

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02881

研究課題名(和文)骨細胞機能障害の解析と治療ターゲットの探索ー遺伝性骨疾患を対象としてー

研究課題名(英文) Analysis of dysfunction of osteocytes to reveal the targets of treatment in genetical bone diseases

研究代表者

大園 恵一 (Ozono, Keiichi)

大阪大学・大学院連合小児発達学研究所・招へい教授

研究者番号：20270770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨形成不全症モデルマウスを作出し、ヘテロマウス(HT)を用いて解析した。HTはWTと比べ12週齢時の体重減少を認め、脊椎および大腿骨海綿骨で骨量、骨梁幅、骨梁数の低下と、骨梁間隙の増加を認めた。大腿骨皮質骨面積の低下を認めた。また、破断変位と破断エネルギーに差を認めた。4-PBA投与実験ではHT雌でP群に比して治療群で体長と体重の改善を認めた(英語論文投稿中)。
低リン血症性くる病モデルHypマウスから単離した骨細胞を用いて、RNA-seqにより網羅的に遺伝子発現を解析した。Hypの骨細胞で発現が増加していた遺伝子が1904、減少していた遺伝子が654検出され、そのシグナル経路などを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨細胞の主要な機能の2つは、骨形成と骨吸収のバランスをとること、および、リンの血中濃度をコントロールすることである。本研究では、研究者らが小児科医であり、小児の骨系統疾患診療を専門としていることから、未だ明らかでない、小児の骨疾患の骨細胞の機能の解析に的を絞った研究である。まず、骨形成不全症(OI)モデル動物を作出し、その骨を解析し、骨細胞機能との関連性を検討する基盤を与えた。また、治療法の開発にも貢献できるモデルであった。X染色体低リン血症性くる病(XLH)のモデルマウスより骨細胞を単離し、網羅的に遺伝子発現を検討した。その結果、リン代謝と骨代謝の接点を示唆するようなデータを得た。

研究成果の概要(英文)：We generated osteogenesis imperfecta (OI) model mice and obtained the heterozygous mice. We compare the heterozygous mice and C57BL/6J wild type (wt) mice in terms of bone volume and bone quality. The heterozygous mice showed less body weight at 12 weeks and had a small osteoporotic bone in vertebrae and the femur. A 3-point bending test demonstrated bone fragility of the heterozygous mice, where the maximum displacement and fracture energy were significantly decreased. The administration of 4-phenylbutyric acid might be effective in increasing body length and weight, but no apparent effects on bone were observed. The hyp mice, a mice model for X-linked hypophosphatemic rickets, served to investigate the gene expression in osteocytes. As a result, 1904 genes were up-regulated and 654 genes were down-regulated. The tentative bioinformatic analysis suggests genes involved in the phosphate signaling pathway were included in the genes differentially expressed.

研究分野：遺伝性骨疾患

キーワード：骨細胞 骨形成不全症 低リン血症性くる病 骨系統疾患 遺伝子発現 骨折

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞からなるが、近年、骨代謝における骨細胞の役割が明らかにされてきた。骨細胞の主要な機能の2つは、骨形成と骨吸収のバランスをとること(骨代謝の司令塔的役割、この基盤は骨細胞がメカニカルストレスを感知すること)および、リンの血中濃度をコントロールすることである。この機能に関連性があるか、その障害がどのような病態を呈するかと言う「問い」の答えは、明らかではない。言い換えると、この2つの機能を持つことは必然性があるのか、単に互いに独立した機能なのかということである。基礎研究によるアプローチも盛んであるが、未だ、上記の「問い」に対する答えはない状況である。

2. 研究の目的

骨細胞が担う、主要機能は、骨形成と骨吸収のバランスをとることおよび、リンの血中濃度をコントロールすることである。本研究では、研究者らが小児科医であり、小児の骨系統疾患診療を専門としていることから、小児の骨疾患の骨細胞に的を絞った研究を行う。骨細胞の機能障害を呈する疾患、骨形成不全症(OI)とX染色体優性低リン血症性くる病(XLH)を対象として、モデル動物から骨を摘出し、骨細胞を採取する方法と、iPS細胞から骨細胞への分化を誘導して解析する方法を用いた研究を行う。その結果、骨量のコントロールとリン代謝の恒常性維持の機能の関連性と骨疾患の発症機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

OIおよびXLHモデルマウス(Hyp)の骨細胞を用いて、RNA-seqにより遺伝子発現プロファイルを明らかにする。bioinformaticsに基づく解析を行い、特異的な遺伝子の発現とその相互関係を明らかにし、それを治療ターゲットに据えることを行う。

