

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04399

研究課題名（和文）光操作技術による生体内間葉系幹細胞の集積に関する分子理解と歯槽骨関連疾患への応用

研究課題名（英文）Molecular understanding of the accumulation of mesenchymal stem cells in vivo by photo-manipulation techniques and its application to bone-related diseases

研究代表者

宝田 剛志（Takarada, Takeshi）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30377428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、抜歯窩での創傷治癒過程での「内在性」の生体内MSCの動態を可視化するために、テトラサイクリン誘導発現系システムとPA-Creシステムを合わせることで、in vivoでの青色光/細胞種特異的なDNA組み換え反応を可能とするTRE-PA-Creマウスノックインマウスを作製した。従来不可能であった「時間・空間（照射時/部位）特異的」な精度を持つ生体内遺伝子操作が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来不可能であった「時間・空間（照射時/部位）特異的」な精度を持つ生体内遺伝子操作が可能となり、今後、様々な組織・細胞で生物医学研究の新規戦略手法として幅広く使用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated a tTA-dependent photoactivatable Cre-loxP recombinase knock-in mouse model (TRE-PA-Cre mice) using a CRISPR/Cas9 system. These mice were crossed with ROSA26-tdTomato mice (Cre reporter mouse) to visualize DNA recombination as marked by tdTomato expression. We demonstrated that external noninvasive LED blue light illumination allows efficient DNA recombination in the liver of TRE-PA-Cre:ROSA26-tdTomato mice transfected with tTA expression vectors using hydrodynamic tail vein injection. The TRE-PA-Cre mouse established here promises to be useful for optogenetic genome engineering in a noninvasive, spatiotemporal, and cell-type specific manner in vivo.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：光操作 遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ビスフォスフォネート (BP) 製剤・デノスマブ等の骨吸収抑制薬の投与中の患者が、抜歯などの侵襲的歯科治療の後に顎骨壊死を発生する「薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ)」が大きな社会問題となっている。しかし、病態理解や治療法が確立されておらず、BP 製剤等の投与中は感染源除去等の最低限の抜歯処置ですら、その誘因となる可能性から実施できず、休薬プロトコルに従っているのが現状である。

抜歯後の創傷治癒や、歯槽骨の恒常性維持のためには、組織幹細胞である間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell, MSC) の供給が不可欠である。MSC は、様々な組織や骨髄にプールされており、組織が損傷を受けると、この幹細胞ニッチから組織修復部位へリリースされ、再生の場で増殖、分化することが報告されている。申請者らは、抜歯窩創傷治癒部位に、組織再生に最適化された MSC が多量に存在することを明らかにしてきた。当初、MRONJ 患者では、抜歯後の骨吸収が抑制されることによる、カップリング破綻としての骨形成不全 (=骨再生不全) がその骨壊死の原因と捉えられてきたが、近年、治癒過程における血管内皮細胞や MSC の供給不全、機能不全が原因であるとする報告がなされた (*Clin. Cancer Res.*, 2011, 15, 1405-1414)。また、MSC の全身投与により症状が改善する (黒嶋ら、日本補綴学会誌抄録集、2016) という報告も、MRONJ が、MSC の機能不全もしくは動員不全を原因とする疾患であるという仮説を支持するものである。したがって、傷害の場に、動員されるべき MSC を集積させることが MRONJ の治療に重要であり、その動員・集積の分子レベルでの理解が、MRONJ の治療法の開発につながると考えられる。しかし、これまで以下の大きな 2 つの問題点があり、この生体内 MSC の動員メカニズムを明らかにすることができなかった。

問題 1: これまで生体内で機能する MSC の各分化細胞 (例えば、骨芽細胞) への階層性/系譜を区別できる分化マーカーが同定されていなかったため、抜歯部位のような損傷・再生部位において、どのような系譜のどのような分化レベルの細胞が時空間的に集積しているかを検討できなかった。

