

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293340

研究課題名(和文) ゲノム改変技術を基盤とする骨粗鬆症の病態解明と再生医療

研究課題名(英文) Pathogenesis and regenerative therapy of osteoporosis

研究代表者

松田 修 (Mazda, Osam)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00271164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症には多因子遺伝性の素因が知られている。骨密度と骨粗鬆症の発症に 관련된多くのSNPsが見出されているが、どのような分子メカニズムを介して骨密度と骨粗鬆症の発症頻度の違いに結びつくのかはほとんど明らかにされていない。我々は線維芽細胞を骨芽細胞に直接コンヴァートする技術を用いて、上記のSNPsのいくつかについて、骨芽細胞の分化能とシグナル伝達に与える効果を検証した。本研究は、骨芽細胞分化におけるSNPsとフェノタイプ相違の相関とそのメカニズムの理解を加えるのみならず、遺伝的素因と病態発現機構の解明、個別化医療等につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It is well known that multiple genetic factors are involved in the pathogenesis of osteoporosis. Some SNPs are associated with bone density and the incidence of the osteoporosis. But molecular mechanisms underlying the causative link between the SNPs and bone phenotypes remain to be clarified. We examined influence of some of these SNPs to the differentiation of and signal transduction in osteoblasts, using the direct conversion procedure that reprograms human fibroblasts into osteoblasts. The study may provide insights into the relationship between the SNPs and osteoblast differentiation, leading to understanding of the involvement of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. The findings may also contribute to establishment of novel tailor-made therapy in the future.

研究分野：再生医学

キーワード：骨粗鬆症 骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨粗鬆症に多因子遺伝性の素因があることは広く知られている。骨密度と骨粗鬆症の発症に相関した多くの一塩基多型 (SNPs) が見出されているが、これらの SNPs がどのような分子メカニズムを介して、骨密度と骨粗鬆症の発症頻度の違いというフェノタイプに關与するのかに關しては、これまでのところほとんど明らかにされていない。

(2) そこで我々は、線維芽細胞を骨芽細胞に直接コンヴァートする技術 (ダイレクトプログラミング) を開発した。すなわち、ヒト正常線維芽細胞に Runx2、Osterix、Oct3/4、L-Myc の 4 因子の遺伝子を導入して培養すると、その 80%以上が、ALP 陽性で高い骨基質形成能を有し、正常骨芽細胞に類似したゲノムワイドな遺伝子発現パターンを呈する骨芽細胞に運命転換する (Yamamoto et al., Proc Natl Acad Sci, USA, 2015)。免疫不全マウスの大腿骨に骨欠損をつくり、ここにこの骨芽細胞を異種移植すると、体内でヒト骨基質を産生し骨再生を促進する。さらに、これとは異なる誘導法についても開発した。

(3) これらの体細胞リプログラミング技術とゲノム改変技術を用いて、上記(1)の SNPs のいくつかに關して、骨芽細胞の分化とシグナル伝達に關与するメカニズムを検証した。すなわち、低骨密度と相関する SNPs のゲノタイプが異なるヒト細胞を準備して骨芽細胞へのダイレクト・リプログラミングを検証するとともに、得られた骨芽細胞のフェノタイプ、機能とシグナル伝達を解析した。

## 2. 研究の目的

(1) 体細胞リプログラミング技術を用いて、骨密度と骨粗鬆症の発症に相関した代表的な SNPs が骨芽細胞の分化能とシグナル伝達に与える効果を比較、精査し、SNPs がこれらのフェノタイプの相違に結びつくメカニズムの解明につなげることを目的とする。

(2) 骨密度と骨粗鬆症の発症に相関した SNPs がフェノタイプに關連するメカニズムに着目した研究はほとんど行われておらず、本研究は極めてユニークで斬新なものである。また、ヒト骨芽細胞のダイレクト・リプログラミングは、我々だけが有する革新的技術であり、高い独創性と先進性がある。

(3) 本研究の成果は、骨粗鬆症、とくに骨粗鬆症性骨折後長期間の癒合不全に対するテーラーメイド遺伝子矯正再生医療につながるものと期待できる。

## 3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞の誘導法(1)。ヒト線維芽細胞を完全培地 (10%FBS、100 mM nonessential amino acids、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin を添加した DME 培地) に再懸濁し、 $3 \times 10^4$ /well の濃度で播種して培養した。Runx2、Osterix、Oct3/4、L-Myc の 4 因子の遺伝子をそれぞれ pMX に組み込んだレトロウイルスベクター・プラスミドを、pCMV-VSV-G と共にそれぞれパッケージング細胞 PLAT-GP に X-treme Gene 9 を用いて導入した。得られたレトロウイルスベクターを混和して、4 µg/mL polybrene 存在下で線維芽細胞に感染させた。24 時間後、培地をフレッシュな骨芽細胞誘導培地 (10%FBS、10 mM グリセロフォスフェート、50 µg/mL アスコルビン酸、100 nM デキサメサゾン) を添加した DME 培地) に交換し、その後 2~3 日おきにフレッシュな培地に交換して培養した。コントロールとして非感染の細胞も準備した (Yamamoto et al., Proc Natl Acad Sci, USA, 2015)。

