

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689006

研究課題名(和文) 創薬応用を目指したヒト骨細胞の分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of osteocyte regulation

研究代表者

西川 恵三 (Nishikawa, Keizo)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤) 助教(常勤)

研究者番号：30516290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：骨代謝疾患の治療において、骨構成細胞(破骨細胞、骨芽細胞と骨細胞)の制御が必要不可欠である。本研究では、創薬研究に資する細胞リソースとしての応用が見込まれる、ヒト及びマウスの幹細胞(iPSやES細胞)から骨構成細胞を分化誘導する培養法を新たに確立した。さらに、確立した分化誘導系を用いて、様々なスクリーニングを実施することで、細胞分化にかかわる新規遺伝子の同定並びに機能解析に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：The development of methods for differentiation of embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cell (iPSCs) into functional cells have helped to analyze the mechanism in regulating cellular processes and to explore for cell-based assays for drug discovery. In this study, we developed methods for differentiation of ESCs and/or iPSCs into bone cells (osteoclast, osteoblast and osteocyte). In addition, we succeeded in identifying transcription factors involved in osteoblast and/or osteocyte differentiation. Our studies could provide important therapeutic targets for bone disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：骨細胞 骨芽細胞 転写因子 iPSC 胚葉体 分化 コンディショナルノックアウト

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を背景に急増する、老齢期の骨疾患である骨粗鬆症は、骨折リスクの増加を伴い、生活の質の低下に直結する。骨粗鬆症には、骨芽細胞の異常による骨形成機能の低下が原因となる低回転型と、破骨細胞による骨吸収の亢進が主な要因である高回転型の2つの病態が知られている。ビスホスホネート系薬剤をはじめとした破骨細胞を標的にもつ骨吸収抑制剤は、骨粗鬆症治療に有効な成果をもたらしている。これに対して、骨芽細胞や骨細胞を標的とした薬剤開発は、未だ発展途上の段階にある。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまで取り組んできたヒト及びマウスの幹細胞(人工多能性幹細胞[iPS]あるいは胚性幹細胞[ES])から様々な機能細胞を分化誘導する培養法を駆使することで、骨構成細胞(骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞)を効率的に分化誘導できる方法論を確立し、創薬研究に資する細胞リソースの技術基盤を確立することを目的とした。さらに、開発した骨細胞の分化誘導系を活用することで、未だ謎が多い骨細胞の分化にかかわる分子メカニズムの解明にも取り組む。

3. 研究の方法

以下の5点の研究計画を実施した。

(1)ヒト iPS 細胞から胚葉体を形成し、骨芽細胞分化の促進因子を過剰発現することで、骨芽細胞、並びに骨細胞を高い効率で分化誘導できる培養法を確立した。

(2)マウス骨芽細胞の分化過程を通して経時的に取得、並びに成獣マウス骨より取得したトランスクリプトームデータを、クラスター解析などの手法を用いて *in silico* 解析することで、骨芽細胞・骨細胞に特異的な新規遺伝子を同定した。

(3)上述したヒト iPS 細胞から骨芽細胞・骨細胞の分化誘導系に対して、shRNA レンチウイルスライブラリーを適用することで、骨芽

細胞・骨細胞の形成にかかわる新規遺伝子の機能的探索を実施した。

(4)骨芽細胞・骨細胞特異的にメチル基転移酵素を欠損したマウスを作出し、 μ CT や病理標本を用いることで、骨組織に対する形態学的影響を解析した。

(5)マウス iPS・ES 細胞から胚葉体を形成し、マクロファージ系前駆細胞、並びに破骨細胞分化にかかわるサイトカインを処理することで、破骨細胞を効率的に分化誘導する培養法を確立した。骨吸収機能の評価は、象牙切片上の培養によって行い、さらに詳細な骨吸収窩の観察を試みるために、走査型電子顕微鏡を用いた観察も実施した。

4. 研究成果

(1)ヒト iPS 細胞から骨芽細胞・骨細胞の分化誘導法の確立。

ヒト iPS 細胞から胚葉体を介して誘導した間葉系様細胞に対して、レンチウイルスベクターを用いて、効率的に RUNX2 を過剰発現した(図1)。その後、骨芽細胞の分化誘導試薬存在下で培養を行ったところ、ALP 陽性で、かつ石灰化結節の形成能を有する骨芽細胞様細胞が誘導された(図2)。