(1)OIモデルマウス、XLHモデルマウスを使った研究

研究者らが診療している3型OI患者で見出した、バリエーション(p.G810S)を持つノックインマウス(Col1a1^{G821S/+})を前研究課題の時に作出した。ノックインマウスの作出には、CRISPR-Cas9 Systemを用いた。このモデルマウスを拡大飼育し、体長、骨塩定量、骨強度試験を行う。また、OIのモデル動物として標準的に用いられるoimマウスとも比較検討する。これらのOIモデルマウスより、既報の方法(大腿骨と脛骨を採取し、微細化し、コラゲナーゼによる消化とEGTAによる脱灰を反復することにより、細胞をその分化段階に応じて分画として単離)で、骨芽細胞、骨細胞を単離する。これらからRNAを抽出し、以下に述べるRNA-seqを行う。

XLHモデルマウスであるHypマウスについても同様に骨細胞を単離し、検討する。

(2) OI患者由来、XLH患者由来iPS細胞を使った研究

OI患児由来のiPS細胞は、現在6系統で既に樹立している。XLH患者由来iPS細胞についても、3名の患者で樹立された。iPS細胞から骨細胞への分化誘導を行い、骨系統細胞への分化(石灰化)および骨細胞特異的な遺伝子であるSOST, DMP1, SOST, FGF23, E11等の骨細胞特異的な遺伝子発現を解析する。必要に応じ、蛋白発現についても確認する。培養液中のFGF23とスクレロチンはELISA法により測定する。iPS細胞より分化誘導した骨細胞よりRNAを抽出し、以下に述べるRNA-seqを行う。XLH患者由来iPS細胞についても同様に行う。

(3) RNA-seqおよび解析

骨細胞よりRNAサンプルを次世代シーケンサーによる100bpのpaired-endラン解析を行う。得られたデータはFastQCによるクオリティ確認を行い、trimmomaticでアダプターやロークオリティリードのトリミングを実施し、STARやsalmonを用いてヒト参照ゲノムへマッピングを行う。マッピング後のデータはfeatureCountsやtximportを用いて遺伝子や転写物ごとの相対的発現量へ変換し、発現変動遺伝子の同定や階層的クラスタリングや主成分分析によるクラスタリングを行う。また得られた解析結果をもとにエンリッチメント解析を行い、関連するパスウェイ、シグナルカスケード、遺伝子間相互作用の評価を行う。疾患特異的な遺伝子発現の違いも明らかにする。特に骨細胞の特異的な発現遺伝子で、病態に深く関わるSOST(スクレロチンをコード)、FGF23の発現に影響を示すおよび影響を受ける遺伝子を同定する。

4. 研究成果

【2021年度】

骨形成不全症(OI)患児由来のiPS細胞は、現在6系統で既に樹立している。これらを用いた病態の再現実験とその治療の候補薬の同定に関し、論文にまとめた。樹立されたうちの一人と同じ変異であるp.G810S変異を持つノックインマウスを作出した。飼育施設の改修工事により、受精卵の状態、外部施設にて保存凍結していた。工事終了後の飼育環境整備により、マウスケージが割り当てられたので、受精卵を戻して、マウスを再度作出した。導入バリエーションのヘテロ接合体マウス(HT)を得たが、ホモ接合体マウスは得られなかった。ヘテロマウスにおいて、体重は野生型より小さいところまで観察できたが、骨の表現型の解析のために必要なマウスの数を得るため、現在モデルマウスを増やしている所である。OI患児由来のiPS細胞に対して、CRISPR/Cas9 systemを用いてバリエーションの修復を行うことを試みているが、当該エクソンは短く、最初の設定では修復クローンは得られなかった。別のガイドRNAを作成して、再度試みる予定である。OI患者由来iPS細胞から分化誘導した骨芽細胞、骨細胞の石灰化能および骨細胞特異的な遺伝子発現の特徴を明らかにするため、骨細胞への分化が安定してできるよう、培養条件のマイナーチェンジを行っている。X連鎖性低リン血症性くる病(XLH)患者由来iPS細胞についても、3名の患者で樹立された。これらの患者由来iPS細胞

胞からも骨細胞分化誘導実験を行い、骨細胞特異的遺伝子の発現を検討する予定である。XLHモデルマウスのHypマウスについて、骨細胞を単離し、RNA-seqを行うため、骨細胞単離実験を行っている。また、得られた骨細胞数が少ないので、骨細胞単離を繰り返す予定である。