(2) 骨芽細胞の誘導法(2)。ヒト線維芽細胞を、上記と異なる方法で骨芽細胞にコンヴァートさせた (Yamamoto et al., 論文投稿準備中)。

(3) 標的遺伝子の改変。CRISPR/Cas9 を用いて、Kishida T, Ejima A, & Mazda O. Front Microbiol. 2016 に記載した方法で行った。シーケンシングは通常の方法で行った。

(4) リン酸カルシウムの沈着の可視化。Alizarin red S 染色、および von Kossa 法による染色は、Yamamoto et al., J Cell Biochem, 2016 に記載した方法で行った。また Alizarin red S 染色後の上清を回収し、吸光度を測定することで定量化した。

(5) mRNA 発現の定量。細胞から ISOGEN II (Nippon Gene) を用いて mRNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RTMaster Mix (Toyobo) を用いて逆転写した後、目的とする遺伝子または アクチン遺伝子に特異的な probe/primers と Real-Time PCR Master Mix (Toyobo) を用いて、7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で Real-time RT-PCR 解析を行った。アクチン遺伝子の mRNA レベルで除した相対発現量を算出した。

(6) 免疫染色。細胞を 4% paraformaldehyde 中で 4°C で 30 分間固定した。PBS でウォッシュ後、一次抗体を加えて 4°C で 24 時間インキュベートした。その後、Alexa fluor 488 をコンジュゲートした 2 次抗体を加えて

1 時間インキュベートした。ウォッシュ後、蛍光顕微鏡で観測した。

(7) 本研究の遺伝子組換え実験はすべて認可を得て行った。

#### 4. 研究成果

研究成果の一部を図 1 ~ 3 に示す。

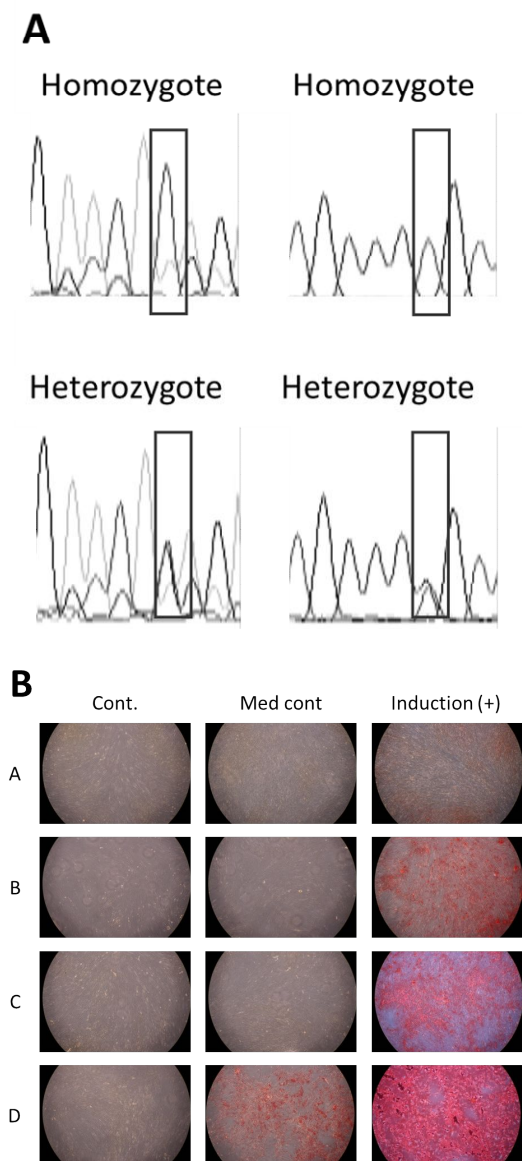


図 1  
線維芽細胞のゲノタイプと骨芽細胞誘導。  
A, シーケンシングにより確認した SNPs のゲノタイプの例。B, 細胞 A,B,C,D を、研究の方法(2)の方法で骨芽細胞に誘導した。コントロールとして、誘導しない細胞も準備した。継時的に Alizarin red S 染色を行って光学顕微鏡で撮像し、また染色性を定量した。代表的な低倍率の光学顕微鏡イメージを示す。赤色の染色はリン酸カルシウムの沈着を示す。