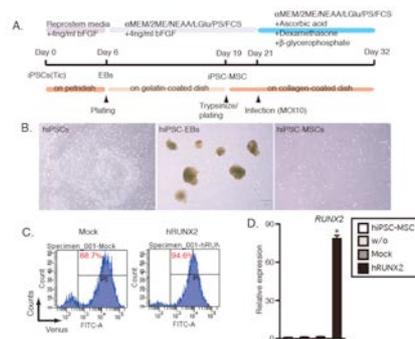


図1 ヒトiPS細胞由来の間葉系様細胞にRUNX2を効率的に発現するベクターの構築

リアルタイム PCR による遺伝子発現解析を実施したところ、骨芽細胞特異的な発現遺伝子である BGLAP1 が顕著に上昇することが明らかとなった(図3)。さらに、長期培養を実施したところ、骨細胞特異的な発現遺伝子である SOST 並びに DMP1 が顕著に上昇することが明らかとなった(図4)。上述したヒト iPS 細胞由来骨芽細胞様細胞を頭蓋骨欠損させたマウスへ移植したところ、有為な骨修復能をもつことが生体レベル

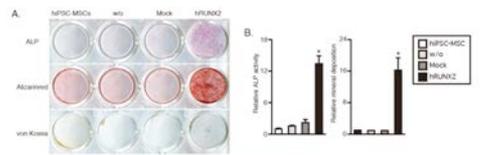


図2 ヒトiPS細胞由来骨芽細胞様細胞の作製

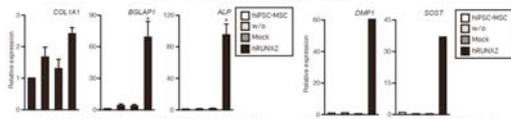


図3 ヒトiPS細胞由来骨芽細胞様細胞の遺伝子発現

図4 ヒトiPS細胞由来骨芽細胞様細胞の作製

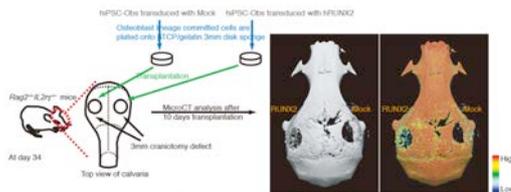


図5 ヒトiPS細胞由来骨芽細胞様細胞を用いた骨修復実験

で明らかとなった(図5)。

(2) *in silico* 解析による骨芽細胞・骨細胞分化にかかわる新規候補遺伝子の同定。

マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞のトランスクリプトームデータから、骨芽細胞分化に伴い発現上昇する163個の転写因子が得られた(図6)。さらに、マウス骨組織のトランスクリプトームデータを用いて、骨細胞特異的な遺伝子と同等な発現パターンを示す転写因子の同定を試みた結果、22個の候補遺伝子の同定に成功した。

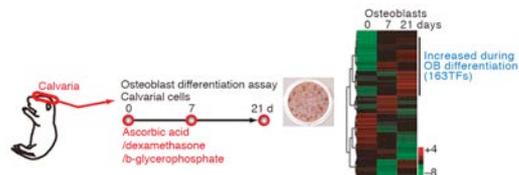


図6 骨芽細胞の分化過程で上昇する163転写因子の同定

(3) shRNA レンチウイルスライブラリーを用いた骨芽細胞・骨細胞分化にかかわる新規候補遺伝子の同定。

ヒト iPS 細胞由来の間葉系様細胞に対して、shRNA レンチウイルスライブラリーを用いて各遺伝子のノックダウン効果を検討した。骨芽細胞分化への影響を評価する手法として、石灰化結節を染色するアリザリンレッドを用いて評価した。その結果、Tcfcp2l 遺伝子が、骨細胞の前駆細胞である骨芽細胞の分化に重要な役割を担うことが明らかとなった(図7)。