問題 2: MSC による組織修復は、時間・空間・数量的に緻密に制御され、傷害時に MSC が組織内・組織間を移動 (=傷害部位へ動員) することで成立する。しかし、(1) MSC の元々の動員元を特異的に標識可能な遠隔移動トラッキング技術がなく、幹細胞の動態をトレースできなかったこと、(2) 生体内での空間的制御下において「動態制御因子」の機能解析を実施できなかったことから、創傷治癒や免疫寛容性を発揮する際の間葉系幹細胞の挙動や役割、その分子メカニズムを十分に解明できなかった。

これに申請者らは、以下の策を準備した。

問題 1 に対し: MSC での骨芽細胞分化の必須因子である Runx2 を、特定の細胞・時期に欠損可能なマウスを開発し、同マウスでのフローサイトメトリー解析により、Prx1 と Sca1 共陽性な MSC (= Prx1<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>MSC) の系譜にて骨形成が行われることを発見した。すなわち、どのような目印を持つ MSC が、どのような細胞となり、骨形成に重要であるのかを生体内で明示することに成功した。

問題 2 に対し: Cre recombinase (Cre)-loxP 部位特異的 DNA 組換え酵素反応は、標的遺伝子の塩基配列をゲノム DNA 上から除去、または挿入するための非常に強力なツールとして世界中で幅広く利用されており、現在におけるマウス遺伝子操作技術研究においては欠くことのできない手法である。このシステムを時間的に制御するためには、タモキシフェンのような薬剤誘導法を用いて調節を行うことができるが、空間的制御できないことが問題点であった。研究分担者である佐藤らは、DNA 組み換え酵素 (Cre) に光スイッチタンパク質を連結することで、青光照射で DNA 組み換え反応をコントロールできる光活性化型 Cre (Photoactivatable (PA)-Cre) を開発した。これらの光操作システムは、従来のものに比べ、光応答性・効率の点において大幅な改善が見られ、生体への応用が可能となった。PA-Cre システムを使用することで、生体外からの光照射により、特定のマーカーを持つ細胞を時間・空間特異的に標識し、その挙動を生体内でトラッキングし、かつ同細胞で働く遺伝子機能をコントロールすることができる。

## 2. 研究の目的

上記事前研究成果を基盤とし、抜歯窩での創傷治癒過程での「内在性」の生体内 MSC の動態を可視化し、遺伝子レベルでのその挙動を理解することで、MSC の動員を伴う組織修復システム (どのような性格を有する MSC が、どこから、どのようにして動員され再生されるのか?) を理解することができる。動員必要分子の同定により、動員されるべき MSC を、傷害の場に集積させる方法を開発することが可能となり、それは MRONJ の新規治療法につながる。このような GOAL を目指すうえで本研究では、テトラサイクリン誘導発現システムと PA-Cre システムを合わせることで、*in vivo* での青色光/細胞種特異的な DNA 組み換え反応を可能とする PA-Cre ノックインマ

ウスの作製を目指した。

### 3. 研究の方法

PA-Cre システムとテトラサイクリン誘導発現系 (Tet-On/Off) システムを組み合わせたベクター (TRE-PA-Cre ベクター; 図 1) を作製し、アクチン遺伝子座への Cas9 ノックイン技術を用いて受精卵に注入した。生まれてきたマウスのゲノム DNA シークエンス解析により、TRE-PA-Cre ベクターがアクチン遺伝子座に導入されたことを確認した。また、マウスが実際に Tet-Off システムにおける tTA により断片化 Cre を作り、青色光に反応して活性化型 Cre として働くかを評価するために、TRE-PA-Cre マウスを、Cre により tdTomato を発現できる ROSA26-loxP-stop-loxP-tdTomato (Rosa26-tdTomato) マウスと交配することで検討した。

