CD14-positive monocytes among peripheral mononuclear cells in the presence of T cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 306-313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imm.13283.	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 -
1. 著者名 Kato T, Mizobuchi M, Sasa K, Yamada A, Ogata H, Honda H, Sakashita A, Kamijo R	4. 巻 532(1)
2. 論文標題 Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Uremic Rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.096.	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 -
1. 著者名 Shibuya I, Takami M, Kawamoto M, Karakawa A, Nakamura S, Kamijo R	4. 巻 29(3)
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis of the distribution of RANKL-expressing cells and the expression of Osteoclast-related markers in gigant cell tumor of bone.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Hard Tissue Biol.	6. 最初と最後の頁 1-10
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 無
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 -

1. 著者名 Izumida E, Suzawa T, Miyamoto Y, Yamada A, Otsu M, Saito T, Yamaguchi T, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Yoshimura K, Sasa K, Takimoto R, Uyama R, Shiota T, Maki K, Kamijo R	4. 巻 99(4)
2. 論文標題 Functional analysis of PTH1R variants found in primary failure of eruption.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dent Res	6. 最初と最後の頁 429-436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520901731.	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 -

1. 著者名 山田篤, 木下三博, 上條竜太郎	4. 巻 35(7)
2. 論文標題 ネフロネクチンの骨代謝における機能.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「BIO Clinica」	6. 最初と最後の頁 48-52
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 無
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 -

1. 著者名 笹清人, 吉村健太郎, 宮本洋一, 上條竜太郎	4. 巻 29(2)
2. 論文標題 モノカルボン酸トランスポーターによる骨・軟骨代謝の調節.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 口腔組織培養学会誌	6. 最初と最後の頁 49-56
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 無
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14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 木下三博, 山田篤, 上條竜太郎
2. 発表標題 骨芽細胞においてPMAはNephronectinの発現をPKC および を介し抑制する.
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹清人, 吉村健太郎, 宮本洋一, 上條竜太郎
2. 発表標題 モノカルボン酸トランスポーター1は骨芽細胞分化の負の調節因子p53の抑制を介して骨芽細胞分化を促進する.
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田梨恵, 鈴木 大, 笹 清人, 山田 篤, 田中準一, 三島健二, 飯島毅彦, 上條竜太郎
2. 発表標題 抗MHC抗体投与後の肺水腫における血管内皮グリコカリックスの分解.
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧本玲子, 田中元博, 山田 篤, 宮本洋一, 笹 清人, 須澤徹夫, 吉村健太郎, 高見正道, 代田達夫, 上條竜太郎
2. 発表標題 ゾレドロン酸による末梢血単球の破骨細胞分化抑制.
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田優子, 山田篤, 鈴木航, 上條竜太郎, 飯島毅彦
2. 発表標題 Rhoファミリー低分子量Gタンパク質Cdc42の血管形成および骨形成に対する機能解析.
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sugisaki R, Miyamoto Y, Chikazu D, Kamijo R
2. 発表標題 Possible involvement of elastase differentiation of osteoclasts by neutrophils through degradation of osteoprotegerin.
3. 学会等名 ASBMR (The American Society for Bone and Mineral Research) 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉崎リサ, 宮本洋一, 赤池孝章, 守田匡伸, 近津大地, 上條竜太郎
2. 発表標題 破骨細胞の分化は活性イオウ分子種によって促進される.
3. 学会等名 第73回 日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉崎リサ, 宮本洋一, 近津大地, 上條竜太郎
2. 発表標題 好中球の破骨細胞分化促進作用にエラスターゼによるオステオプロテゲリン分解が関与する.
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 瀧本玲子, 笹 清人, 山田 篤, 宮本洋一, 吉村健太郎, 代田達夫, 上條竜太郎
2. 発表標題 ゾレドロン酸による末梢血単球の破骨細胞分化抑制.
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Negishi S, Yoshimura K, Kamijo R
2. 発表標題 Trehalose, a natural sweetening compound, suppresses osteoclast differentiation.
3. 学会等名 第68回国際歯科研究学会日本部会 [JADR] 総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tanaka M, Miyamoto Y, Yoshimura K, Sasa K, Ikezaki K, Shirota T, Kamijo R
2. 発表標題 Oxygen tension-dependent expression of monocarboxylate transporter-1 is a prerequisite event for oxidative death of chondrogenic ATDC5 cells induced by interleukin-1 .
3. 学会等名 第68回 国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹間雄志, 田中元博, 池崎かおり, 上條竜太郎, 代田達夫
2. 発表標題 イオウ呼吸は軟骨細胞の増殖と骨伸長に必須である：顎変形症の新たな治療戦略に向けて。
3. 学会等名 第65回 公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉崎リサ, 金子児太郎, 上條竜太郎, 近津大地
2. 発表標題 好中球エラスターゼはオステオプロテゲリンを分解し破骨細胞分化の促進に関与する。
3. 学会等名 第65回 公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中元博, 宮本洋一, 吉村健太郎, 笹 清人, 池崎かおり, 代田達夫, 上條竜太郎
2. 発表標題 炎症性軟骨細胞死は酸素分圧に依存したモノカルボン酸トランスポーター1の発現を必要とする.
3. 学会等名 第67回 昭和大学学協会総会
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	山田 篤 (Yamada Atsushi) (50407558)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	

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