【2022年度】

p.G810S変異を持つノックインマウスを作出した。導入バリエーションのヘテロ接合体マウス(HT)を得たが、ホモ接合体マウスは得られなかった。HTはWTより体重が小さく、第5腰椎と大腿骨遠位部海綿骨のBV/TVが低く、大腿骨中央部の皮質骨体積と骨髄体積が低く、骨のしなやかさを示す破断変位と破断エネルギーが低かった。モデルマウスの重症度は中等度から重度と考えられるOIモデルマウスを確立したと考えられる。このOIモデルマウスにおける骨細胞機能を検討していく。OI患児由来のiPS細胞に対して、CRISPR/Cas9 systemを用いてバリエーションの修復を行い、アイソジェニックなコントロール細胞を作成することができた。この細胞をコントロールとして、OI患者由来iPS細胞から分化誘導した骨芽細胞、骨細胞の石灰化能および骨細胞特異的遺伝子発現の特徴を明らかにする。未だ、骨細胞への分化が安定しているとは言えないので培養条件を検討中である。XLHモデルマウスのHypマウスについて、骨細胞を単離し、RNA-seqを行った。Bioinformaticsによる解析で、野生型に比べてHypマウスの骨細胞において、発現が増加している、あるいは低下している遺伝子を多数認めたと。例えば、Dmp1(Dentin matrix protein 1), Fam20C(FAM20C Golgi Associated Secretory Pathway Kinase), Fgfr1(Fibroblast growth factor receptor 1), Egr1(Early growth response gene 1)などの発現がHypで明確に高くなっており、これは従来、定量的PCRで得られた結果と一致する。今後、これらの遺伝子の発現のパスウェイ解析などを行い、責任遺伝子であるPHEXの関与を明らかにしていく。

【2023年度】

OIモデルマウス(Col1a1^{G821S/-})の解析：野生型(WT)、ヘテロ接合体(HT)のマウスを3か月齢まで飼育し表現型を確認した。治療群(4-PBA)、プラセボ(P)群(水)の4群に分け4-12週齢に投与し、体長、体重、骨折数、 μ CTおよび、3点曲げ試験で評価した。雌雄共にHTはWTと比べ12週齢時の体重減少を認め、 μ CTで、脊椎および大腿骨海綿骨で骨量(雄WT=32.6 \pm 2.4%, HT=22.6 \pm 3.8%, p<0.01、雌WT=26.1 \pm 2.9%, HT=15.1 \pm 3.0%, p<0.01)骨梁幅、骨梁数の低下と、骨梁間隙の増加を認めた。大腿骨皮質骨面積の低下を認めた。3点曲げ試験では、破断変位と破断エネルギーに差を認めた。骨折はHTで1匹のみに認められた。4-PBA投与実験ではHT雌でP群に比して治療群で体長と体重の改善を認めた(体長105.8%、体重103.3%)。全群で骨折はなかった。HTの治療群はP群に比して雌で大腿骨海綿骨の骨量、骨梁幅、骨梁数に増加傾向、骨梁間隙の低下傾向を認め、雄では骨量、骨梁数の増加、骨梁間隙の低下傾向を認めた。3点曲げ試験では治療による改善を認めなかった。