(4) 骨芽細胞・骨細胞特異的にメチル基転移酵素を欠損したマウスの骨表現型の解析。

骨芽細胞・骨細胞特異的にメチル基転移酵素を欠損したマウスを作成するために、メチ

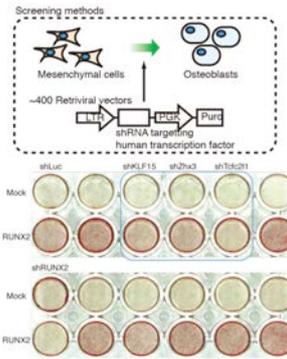


図7 shRNAライブラリーを用いた発現スクリーニング

ル基転移酵素の flox マウスと骨芽細胞・骨細胞特異的に Cre を発現する系統である I 型コラーゲン-Cre マウスとの交配を行った。作出した骨芽細胞・骨細胞特異的にメチル基転移酵素を欠損したマウスの骨表現型を、 μ CT を用いて解析を行った(図8)。

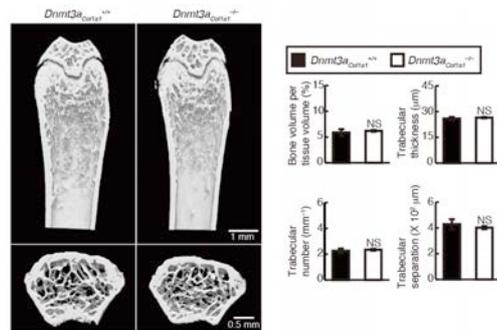


図8 メチル基転移酵素の骨芽細胞・骨細胞特異的な欠損マウスの骨表現型

(5) マウス iPS・ES 細胞から破骨細胞を効率的に分化誘導する培養法の確立。

マウス iPS・ES 細胞から誘導した胚葉体を、IL3 と M-CSF 存在下で長期培養することで、CD11b 陽性の破骨前駆細胞を誘導した(図9)。さらに、マウス iPS・ES 細胞由来の破骨前駆細胞に対して、破骨細胞分化誘導因子である RANKL を処理することで、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性の多核の破骨細胞様細胞が分化誘導された(図10A)。

リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析を実施したところ、破骨細胞特異的な遺伝子(Ctsk, Acp や Nfatc1)の増加が観察された(図10B)。誘導された破骨細胞様細胞を象牙切片上で培養を行った結果、顕著な骨吸収窩が形成されたことから、誘導された細胞が骨吸収活性をもつことが明らかとなった。

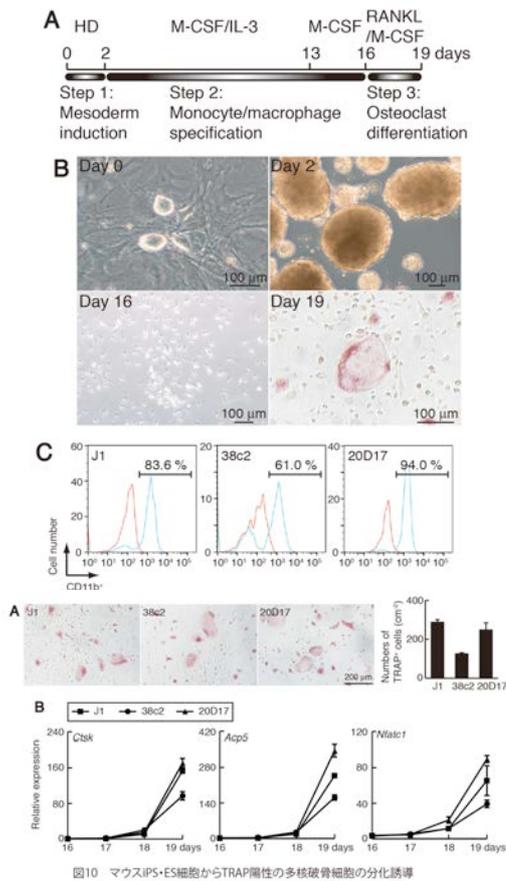


図10 マウスiPS-ES細胞からTRAP陽性の多核破骨細胞の分化誘導

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kamitani-Kawamoto A, Hamada M, Moriguchi T, Miyai M, Saji F, Hatamura I, Nishikawa K, Takayanagi H, Hitoshi S, Ikenaka K, Hosoya T, Hotta Y, Takahashi S, Kataoka K, MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development. *Journal Bone and Mineral Research* 24, 2463-72, 2011.
- ② Maruyama A, Nishikawa K, Kawatani Y, Mimura J, Hosoya T, Harada N, Yamamoto M, Itoh K, The novel NRF2-interacting factor KAP1 regulates susceptibility to oxidative stress by promoting the NRF2-mediated cytoprotective response. *Biochemical Journal* 436, 387-97, 2011.
- ③ 西川恵三、高柳広 Maf は加齢に伴う間葉系細胞分化の運命決定に関与し、骨芽細胞分