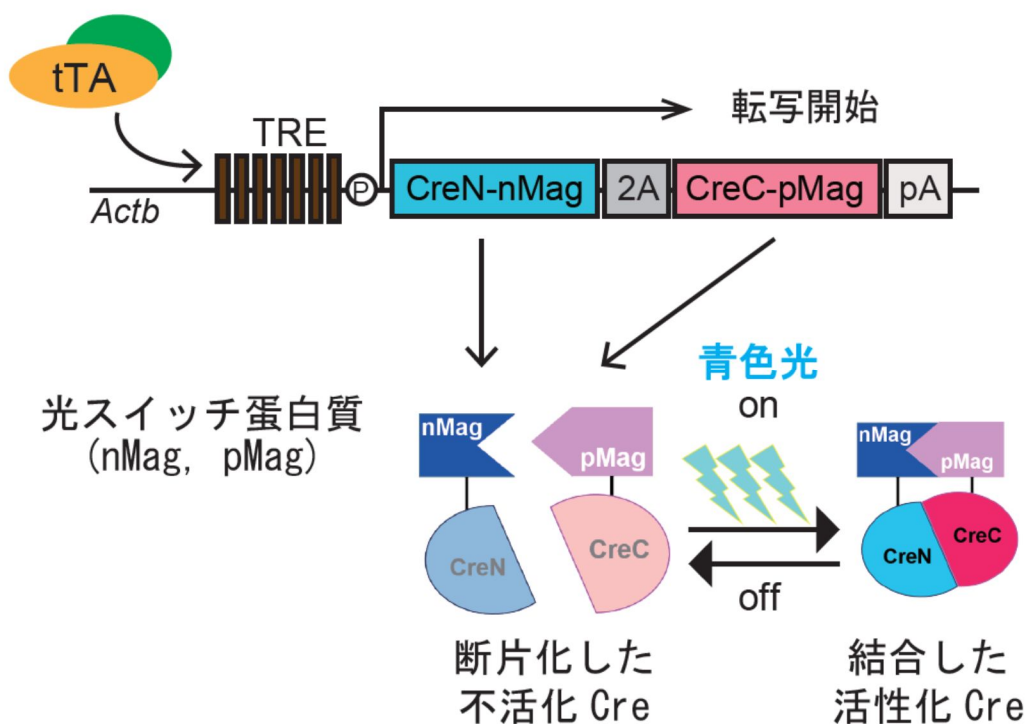


図 1 : 光スイッチタンパク質を利用した Cre 活性の ON/OFF

### 4. 研究成果

TRE-PA-Cre ベクターを作製し、アクチン遺伝子座への迅速な Cas9 ノックイン技術を用いて受精卵に注入したところ、TRE-PA-Cre ベクターがアクチン遺伝子座導入されたマウスを得ることに成功した (= TRE-PA-Cre マウス)。これらのマウスが実際に光応答的に DNA 遺伝子組み換えを起こすかを検討するために、TRE-PA-Cre マウスと Rosa26-tdTomato マウスとを交配し、交配して作出したマウス (TRE-PA-Cre:Rosa26-tdTomato マウス) に tTA 発現ベクターを迅速に肝臓へ導入する HTV 法により尾静脈注射を行った。その後蛍光灯または青色 LED 光下で照射を行い、注入から 24 時間後に肝臓を摘出し、顕微鏡下で tdTomato の発現観察を行った。その結果、蛍光灯下においたマウスの肝臓では tdTomato の発現を確認できなかったが、青色 LED 光下においたマウスの肝臓では tdTomato の強い発現が観察された。このことから我々が作製した TRE-PA-Cre マウスは tTA 存在下で外部光源による非侵襲的な照射で DNA 組換えを誘導可能であることが証明された (Takao et al, *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 526:213-217.)。現在、間葉系幹細胞で発現する tTA マウスを作製中であり、開発した TRE-PA-Cre マウスと交配することで、間葉系幹細胞の空間特異的ラベリングが可能となり、臓器間移動後の幹細胞の系譜追跡も可能であり、幹細胞生物学分野に新しい概念を提唱することが可能となる。

