

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463098

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞への転写因子Msx2導入による骨芽細胞への分化・骨形成に関する研究

研究課題名(英文) A study of osteoblast differentiation and osteogenesis in transcription factor Msx2-transfer human iPS cells

研究代表者

山本 芳丈 (YAMAMOTO, Yoshitake)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：50380465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯科矯正治療分野において不可欠である骨組織のリモデリングや再生を担う骨芽細胞の分化調節機構に關与すると考えられている転写因子Msx2の役割については、これまで殆んど明らかにされていない。そこで本研究ではiPS細胞を用いて、骨芽細胞への分化や骨形成におけるMsx2の役割について検討を行うことにした。Msx2遺伝子を導入したiPS細胞とフィーダー細胞を共存培養し、その分化能や骨形成能についての検討を行うため、細胞分化関連遺伝子のmRNA発現やALP活性、さらには石灰化能等について調べた。これらの結果、転写因子Msx2はiPS細胞から骨芽細胞への細胞分化に対して重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：There have been no clear reports so far that transcription factor Msx2 gene take part in the mechanism of osteoblast differentiation, which is responsible for the bone remodeling and regeneration in orthodontic treatments. The purpose of this study, therefore, was to investigate the roles of transcription factor Msx2 in osteoblast differentiation and osteogenesis with Induced Pluripotent Stem (iPS) cells. iPS cells which transfected with Msx2 gene were cocultured with feeder cells, and mRNA levels of osteoblastic phenotype and alkaline phosphatase activity were determined for osteoblast differentiation and osteogenesis. The value of bone nodules was also determined for mineralization. As a result, it was suggested that transcription factor Msx2 play a key role in controlling osteoblast differentiation from iPS cells.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨芽細胞 細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

骨組織の構成細胞における骨細胞や骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞といった各種細胞の中でも骨の形成と吸収を担う骨芽細胞と破骨細胞の相互作用による骨免疫と呼ばれる反応において、両者のバランスが崩れると様々な骨代謝疾患を引き起こすことから、これらの細胞が治療の標的細胞として注目され、骨研究の中でも重要な位置を占めていると考えられている。

歯科矯正治療分野においても重要と考えられているこの骨免疫反応は生体内における微小環境下において分化増殖する免疫系細胞のサイトカイン産生や細胞膜上の分子を介した骨格系細胞の分化および機能制御といった関与により何らかの影響を受けていることが推察されている。このため生体防御に伴う免疫応答や自己免疫疾患による免疫系の異常な活性化等は骨代謝に直接的な影響を及ぼすことから、骨代謝制御における重要性が認識されるようになってきた。目的の位置へ歯を移動させることを治療ゴールとし、その歯の歯根周囲骨組織にリモデリングを生じさせ、歯の移動が引き起こされる歯科矯正治療分野においては、細胞分子レベルでの免疫系による骨代謝制御機構のメカニズムの解明が大きく期待されている。そのため、骨吸収を担う破骨細胞の細胞分化の制御には骨芽細胞がかなり密接に関わっており、骨吸収促進因子による破骨細胞の活性化や破骨細胞分化抑制因子による細胞分化制御機構については骨芽細胞を介して行われていることより、歯の移動における骨組織のリモデリングにおいても骨芽細胞の細胞分化や骨形成能と共に破骨細胞の細胞誘導能にも注目する必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

骨芽細胞は未分化な間葉系幹細胞から前駆骨芽細胞および前骨芽細胞を経て、成熟骨芽細胞、そして骨細胞に至り、その細胞分化過程において骨芽細胞の細胞分化マスター転写因子 Runt related transcription factor 2 やその他の様々な転写因子により、その細胞分化が精密に制御されていると考えられているが、その詳細な機能や相互作用、あるいはその生理的な意義などについては未だ殆んど解明されていないのが現状である。

骨芽細胞の細胞分化における多くの転写因子の中のその1つと考えられている Msh homeobox 2 は、DNA 結合タンパクであり、その標的遺伝子およびその下流遺伝子についてはこれまで不明であったが、近年のノックアウトマウスを用いたいくつかの研究に

より、個体レベルでの生体での多種機能が明らかにされつつあり、骨組織形成における骨化(石灰化)までの過程に障害が認められている。また、骨芽細胞の細胞分化に重要とされる因子の発現が骨軟骨組織で低下していたことにより、Msh homeobox 2 は骨芽細胞の細胞分化に密接に関与するのではないかと考えられているが、しかしながら骨芽細胞の骨形成機能における分子機構や細胞分化制御機構に対して、どのように関与がなされているのかについては未だ不明な点が多く、Msh homeobox 2 自体に関してのその役割の解釈には、これまで様々な考えが存在する。

そこで本研究では、多能性幹細胞株である Embryonic Stem (胚性幹細胞: ES) 細胞および Induced Pluripotent Stem (人工多能性幹細胞: iPS) 細胞の2種類の性質の異なる細胞、その中でも主に iPS 細胞を用いて、成熟な骨芽細胞への細胞分化過程および骨形成能に対する Msh homeobox 2 遺伝子自体のその役割についての様々な検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

まず初めにヒト iPS 細胞の細胞培養系を確立する前に、マウスを用いてその細胞培養実験系において目的遺伝子のトランスフェクションを行っていないノーマルなマウス Embryonic Stem 細胞、および Induced Pluripotent Stem 細胞の各培養細胞のそれぞれとマウスのフィーダー細胞とを共に共存培養し、その始めの実験段階として実験系全体のコントロールとすべくマウス Embryonic Stem 細胞培養系およびマウス Induced Pluripotent Stem 細胞培養系の培養体制をそれぞれ樹立し、この各種細胞培養系に骨芽細胞への細胞分化誘導因子を加えることで骨芽細胞への細胞分化を誘導させることとした。

次に、GFP (緑色蛍光タンパク質) で標識した Msh homeobox 2 遺伝子をトランスフェクションしたマウス Embryonic Stem 細胞とフィーダー細胞とを培養プレート上で共存培養し、その後増殖させたマウス Embryonic Stem 細胞を均等に分離して浮遊培養させ作製した EB: Embryoid Body の細胞凝集塊に細胞分化誘導因子を加え、35 日間の培養を行った。また、マウス Induced Pluripotent Stem 細胞についても、同様の培養方法・条件(ただし、適切な培養初期細胞数は細胞種により異なる)にて細胞培養を行った。その中でも特に、Induced Pluripotent Stem 細胞については、Induced Pluripotent Stem 細胞作製段階において導入転写因子数のそれぞれ異なる 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) と 3 因子

(Oct3/4, Sox2, Klf4)の2種類の細胞種を用いた。

それぞれの細胞株の培養期間中において、0, 7, 21, 35 日後に培養細胞をそれぞれ採取し、骨芽細胞への分化能について検討するにあたり、RT-PCR 法を用いた分析を行うために各培養期間の採取細胞より Total mRNA を抽出した。抽出したそれぞれのmRNA より、Msh homeobox 2 を含む骨芽細胞関連因子(Runt related transcription factor 2, type collagen, osteopontin, osteocalcin など)の各種 mRNA 発現の比較検討を行った。その際の比較基準における各 mRNA のコントロールとして Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の mRNA 発現を用いることとした。さらに、骨芽細胞の細胞分化マーカーとしてアルカリフォスファターゼ活性(ALP 活性)の染色を行うことにより、骨芽細胞分化についての解析を行う目的で各細胞培養期間中に、それぞれの細胞グループを細胞培養プレート上にて固定した。また、この細胞培養系では培養 35 日後の最終日においても培養細胞を固定し、骨芽細胞の石灰化能について検討するため、細胞培養プレート上に形成された骨様の石灰化ノジュール(凝集塊)を Von Kossa 法を用いて染色し、その石灰化した表面積や形成されたノジュール数についても画像解析のために、画像解析用イメージアナライザーソフトを用いた。

#### 4. 研究成果

Msh homeobox 2 遺伝子のトランスフェクションを行っていないノーマルマウス Embryonic Stem 細胞およびノーマルマウス Induced Pluripotent Stem 細胞をそれぞれ単独で細胞培養した結果、それぞれの異なる細胞培養系において骨芽細胞への細胞分化誘導因子を加えても、殆んど骨様の石灰化物を形成するまでには至らなかった。

そこで、それぞれの細胞グループをまずマウスのフィーダー細胞と一緒に細胞培養プレート上で共存培養を行い、その後それぞれプレートから分離した Embryonic Stem 細胞もしくは Induced Pluripotent Stem 細胞を用いて、Embryoid Body を新たに作製し、そこへ骨芽細胞分化誘導因子を培養上清中に添加したところ、多くの骨様石灰化物を形成するまでには至らなかったが、少なくとも骨形成能を有する細胞集団へと細胞分化させることができたことを確認し、骨芽細胞への細胞分化を誘導することにまず成功した。これにより、この後の研究ではこれらの細胞培養系をそれぞれ確立された実験系として用いることで、細胞培養実験を進めていくことにした。