Hypマウスの骨細胞から回収されるRNAは50ng/匹程度のため、20匹前後のマウスから単離した細胞をプールして1サンプルとし、Hypマウス、WTマウスそれぞれ3サンプルずつ調製して、bulkのRNA-seqにより網羅的に遺伝子発現解析を行った。主成分分析の結果から、Hyp骨細胞と、WT骨細胞との間で、遺伝子発現が大きく異なっていること、各群ではサンプル間でよく類似していることが確認された。また、Hypの骨細胞で発現が増加していた遺伝子が1904、発現が減少していた遺伝子が654検出された。Hyp骨細胞で発現が増加していた遺伝子群においてGene Ontology解析を行った際には、Skeletal system development, Extracellular matrix organizationなど、骨格形成や細胞外基質や細胞外構造の構成などに関わるtermが上がった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 Nakanishi Tatsuuro, Yamazaki Miwa, Tachikawa Kanako, Ueta Ayu, Kawai Masanobu, Ozono Keiichi, Michigami Toshimi	4. 巻 181
2. 論文標題 Complex intrinsic abnormalities in osteoblast lineage cells of X-linked hypophosphatemia: Analysis of human iPS cell models generated by CRISPR/Cas9-mediated gene ablation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 117044 ~ 117044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2024.117044	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 Kubota Takuo, Namba Noriyuki, Tanaka Hiroyuki, Muroya Koji, Imanishi Yasuo, Takeuchi Yasuhiro, Kanematsu Masanori, Sun Wei, Seino Yoshiki, Ozono Keiichi	4. 巻 40
2. 論文標題 Self-Administration of Burosumab in Children and Adults with X-Linked Hypophosphataemia in Two Open-Label, Single-Arm Clinical Studies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advances in Therapy	6. 最初と最後の頁 1530 ~ 1545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12325-022-02412-x	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 Ohata Yasuhisa, Kitaoka Taichi, Ishimi Takeshi, Yamada Chieko, Nakano Yukako, Yamamoto Kenichi, Takeyari Shinji, Nakayama Hirofumi, Fujiwara Makoto, Kubota Takuo, Ozono Keiichi	4. 巻 18
2. 論文標題 Association of trabecular bone score and bone mineral apparent density with the severity of bone fragility in children and adolescents with osteogenesis imperfecta: A cross-sectional study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0290812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0290812	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 Rui Shumin, Kubota Takuo, Ohata Yasuhisa, Yamamoto Kenichi, Fujiwara Makoto, Takeyari Shinji, Ozono Keiichi	4. 巻 164
2. 論文標題 Phosphate promotes osteogenic differentiation through non-canonical Wnt signaling pathway in human mesenchymal stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116525 ~ 116525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2022.116525	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 Takeyari S, Kubota T, Ohata Y, Fujiwara M, Kitaoka T, Taga Y, Mizuno K, Ozono K	4. 巻 296
2. 論文標題 4-phenylbutyric acid enhances the mineralization of osteogenesis imperfecta iPSC-derived osteoblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 100027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014709	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 藤原誠, 石見壮史, 山田知絵子, 武鐘真司, 山本賢一, 中野由佳子, 中山尋文, 大幡泰久, 北岡太一, 窪田拓生, 大園恵一
2. 発表標題 本邦における FGF23 関連低リン血症性くる病・骨軟化症患者の臨床像の解析
3. 学会等名 第41回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大幡泰久, 山田知絵子, 中野由佳子, 山本賢一, 武鐘真司, 藤原誠, 北岡太一, 窪田拓生, 大園恵一
2. 発表標題 当科XLH患者に対するプロスマブ治療長期効果の検討
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Makoto Fujiwara, Taichi Kitaoka, Yasuhisa Ohata, Hirofumi Nakayama, Yukako Nakano, Kenichi Yamamoto, Hiroyuki Saito, Chieko Yamada, Takeshi Ishimi, Ikumi Ueda, Tatsuya Nakamichi, Rieko Takatani, Masanori Minagawa, Inoue Daisuke, Yasuhiro Takeuchi, Seiji Fukumoto, Takashi Akamizu, Keiichi Ozono, and Takuo Kubota
2. 発表標題 Clinical Features of FGF23-Related Hypophosphatemic Rickets/Osteomalacia: A Multicenter National Survey in Japan
3. 学会等名 ASBMR 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤広幸
2. 発表標題 骨形成不全症 (Osteogenesis imperfecta:OI) の疾患モデルマウスの作出と、4-PBA (4-Phenylbutyric acid) の治療効果に対する検討
3. 学会等名 第26回 小児分子内分泌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinji Takeyari, Yasuhisa Ohata, Makoto Fujiwara, Taichi Kitaoka, Takuo Kubota, Keiichi Ozono
2. 発表標題 Col1a1G643S/+ mouse model of osteogenesis imperfecta
3. 学会等名 ASBMR 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武鐘真司, 大幡泰久, 藤原誠, 北岡太一, 窪田拓生, 大園恵一
2. 発表標題 骨形成不全症の新規モデルマウス
3. 学会等名 第55回 日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原誠, 北岡太一, 石見壮史, 山田知絵子, 武鐘真司, 山本賢一, 中野由佳子, 中山尋文, 大幡泰久, 窪田拓生, 大園恵一
2. 発表標題 小児骨形成不全症におけるビスホスホネート治療および体重は血清スクレロスタチン値に影響する
3. 学会等名 第95回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ohata Y, Ishihara Y, Takeyari S, Kubota T, Ozono K
2. 発表標題 Genotype-phenotype analysis, and assessment of the importance of the zinc-binding site in PHEX in Japanese patients with X-linked hypophosphatemic rickets using 3D structure modeling.
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大園 恵一	4. 発行年 2023年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 10
3. 書名 整形・災害外科「骨系統疾患と骨粗鬆症」	

〔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	道上 敏美 (Michigami Toshimi) (00301804)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・骨発育疾患研究部門・部長 (84408)	
研究分担者	窪田 拓生 (Kubota Takuo) (40629135)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	大幡 泰久 (Ohata Yasuhisa) (20805460)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岡田 随象 (Okada Yukinori) (70727411)	大阪大学・大学院医学系研究科・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