光遺伝学を用いたゲノム編集技術は細胞やマウスへ導入することで報告されてきたが、光応答性遺伝子改変マウスの報告はこれまでなかった。今回の成果は光応答性 Cre システムに加え、細胞特異性をもつテトラサイクリン誘導発現システムを導入した TRE-PA-Cre マウスであることから、このマウスを使用することで「生体組織」で、「細胞種 (特定プロモーターで ON) 特異的」かつ、従来不可能であった「時間・空間 (光照射時/部位) 特異的」な精度を持つ生体内遺伝子操作が可能となり、今後、様々な組織・細胞で生物医学研究の新規戦略手法として幅広く使用されることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 5件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Takao Tomoka, Hiraoka Yuichi, Kawabe Kenji, Yamada Daisuke, Ming Lu, Tanaka Kohichi, Sato Moritoshi, Takarada Takeshi  | 4. 巻<br>526               |
| 2. 論文標題<br>Establishment of a tTA-dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering   | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>213 ~ 217   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2020.03.015   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Yamada Daisuke, Kawabe Kenji, Tosa Ikue, Tsukamoto Shunpei, Nakazato Ryota, Kou Miki, Fujikawa Koichi, Nakamura Saki, Ono Mitsuaki, Oohashi Toshitaka, Kaneko Mari, Go Shioi, Hinoi Eiichi, Yoneda Yukio, Takarada Takeshi | 4. 巻<br>2                 |
| 2. 論文標題<br>Inhibition of the glutamine transporter SNAT1 confers neuroprotection in mice by modulating the mTOR-autophagy system   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology   | 6. 最初と最後の頁<br>-           |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s42003-019-0582-4  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Tosa Ikue, Yamada Daisuke, Yasumatsu Misa, Hinoi Eiichi, Ono Mitsuaki, Oohashi Toshitaka, Kuboki Takuo, Takarada Takeshi   | 4. 巻<br>516               |
| 2. 論文標題<br>Postnatal Runx2 deletion leads to low bone mass and adipocyte accumulation in mice bone tissues   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>1229 ~ 1233 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2019.07.014   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Ishikawa T, Nishida T, Ono M, Takarada T, Nguyen HT, Kurihara S, Furumatsu T, Murase Y, Takigawa M, Oohashi T, Kamioka H, Kubota S.  | 4. 巻<br>233               |
| 2. 論文標題<br>Physiological role of urothelial cancer-associated one long noncoding RNA in human skeletogenic cell differentiation.   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>J Cell Physiol.  | 6. 最初と最後の頁<br>4825-4840   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/jcp.26285.   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-                 |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Komori T, Ono M, Hara ES, Ueda J, Nguyen HTT, Nguyen HT, Yonezawa T, Maeba T, Kimura-Ono A, Takarada T, Momota R, Maekawa K, Kuboki T, Oohashi T. | 4. 巻<br>8          |
| 2. 論文標題<br>Type IV collagen 6 chain is a regulator of keratin 10 in keratinization of oral mucosal epithelium.  | 5. 発行年<br>2018年    |
| 3. 雑誌名<br>Sci Rep.  | 6. 最初と最後の頁<br>2612 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-018-21000-0.   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-          |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Lee-Thacker S, Choi Y, Taniuchi I, Takarada T, Yoneda Y, Ko C, Jo M.                          | 4. 巻<br>159             |
| 2. 論文標題<br>Core Binding Factor Expression in Ovarian Granulosa Cells Is Essential for Female Fertility. | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Endocrinology.  | 6. 最初と最後の頁<br>2094-2109 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1210/en.2018-00011.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Effendi N, Mishiro K, Takarada T, Makino A, Yamada D, Kitamura Y, Shiba K, Kiyono Y, Odani A, Ogawa K.                        | 4. 巻<br>8           |