同じ条件で骨芽細胞へのコンバージョンを行っても、リン酸カルシウムの沈着の程度が大きくことなり、コンヴァートする効率が大きく異なることが分かった。

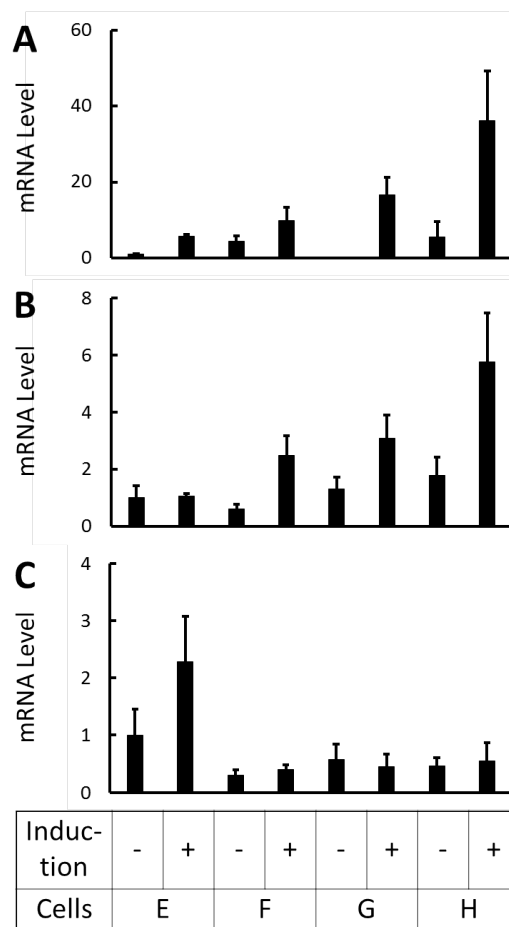


図 2  
図 1 と同様に、細胞 E~H から骨芽細胞へのコンバージョンを誘導した。コントロールとして、誘導しない細胞も準備した。これらの細胞から継時的に mRNA を抽出し、目的の遺伝子に特異的な probe と primers を用いて、「研究の方法」(5)に記載した方法で **real-time RT-PCR** 解析を行った。数値はアクチン遺伝子の mRNA レベルで補正した相対値 (average + / - S.D.) である。

図 2 A, B の結果から、同じ条件で線維芽細胞から骨芽細胞にコンヴァージョンさせても、骨芽細胞特異的の遺伝子の mRNA 発現は大きく異なることが分かった。

一方、図 2 C は、SNPs のゲノタイプと骨芽細胞誘導との相関に寄与している可能性があると本研究で仮説を立てて注目して検証した、あるシグナル伝達パスウェイに関連する結果である。

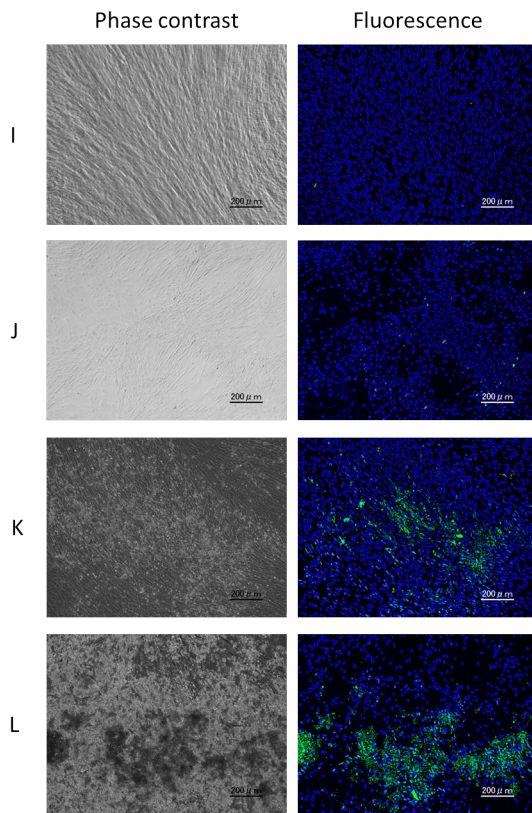


図3  
図1と同様に、細胞I~Lから骨芽細胞へのコンバージョンを誘導した。これらの細胞に、「研究の方法」(6)に記載した方法で免疫染色を行った。位相差(左)および蛍光(右)顕微鏡イメージを示す。