化を促進する 実験医学 29, 927-930, 2011

- ④ Nishikawa K, and Takayanagi H Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation *Osteo Lipid Vascular&Endocrinology* 1, 35-41, 2011
 - ⑤ 西川 恵三、老人性骨粗鬆症に関する分子機構の解明と創薬応用、日本老年医学会雑誌 49, 314-317, 2012
 - ⑥ 西川 恵三、遺伝子操作を用いた新規レポーターマウスの作出方法、実験医学別冊 202-211, 2013
 - ⑦ Kagawa Y, Matsumoto S, Kamioka Y, Mimori K, Naito Y, Ishii T, Okuzaki D, Nishida N, Maeda S, Naito A, Kikuta J, Nishikawa K, Nishimura J, Haraguchi N, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Ishii H, Doki Y, Matsuda M, Kikuchi A, Mori M, Ishii M, Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo. *PLoS one* 30, e83629, 2013
 - ⑧ Nishikawa K, Iwamoto Y, Ishii M, Development of an *in vitro* culture method for stepwise differentiation of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cell into mature osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* in press.
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 西川恵三、老人性骨粗鬆症に関する分子機構の解明と創薬応用、第 53 回日本老年医学学会学術集会 東京 2011 年 6 月 15-17 日
 - ② 西川恵三、加齢に伴う骨量減少を制御する転写メカニズムの研究、骨発生・再生研究会 (中外製薬株式会社) 東京 2011 年 11 月 12 日
 - ③ Nishikawa K、Active repression by Blimp1 play an important role in osteoclast differentiation、BRIC-GARN Tokyo Meeting 2011 東京 2011 年 11 月 14-16 日

- ④ 西川恵三、高柳広、Maf mediates the age-related switch in mesenchymal cell differentiation、第 85 回日本薬理学会年会 大阪 2012 年 3 月
- ⑤ 西川 恵三、破骨細胞のエピジェネティック制御機構の解明、アステラス病態代謝研究報告会 東京 2012 年 10 月 20 日
- ⑥ 西川 恵三、骨生物学の分子基盤の解明と創薬応用、奈良先端未来開拓コロキウム 奈良 2012 年 12 月 7 日
- ⑦ 西川 恵三、岩本 依子、石井優、胚性幹細胞・誘導多能性幹細胞から破骨細胞を分化誘導する培養法の開発、第 35 回日本分子生物学会 福岡 2012 年 12 月 12 日
- ⑧ 西川 恵三、骨生物学の分子基盤の解明と創薬応用、奈良先端未来開拓コロキウム 奈良 2012 年 12 月 7 日
- ⑨ 西川 恵三、破骨細胞分化にかかわる細胞内エネルギー代謝調節の分子機構と生理的意義の理解、若手ワークショップ@鬼怒川 栃木 2013 年 1 月 25 日
- ⑩ 西川 恵三、抑制性転写制御から理解する破骨細胞分化の制御機構、第 4 回新医学領域創生セミナー 宮城 2013 年 5 月 23 日
- ⑪ 西川 恵三、岩本 依子、石井優、胚性幹細胞・誘導多能性幹細胞から破骨細胞を分化誘導する培養法の開発、第 86 回日本生化学会年会 神奈川 2013 年 9 月 12 日
- ⑫ 西川 恵三、Dnmt3a as a novel nexus coordinating metabolism and epigenetics in osteoclasts、13th IFRc Colloquium 大阪 2013 年 12 月 18 日
- ⑬ 西川 恵三、岩本 依子、石井優、Development of an *in vitro* culture method for stepwise differentiation of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cell into mature

osteoclasts.、第 87 回日本薬理学会年会

宮城 2014 年 3 月 20 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

名称:

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 恵三 (NISHIKAWA KEIZO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号: 30516290

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし