

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670669

研究課題名(和文)骨特異的プロモーター+レポーター遺伝子導入ES細胞を用いた骨再生の新たな試み

研究課題名(英文)New try of bone revival using embryonic stem cell introduced bone specific promoter and reporter gene

研究代表者

大田 智美(Tomomi, Ota)

宮崎大学・医学部・医員

研究者番号：80644096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は骨組織に特異的に発現するプロモーターにレポーター遺伝子を接続したトランスジーンを作製し、そのトランスジーンをエレクトロポレーション法でマウスES細胞に導入して、骨専用培地で特異的かつ効率的にES細胞を骨組織へ分化誘導させることを目的としている。現時点で2種類のトランスジーンが完成した。完成したこれらのトランスジーン、ES細胞に導入し、それぞれのES細胞を培養しながら骨分化増殖能を評価した。本研究の最終的な目標は、テーラーメイド医療として、骨をin vitroで形成し骨再生医療に応用できる基盤を作製することである。

研究成果の概要(英文)：We manufacture TransGene who connected a reporter gene to the promoter who specifically emerges to osseous tissue, and this study is intended that I examine a culture condition for differentiation to multiply it to a bone using the mouse embryonic stem cell which I introduced it into specifically and effectively. And we examine the possibility of the application to the treatment such as bone graft or the bone fracture. It is a design to connect this study with development of the new bone regenerative medicine in the near future.

研究分野：整形外科

キーワード：ES細胞 骨特異的プロモーター トランスジーン 骨分化特異的培養 骨再生

1. 研究開始当初の背景

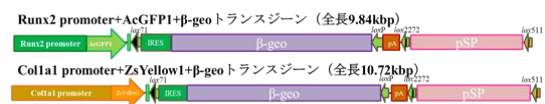
整形外科領域における骨折・関節リウマチ・人工関節再置換・骨腫瘍などの際に生じる高度骨欠損に対し大量の骨移植を必要とする場面を臨床現場では数多く経験するが、現在でも人工骨や同種骨移植に頼らざるを得ないのが現状で、十分な自家移植骨を得るのは困難である。これまでの骨再生研究において骨髄間葉系細胞を用いた多数の骨分化誘導の報告があるが (Yu-Shik H, Biotechnol Bioprocess Eng12, 2007, Mahmood A, Stem Cells Int 2011)、その量や分化効率、増殖能は限られており、未だ臨床治療に十分なレベルには達していない。一方で、ES細胞の持つ高い自己複製能と旺盛な増殖能は、組織再生の面で非常に大きな利点であると言える。これまで移植医療には、拒絶反応、感染、倫理的問題があったが、2006年のiPS細胞の登場でこれらの問題が一挙に解決できるようになり、今後骨再生においてもES細胞の効率的かつ安全な分化増殖制御法の確立は極めて重要である。これまでに骨組織特異的プロモーターにレポーター遺伝子を接続したトランスジーンを導入したマウスES細胞を用いて、特異的かつ効率的な骨の分化誘導を試みた研究は世界的に無いため本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、骨組織に特異的に発現するプロモーターにレポーター遺伝子を接続したトランスジーンを作製し、それを導入したマウスES細胞を用いて特異的かつ効率的に骨へ分化増殖させるための培養条件を検討することを目的とする。そして、骨移植や骨折などの治療への応用の可能性も検討する。近い将来には本研究を新規骨再生医療の開発につなげる構想である。

3. 研究の方法

まず、骨組織に特異的に発現するプロモーターにレポーター遺伝子を接続したトランスジーン(下図)を構築する。トランスジーンに用いる骨組織特異的プロモーターとして、*Runx2*(Xiao ZS, J Cell Biochem 82, 2001)、*Collagen I*(Rossert J, J Cell Biol 129, 1995)プロモーターを用いる計画である。レポーター遺伝子としては、 β -galactosidaseとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子である β -geoとAcGFP1など蛍光タンパク遺伝子の2種類をIRESで接続する(下図)。また、 β -geo遺伝子の5'側にlox71配列を、3'側にloxP配列を配置する。このようにすることにより、Creを作用させた時に β -geo遺伝子は切り出されることになるので、興味ある任意の遺伝子との組換えが可能となる。



続いて、これらのトランスジーンをエレクトロポレーション(EP)法に従ってマウスES細胞に導入し、ネオマイシン耐性コロニーを単離する。そして単離されたクローンを特異的かつ効率的に骨へ分化増殖させるための培養条件を検討する。

4. 研究成果

トランスジーン作製において制限酵素地図を完成させ、Runx2 promoter-AcGFP1-IRES- β -geo-polyAおよびCol1a1 promoter-ZsYellow1-IRES- β -geo-polyAトランスジーン(上図)を構築した。Competent cellはSTBL2を使用して効率が上がった。

完成したトランスジーン:Runx2 promoter-AcGFP1-IRES- β -geo-polyAをEPでES細胞に導入した。以下のEP条件が最適であることが判明した。

EP プロトコール: Mouse ES Cell Nucleofector® Kitを用いて施行。増殖初期にある状態の良いES細胞を使用するために、

EP 前に ES 細胞を 4 - 12 時間培養し、 10cm × 2 枚の細胞を通常通りはがして 15ml の tube に入れる。その際 10cm に 3.0 × 10⁶ 個を播種する。90 μl の細胞懸濁液に 10 μg の トランスジーンと 10 μl のマウス ES 細胞 nucleofection®ソリューションを混和しキュベットへ入れてプログラム : LONZA DPH-1001 の A-024 にて EP を施行する。EP 後 1-2 日目培地交換、3 日目 G418 135 μg/ml 濃度でネオマイシンセクションを開始する。5 日間のセクションを続行し、8 日目にトランスジーン挿入を蛍光顕微鏡で確認する。

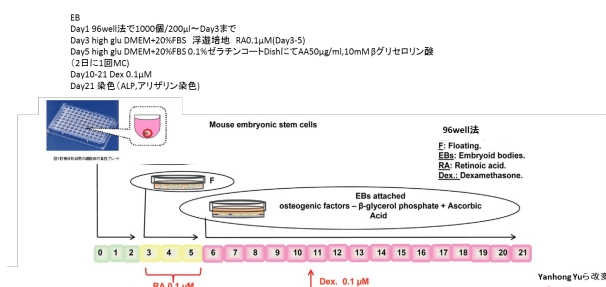
以上のプロトコールでトランスジーンが挿入されたネオマシ耐性コロニーを pick up し、増殖させ PCR にて確認した(下図)。



並行して、マウス ES 細胞 (KTPU8) を用いて、下図の骨分化特異的培養条件を確立した。

骨分化特異的培養プロトコール:

骨分化特異的培養計画プロトコール



マウス ES 細胞を 0.15%ゼラチンコートディッシュに播種する。培地組成 : GMEM400ml + FCS5ml + NEAA6.5ml + LIF1ml + KSR69ml。その後 Embryoid Body(EB)形成を行う。培地組成 : high glu DMEM+20%FBS, 96well 法 1000 個 /200 μl にて MPC ポリマーコートディッシュ (細胞接着を極力低下させる培養容器として、MPC ポリマー(2-Methacryloyloxyethyl

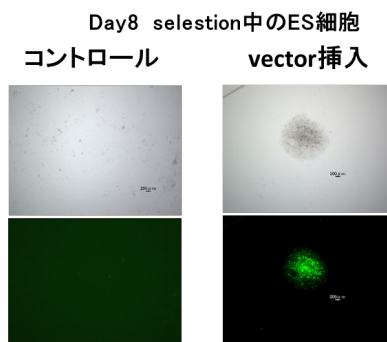
Phosphorylcholine) をコート剤として均一にコーティングした培養容器) を用いて均一な EB を作製する。EB 3 日目より 5 日目まで 3 日間 RA (レチノイン酸) 0.1 μM を付加。6 日目より 0.1%ゼラチンコート Dish にて AA (アスコルビン酸) 50 μg/ml, グリセロリン酸 10mM (2 日に 1 回培地交換)。11 日目から Dex (デキサメサゾン) 0.1 μM を付加。以上を骨分化誘導標準プロトコールとして確立した。

21 日目に骨芽細胞評価目的に ALP 染色 (TRAP/ALP キット和光純薬 29467001) を施行。3.7%ホルムアルデヒドで固定を行い PBS で洗浄。エタノール/アセトン 50/50 を加え透過処理を行う。その後 PBS で洗浄。アルカリフォスファターゼプレミックス基質液 15 μl/well, 96well にて染色を約 15 - 30 分行う。骨量は骨を作る骨芽細胞の活性と、骨を壊す破骨細胞の活性のバランスによってコントロールされており、骨芽細胞はアルカリホスファターゼが酵素マーカーとなる。骨芽細胞はその分化にともなって、I 型コラーゲンを生産し、アルカリホスファターゼ活性が上昇する。これは骨の分化マーカーとして知られている。

また、石灰化評価目的にてアリザリン染色 (Alizarin 和光純薬 4987481201101, 50 μl/well) を施行。PBS で洗浄後エタノールを加え 10 分静置した後除去。超純水で洗浄後 Alizarin 50 μl/well で約 10 - 30 分染色。アリザリン分子のヒドロキシ基に隣接した水素をスルホ基で置き換えたナトリウム塩がアリザリンレッド S (Alizarin Red S) である。この色素は、金属イオンと結合する性質により、細胞内のカルシウム塩沈着部を染色する。

その後 RT-PCR (*Col1a1*, *Runx2*, *OCN*, *ALP* 等) を施行する。

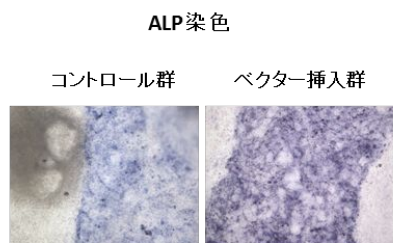
トランスジーンが導入された ES 細胞セレクションにおいては、下図のように GFP が緑色にきれいに発光したコロニーを選別した。



今回利用した AcGFP1 などの蛍光タンパク質の大きな特色のひとつは、組織内の発現を直視的そして時間的空間的に観察できることである。その特色を最大限に活かすために、プロモーターの細胞内局在を個別にライブイメージで観察することはもちろん、トランスジーンを導入した ES 細胞を凝集させ観察することで、プロモーターの発現パターンを色別に観察することができ、さらに骨形成における相互関係を 1 視野中において効率よくリアルタイムで解析できることが本研究の特色である。今後、この ES クローンから骨芽細胞に分化した細胞を骨折モデルなどのマウス生体に移植した場合も、治癒過程でのイメージングが可能となる。

上記の選別された ES 細胞を用いて骨分化特異的培養を実施した。

トランスジーン挿入を PCR にて確認後、で確立した骨分化特異的培養を行った。骨形成を確認する目的で行った ALP 染色の結果、トランスジーン挿入群では染色性の増加を認めた(下図)。



ベクター挿入群ではALP染色性の増加を認めた

石灰化評価目的に行ったアリザリンレッド染色においてもトランスジーン挿入群では染色性の増加を認めた(下図)。



アリザリンレッド染色においてベクター挿入群では染色性の増加を認めた

これらの結果よりトランスジーンを挿入した ES 細胞が、特異的に骨形成、石灰化を促していることが示唆された。

今後はこのトランスジーンを挿入した ES 細胞を用いた骨分化特異的培養において、G418 の作用時期、濃度など様々な培養条件を検討し、最も効率よく骨組織形成できる条件を確立していく予定である。

本研究の最終的な目標は、テーラーメイド医療として、個々の患者の必要とする骨を *in vitro* で形成し骨再生医療に応用することである。さらに今後の研究で、骨分化に重要な候補遺伝子が同定できれば、その遺伝子を iPS 細胞の樹立に必要な山中因子に追加して、線維芽細胞などから、直接、骨に分化誘導させることが可能になると考える。この技術は今後、整形外科領域における高度骨欠損に対する骨移植医療に応用可能と考える。また、このトランスジーンを導入したマウス ES 細胞を用いる方法を、様々な組織特異的なプロモーター（例えば、軟骨・末梢神経・筋・腱など）を用いて、目的とする組織を効率的に分化増殖させることにも応用できると考える。したがって本研究は、今後の再生医療全般にわたって大きな貢献をするものと期待され、移植を待つ患者本人のみならず、医療経済においても多大な貢献となりうると考える。

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)

1. Development of an efficient screening system to identify novel bone metabolism-related genes using the exchangeable gene trap mutagenesis mouse models. Syuji Kurogi, Tomohisa Sekimoto, Taro Funamoto, Tomomi Ohta, Shihoko Nakamura, Takuya Nagai, Mai Nakahara, Kumiko Yoshinobu, Kimi Araki, Masatake Araki, Etsuo Chosa. Scientific Reports 7: 40692, 2017, (Refereed Paper)

〔学会発表〕(計 14 件)

平成 28 年度

1: 第 89 回日本整形外科学会学術総会: パシフィコ横浜, 横浜: 2016 年 5 月 12-15 日: 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨疾患に關与する新規遺伝子群のライブラリー構築: 関本朝久, 船元太郎, 黒木修司, 大田智美, 中村志保子, 永井琢哉, 中原舞, 吉信公美子, 荒木喜美, 荒木正健, 帖佐悦男: **平成 28 年 第 89 回日本整形外科学会学術総会 優秀ポスター賞**

2: 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会: 福岡国際センター, 福岡: 2016 年 10 月 13・14 日: 可変型遺伝子トラップ法で作製した *Tmem161a* 欠損マウスは明らかな骨量増加を呈する: 永井琢哉, 関本朝久, 船元太郎, 黒木修司, 大田智美, 中村志保子, 中原舞, 吉信公美子, 荒木喜美, 荒木正健, 帖佐悦男: **平成 28 年 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 優秀ポスター賞ノミネート**

3: 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会: 福岡国際センター, 福岡: 2016 年 10 月 13・14 日: 可変型遺伝子トラップ法で作製した *Lima1/EPLIN* 欠損マウスは骨芽細胞間接着異常を認め骨量減少を呈する: 中村志保子, 関本朝久, 黒木修司, 船元太郎, 大田智美, 永

井琢哉, 中原舞, 吉信公美子, 荒木喜美, 荒木正健, 帖佐悦男: **平成 28 年 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 優秀ポスター賞ノミネート**

4: 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会: 福岡国際センター, 福岡: 2016 年 10 月 13・14 日: 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨異常を来す新規遺伝子改変マウスライブラリー構築: 黒木修司, 関本朝久, 船元太郎, 大田智美, 中村志保子, 永井琢哉, 中原舞, 吉信公美子, 荒木喜美, 荒木正健, 帖佐悦男

平成 27 年度

5: 第 33 回日本骨代謝学会学術集会: 京王プラザホテル(新宿), 東京: 2015 年 7 月 23-25 日: 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨代謝異常をきたす新規遺伝子群のライブラリー構築: 中村志保子, 関本朝久, 船元太郎, 黒木修司, 大田智美, 永井琢哉, 帖佐悦男

6: 産学・地域連携センター 第 22 回技術・研究発表交流会: 宮崎市民プラザ, 宮崎: H27 年 9 月 30 日: 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨に異常をきたす新規遺伝子群の探索および機能解析: 船元太郎, 関本朝久, 黒木修司, 大田智美, 中村志保子, 永井琢哉, 中原舞, 吉信公美子, 荒木喜美, 荒木正健, 帖佐悦男

7: 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会: 富山国際会議場, 富山: 2015 年 10 月 22・23 日: 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨異常を来す新規遺伝子群のライブラリー構築: 永井琢哉, 関本朝久, 船元太郎, 黒木修司, 大田智美, 中村志保子, 中原舞, 吉信公美子, 荒木喜美, 荒木正健, 帖佐悦男

8: Australian New Zealand Bone & Mineral Society Annual Scientific Meeting 2015: Tasmania, Australia 1-4 November 2015: Construction of a novel gene library

related to osteogenic disorder using exchangeable gene trap mutagenesis : Shihoko Nakamura, Tomohisa Sekimoto, Syuji Kurogi, Taro Funamoto, Tomomi Ota, Mai Nakahara, Kumiko Yoshinobu, Kimi Araki, Masatake Araki, Etsuo Chosa. : **平成 27 年第 33 回日本骨代謝学会 ANZBMS 2015 Travel Award 受賞**

9 : **都城地区整形外科医会学術講演会** : 都城市ロイヤルホテル, 都城 : 2015 年 11 月 25 日 : 「**ロコモティブシンドローム - 病態解明への挑戦 -**」 関本朝久

平成 26 年度

10 : 第 87 回日本整形外科学会学術総会 : 神戸国際会議場, 神戸 : 2014 年 5 月 22-25 日 : 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨疾患に関する新規遺伝子群のスクリーニング : 関本朝久、黒木修司、船元太郎、大田智美、中村志保子、濱田浩朗、山村研一、中原舞、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

11 : 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 : 大阪国際会議場, 大阪 : 2014 年 7 月 24-26 日 : 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨代謝に関する新規遺伝子群の効率的スクリーニング : 黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、中村志保子、帖佐悦男 : **平成 26 年日本骨代謝学会学術集会 優秀ポスター賞**

12 : 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 : 大阪国際会議場, 大阪 : 2014 年 7 月 24-26 日 : 可変型遺伝子トラップ法で作製した *Nedd4* 欠損マウスの骨表現型解析 : 船元太郎、関本朝久、黒木修司、大田智美、帖佐悦男

13 : 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 : 城山観光ホテル, 鹿児島 : 2014 年 10 月 9-10 日 : 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨に異常をきたす新規遺伝子群の効率的スクリーニング : 中村志保子、関本朝久、船元太郎、黒木修司、大田智美、中原舞、吉信公美子、荒木善美、荒木正健、帖佐悦男 : **平成 26**

年日本整形外科学会基礎学術集会 優秀演題賞ノミネート

14 : 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 : 城山観光ホテル, 鹿児島 : 2014 年 10 月 9-10 日 : *Nedd4* 欠損骨芽細胞の機能解析 : 船元太郎、関本朝久、黒木修司、大田智美、中村志保子、中原舞、荒木喜美、吉信公美子、荒木正健、帖佐悦男

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大田 智美 (Tomomi Ota)

宮崎大学 医学部 医員

研究者番号 : 80644096

(2) 研究分担者

関本 朝久 (Tomohisa Sekimoto)

宮崎大学 医学部 講師

研究者番号 : 60305000

帖佐 悦男 (Etsuo Chosa)

宮崎大学 医学部 教授

研究者番号 : 00236837

荒木 正健 (Masatake Araki)

熊本大学 生命資源研究・支援センター
准教授

研究者番号 : 80271609

荒木 喜美 (Kimi Araki)

熊本大学 生命資源研究・支援センター
教授

研究者番号 : 90211705