| 2. 論文標題<br>Radiobrominated benzimidazole-quinoline derivatives as Platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR ) imaging probes. | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>Sci Rep.  | 6. 最初と最後の頁<br>10369 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-018-28529-0.   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-           |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takarada Takeshi, Xu Cheng, Ochi Hiroki, Nakazato Ryota, Yamada Daisuke, Nakamura Saki, Kodama Ayumi, Shimba Shigeki, Mieda Michihiro, Fukasawa Kazuya, Ozaki Kakeru, Iezaki Takashi, Fujikawa Koichi, Yoneda Yukio, Numano Rika, Hida Akiko, Tei Hajime, Takeda Shu, Hinoi Eiichi | 4. 巻<br>32              |
| 2. 論文標題<br>Bone Resorption Is Regulated by Circadian Clock in Osteoblasts  | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Bone and Mineral Research   | 6. 最初と最後の頁<br>872 ~ 881 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/jbmr.3053  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Liao Lifan, Zhang Shanxing, Gu Jianhong, Takarada Takeshi, Yoneda Yukio, Huang Jian, Zhao Lan, Oh Chun-do, Li Jun, Wang Baoli, Wang Meiqing, Chen Di | 4. 巻<br>7          |
| 2. 論文標題<br>Deletion of Runx2 in Articular Chondrocytes Decelerates the Progression of DMM-Induced Osteoarthritis in Adult Mice                                 | 5. 発行年<br>2017年    |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports   | 6. 最初と最後の頁<br>2371 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-017-02490-w   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>宝田 剛志                                   |
| 2. 発表標題<br>組織機能修復・再生・創薬を指向した間葉系幹細胞の幹細胞の階層性/系譜の分子理解 |
| 3. 学会等名<br>第29回創薬・薬理フォーラム岡山 (招待講演)                 |
| 4. 発表年<br>2018年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takeshi Takarada  |
| 2. 発表標題<br>Dissecting the hierarchy and lineage of mesenchymal stem cells by mouse genetics.                           |
| 3. 学会等名<br>International Symposium on Immunology and Tissue Regeneration in Okayama / 12th URA International Symposium |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>宝田 剛志                 |
| 2. 発表標題<br>間葉系幹細胞の階層性・系譜の分子理解と応用 |
| 3. 学会等名<br>第26回硬組織再生生物学会 (招待講演)  |
| 4. 発表年<br>2017年                  |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>宝田 剛志                      |
| 2. 発表標題<br>間葉系幹細胞の階層性・系譜の分子理解と骨疾患への応用 |
| 3. 学会等名<br>第54回ネフロンフォーラム（招待講演）        |
| 4. 発表年<br>2017年                       |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>宝田 剛志                 |
| 2. 発表標題<br>骨格形成過程における細胞集団不均一性の理解 |
| 3. 学会等名<br>第5回細胞凝集研究会（招待講演）      |
| 4. 発表年<br>2017年                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>宝田 剛志                            |
| 2. 発表標題<br>骨組織再生材料開発を指向した骨格形成過程の階層性・系譜の分子理解 |
| 3. 学会等名<br>日本バイオマテリアル学会（招待講演）               |
| 4. 発表年<br>2017年                             |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>宝田 剛志                    |
| 2. 発表標題<br>生体内での間葉系幹細胞系譜の分子理解と、その応用 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第138年会（招待講演）        |
| 4. 発表年<br>2017年                     |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 窪木 拓男<br>(Kuboki Takuo)<br><br>(00225195)     | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授<br><br>(15301)     |    |
| 研究分担者 | 大野 充昭<br>(Ono Mitsuaki)<br><br>(60613156)     | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授<br><br>(15301)    |    |
| 研究分担者 | 佐藤 守俊<br>(Sato Moritoshi)<br><br>(00323501)   | 東京大学・大学院総合文化研究科・教授<br><br>(12601)    |    |
| 研究分担者 | 戸村 道夫<br>(Tomura Michio)<br><br>(30314321)    | 大阪大谷大学・薬学部・教授<br><br>(34414)         |    |
| 研究分担者 | 戸口田 淳也<br>(Toguchida Junya)<br><br>(40273502) | 京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授<br><br>(14301) |    |
| 研究分担者 | 渡辺 亮<br>(Watanabe Akira)<br><br>(60506765)    | 京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教<br><br>(14301)  |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|