さらにこの実験系において、マウス Embryonic Stem 細胞および Induced Pluripotent Stem 細胞それぞれに非ウイルスベクター法であるリポフェクション法による化学的手法を用いて、Msh homeobox 2 遺伝子のトランスフェクションを行った。それぞれの遺伝子導入効率については、生物学的手法であるウイルスベクター法にはやや劣るものの、マウス Embryonic Stem 細胞および Induced Pluripotent Stem 細胞それぞれに目的遺伝子が導入されたことを確認(GFP 陽性反応を顕微鏡下にて確認)した上で、ノーマルなもの(ネガティブコントロール)と同様に骨芽細胞への細胞分化誘導実験を行った。その結果、Msh homeobox 2 遺伝子のトランスフェクションを行った細胞群では、細胞培養最終日において形成された骨様石灰化ノジュールの表面積量が増大し、骨形成能力が明らかに促進されたと考えられた。また、アルカリフォスファターゼ活性(ALP 活性)の強い陽性細胞の分布にも変化が認められた。つまり、ノーマルなマウス Embryonic Stem 細胞および Induced Pluripotent Stem 細胞では、培養プレート上の細胞集団において全体的に弱い細胞活性が認められたが、Msh homeobox 2 遺伝子のトランスフェクションを行なったマウス Embryonic Stem 細胞および Induced Pluripotent Stem 細胞では、細胞が凝集した周辺において特に強い細胞活性が認められた。また、それぞれの細胞の細胞分化に対する影響について分析するために調べた骨芽細胞分化関連遺伝子の mRNA の発現についても、RT-PCR の結果として、骨芽細胞への細胞分化を促進させる傾向を示す発現パターンがそれぞれ確認された。これらのことより、骨芽細胞の細胞分化過程において最も重要な転写因子である Runt related transcription factor 2 ほどの大きな影響力は認められなかったものの、これらの発現に対し相互的に促進的な関与をすることで結果として骨芽細胞への細胞分化や細胞自身の持つ機能活性能力を制御していることが推察された。したがって、結論的に転写因子 Msh homeobox 2 の導入により、多能性幹細胞から成熟骨芽細胞への細胞分化過程およびその骨形成過程において、他の関連因子と相互作用し、細胞種非依存性に促進的な影響を及ぼす転写因子として作用している可能性が示唆され、またその影響の程度は、同じ Induced Pluripotent Stem 細胞間においても細胞種によって異なることが考えられた。

本研究の今後の展望として、今回マウス胚性幹細胞と人工多能性幹細胞を用いてこれまで行ってきた手法と同様に、さらに発展的な研究としてヒトの Induced Pluripotent Stem 細胞を用いた同様な検証を行い、より実践的な臨床への応用を検討してきたが、それと併用する実験系として、今回用いた細胞培養系にメカニカルストレスや磁場の刺激

等を加え、その刺激の応答に対する Msh homeobox 2 の発現やその変化あるいは、それに伴う細胞分化や機能活性などへの影響についても、これまでに検討を進めている。メカニカルストレスに関する実験系については、細胞培養プレート自体に圧力や遠心力を負荷することにより、また磁場刺激については、高い磁束密度を発生させる磁場を細胞培養環境下に与えることで生じさせており、特にこれらの刺激は細胞へ負荷するタイミングがとて重要であると予測されるため、いくつかの実験的負荷の組み合わせにより、その反応を確かめる予定である。また一方で、In vitro での研究のみにとどまらず、In vivo での研究もかなり重要であると考えられるため、In vivo におけるマウスやラットを用いた歯牙の移動動物実験モデルにおける Msh homeobox 2 の発現変化および骨関連因子との関係性を明らかにするための HE 染色や免疫染色等を用いたそれぞれの関連性についても随時解析を行なっていく予定である。またその際、骨芽細胞とともに重要であると考えられる破骨細胞との相互作用に関しても注目し、骨組織のリモデリング時にどのような役割や相互作用を有するのかについても検討を行うために、破骨細胞の細胞分化や細胞融合あるいはその局在や骨吸収能力といった起こりうる機能的な変化などについても今後分析を行なっていく予定である。最終的には有用性の高い実際の臨床応用を含めたヒト Induced Pluripotent Stem 細胞や Embryonic Stem 細胞による研究成果の実現を果たすことが重要であると考えられる。

#### 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 1 件)

山本 芳丈、國則 貴玄、白方 良典、宮脇 正一、A combined approach of application of Endogain® and orthodontic therapy for intrabony defects in maxillary protrusion、J. Kyushu Orthod Soc、査読有、Vol.12、No.1、2016、pp.28-36

〔学会発表〕(計 2 件)

山本 芳丈、三井 薫、小賤 健一郎、宮脇 正一、Effects of Msx2 gene on osteoblasts differentiated from iPS cells in comparison with ES cells、日本矯正歯科学会学術大会、2017年10月、札幌

山本 芳丈、白方 良典、末廣 史雄、宮脇 正一、Orthodontic tooth movement into

one-wall intrabony defects with autogenous bone grafts in experimental animal model、日本矯正歯科学会学術大会、2015年11月、福岡

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山本 芳丈 (YAMAMOTO, Yoshitake)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：50380465

##### (2) 研究分担者

白方 良典 (SHIRAKATA, Yoshinori)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：60359982

##### (3) 連携研究者

該当なし

##### (4) 研究協力者

三井 薫 (MITSUI, Kaoru)

小賤 健一郎 (KOSAI, Kenichiro)