他のデータは割愛するが、骨密度と骨粗鬆症の発症に related SNPs がどのような分子メカニズムを介して骨密度と骨粗鬆症の発症頻度の違いに関連するのかは、骨粗鬆症の遺伝的素因と病態発現機構、個別化医療の観点から極めて重要であり、本研究の成果はその理解に貢献する可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- 1) Direct Conversion of Human Fibroblasts into Schwann Cells that Facilitate Regeneration of Injured Peripheral Nerve In Vivo.  
Sowa Y, Kishida T, Tomita K, Yamamoto K, Numajiri T, Mazda O\*.  
Stem Cells Transl Med. 2017 Apr;6(4):1207-1216. (査読あり)

- 2) Generation of Directly Converted Human Osteoblasts That Are Free of Exogenous Gene and Xenogenic Protein.  
Yamamoto K, Sato Y, Honjo K, Ichioka H, Oseko F, Sowa Y, Yamamoto T, Kanamura N, Kishida T, Mazda O\*.  
J Cell Biochem. 2016 Nov;117(11):2538-45.  
(査読あり)

- 3) Hypoxia Potentiates Anabolic Effects of Exogenous Hyaluronic Acid in Rat Articular Cartilage.  
Ichimaru S, Nakagawa S, Arai Y\*, Kishida T, Shin-Ya M, Honjo K, Tsuchida S, Inoue H, Fujiwara H, Shimomura S, Mazda O, Kubo T.  
Int J Mol Sci. 2016 Jun 25;17(7). pii: E1013.  
(査読あり)

- 4) Transduction of Oct6 or Oct9 gene concomitant with Myc family gene induced osteoblast-like phenotypic conversion in normal human fibroblasts.  
Mizoshiri N, Kishida T, Yamamoto K, Shirai T, Terauchi R, Tsuchida S, Mori Y, Ejima A, Sato Y, Arai Y, Fujiwara H, Yamamoto T, Kanamura N, Mazda O\*, Kubo T.  
Biochem Biophys Res Commun. 2015 Nov 27;467(4):1110-6. (査読あり)

- 5) Femoral perfusion after pulsed electromagnetic field stimulation in a steroid-induced osteonecrosis model.  
Ikegami A, Ueshima K, Saito M\*, Ikoma K, Fujioka M, Hayashi S, Ishida M, Fujiwara H, Mazda O, Kubo T. Bioelectromagnetics. 2015 Jul;36(5):349-57. (査読あり)

6) Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors

Yamamoto K, Kishida T, Sato Y, Nishioka K, Ejima A, Fujiwara H, Kubo T, Yamamoto T, Kanamura N & Mazda O\*. Proc Natl Acad Sci USA. 2015 May 12;112(19):6152-7. (査読あり)

7) Inhibition of osteoclastogenesis by osteoblast-like cells genetically engineered to produce interleukin-10.

Fujioka K, Kishida T, Ejima A, Yamamoto K, Fujii W, Murakami K, Seno T, Yamamoto A, Kohno M, Oda R, Yamamoto T, Fujiwara H, Kawahito Y, Mazda O\*. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jan 16;456(3):785-91. (査読あり)

8) HIF-1 $\alpha$ -induced HSP70 regulates anabolic responses in articular chondrocytes under hypoxic conditions. Tsuchida S, Arai Y, Takahashi KA, Kishida T, Terauchi R, Honjo K, Nakagawa S, Inoue H, Ikoma K, Ueshima K, Matsuki T, Mazda O, & Kubo T. J Orthop Res. 2014 Aug;32(8):975-80. (査読あり)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

[http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/microbiol/research/project\\_3.html](http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/microbiol/research/project_3.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 修 (MAZDA, Osam)  
(京都府立医科大学・医学研究科・教授)  
研究者番号: 00271164

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者  
新井 祐志 (ARAI, Yuji)  
(京都府立医科大学・医学研究科・講師)  
研究者番号: 50347449

北畠 康司 (KITABATAKE, Yasuji)  
(大阪大学・医学系研究科・助教)  
研究者番号: 80506494

(4) 研究協力者  
岸田 綱郎 (KISHIDA, Tsunao)  
(京都府立医科大学・医学研究科・准教授)  
研究者番号: 00370205

扇谷 えり子 (OHGITANI, Eriko)  
(同・助教)  
研究者番号: 80300820

渡邊 映理 (WATANABE, Eri)  
(同・助教)  
研究者番号: 20433253

新屋 政春 (SHIN-YA, Masaharu)  
(同・助教)  
研究者番号: 10405277

西岡 敬介 (NISHIOKA, Keisuke)  
(同・大学院生)