

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H04409

研究課題名(和文) 運動器疾患治療のための中枢・末梢機能の活性化を担う分子基盤の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic approach and exploration of molecules activating the central and peripheral organ for the treatment of musculoskeletal disorders

研究代表者

佐藤 毅 (Sato, Tsuyoshi)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60406494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経組織に発現するAuts2遺伝子が骨芽細胞の分化に伴い発現が上昇した。Auts2遺伝子をノックアウトした骨芽細胞株を作製しBMPによる分化誘導をかけたところ、Runx2発現は増強されずに石灰化も抑制されていた。骨芽細胞特異的Auts2コンディショナルノックアウトマウスを作出し大腿骨を調べたところ骨量の低下を認めた。骨細胞株とシュワン細胞株との非接触型共存培養にて、骨細胞の細胞突起伸長ならびにシュワン細胞の分化マーカー発現上昇を見出した。さらに、甘味とうま味の受容体であるTas1r3をノックアウトした間葉系幹細胞では石灰化が抑制されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経系と骨代謝は密接に関係していると考えられている。本研究では、Auts2という神経系で豊富に発現している遺伝子が、骨組織においても発現が高いことを見出しており、骨分化に伴い発現が上昇したことを、*in vitro*実験で見出した。また、*in vivo*においても、骨特異的にAuts2遺伝子を欠失させたノックアウトマウスの骨量が低下していた。これらのことから、Auts2は骨組織において重要な役割を果たしていると考えられる。神経系で重要な分子が骨代謝にも重要であることから、神経系疾患と骨代謝疾患の病態解明に寄与する研究であり、学術的意義は大きい結果をもたらすと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, Auts2 gene which is expressed by neurons was upregulated during osteoblast differentiation. In Auts2-knock out osteoblasts, Runx2 expression was downregulated by adding BMP and the calcification was inhibited. We generated osteoblasts-specific Auts2-deficient mice and found that bone volume was decreased in these mice. Under the non-contact co-culture, Schwann cells and osteocytes differentiate each other via humoral factors. Moreover, we showed that the calcification was inhibited in mesenchymal stem cells derived from Tas1r3 knock out mice.

研究分野：口腔外科学

キーワード：Auts2 骨芽細胞 コンディショナルノックアウトマウス Tas1R3 神経細胞

### 1. 研究開始当初の背景

高齢社会において QOL を低下させる疾患を減少させることは重要な課題である。高齢者の QOL を低下させる代表的な疾患として、ロコモティブシンドロームやサルコペニアといった運動器疾患がある。これらの疾患は、脳機能の低下や認知症などの脳神経疾患を伴うことが多い [Loskutova N, J Alzheimers Dis 2009] [Tanisawa K, BMC Genomics 2013][Teixeira FB, Int J Med Sci 2014]。また、腫瘍で顎骨が失われた場合の顎運動機能障害も運動器疾患の 1 つと捉えることができるが、顎運動機能障害は脳からの神経支配が断絶した状態と考えられる。運動器の機能低下に対する治療法として、たとえば、骨欠損に対しては骨誘導能を有するサイトカインを併用した再生医療、サルコペニアに対しては筋に対する筋力トレーニング、といった個々の組織に対してアプローチを行う治療法が主流である [Reginster JY, Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2016]。しかしながら、運動器は神経と血管を介して中枢により支配されている。骨粗鬆症において、骨組織をターゲットに再生・修復するだけでなく中枢、すなわち脳組織の機能を回復させることも重要であると考えられる。このように運動器の機能は脳と切り離して考えることはできない。

申請者らは運動器と脳、それぞれの機能を活性化させることが重要と考えている。中枢神経系で発現の高い神経分化促進遺伝子のうち、運動器の細胞分化を促進する遺伝子を見出すことができれば、この遺伝子を活性化することで脳と運動器の活性化を行うことができる。そこで、中枢神経系疾患で変異が確認されている遺伝子の探索が有効と考えた。われわれは中枢神経疾患として自閉症に着目した。自閉症患者では骨折しやすきこと、ならびに骨の成長が遅いことが報告されている [Fusco C, Brain Dev 2006][Scheper FY, Clin Dys 2002]。自閉症において変異が見つかっている遺伝子で神経分化を促進する *Auts2* 遺伝子を調べたところ、BioGPS でのプロファイリングで発現が上昇しており、申請者も *Auts2* が骨芽細胞分化に伴い遺伝子発現が上昇することを確認している。また、*Auts2* ノックアウトマウスは体格が小さいことが報告されているが、いまだ骨の解析は行われていない[Gao Z, Nature 2014]。*Auts2* 遺伝子は骨分化に伴い発現が上昇するため、骨分化を促進する遺伝子と考えられる。この *Auts2* 遺伝子の骨組織での役割を解明する。

### 2. 研究の目的

脳と骨において共通の、それぞれ発現が高い遺伝子として *Auts2* を見出した。*Auts2* 遺伝子について *in vitro* での機能解析を行い、ノックアウトマウスにおいて骨の表現型を調べる。

### 3. 研究の方法

【細胞株・細胞培養】骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞および ST-2 細胞、骨細胞株である MLO-Y4 細胞を用いた。6 well plate に  $30 \times 10^4$  個/well を播種した。

【分化誘導】BMP-4 による分化誘導を行った。

【RNA 抽出】QIAzol による RNA 抽出を行った。

【タンパク質抽出】RIPA buffer を用いてタンパク質抽出を行った。

【リポフェクション】

- 1) 標的細胞を抗生物質抜きの培養培地で培養した。
- 2) リポフェクション当日、標的細胞を抗生物質抜きの培養培地で培地交換した。
- 3) FuGENE 6 を Opti-MEM I に加えて混合し、室温で 5 分間静置した。
- 4) ベクターを加えて混合し、室温で 15 分間静置した。
- 5) 標的細胞に加えた。
- 6) 5% CO<sub>2</sub> 存在下、37° C で培養した。

【編集用ベクター導入～FACS スクリーニング】

- 1) リポフェクションに従って標的細胞にゲノム編集用ベクターを導入した。
- 2) 2 日後、細胞を回収した。
- 3) 上清を除去し、FACS バッファに懸濁して氷上に置いた。
- 4) GFP および RFP の共陽性細胞をソーティングし、氷上に置いた。
- 5) FACS バッファを培養培地に置換し、培養容器に播種した。
- 6) 5% CO<sub>2</sub> 存在下、37° C で培養した。

【二次スクリーニング】

- 1) 編集用ベクター導入～FACS スクリーニングより 5 日以上培養した細胞を限界希釈法によりクローニングした。余剰細胞は 2-1-3 に従って凍結保存した。
- 2) 最大 40 クローンを選択して拡大培養し、凍結保存しつつ、一部を Lysis バッファにより溶解した。
- 3) 最大 40 クローンの Lysate を ELISA に供し、標的タンパク質が KO されたクロンのスクリーニングを行った。
- 4) 最大 10 クローンの Lysate をウェスタンブロットに供し、標的タンパク質のバンドが KO されたクロンのスクリーニングを行った。
- 5) 最大 10 クローンを PCR 法に供し、ゲノム編集用プラスミドがゲノム内に挿入されて

いないことを確認した。

6) 最大 10 クローンをダイレクトシーケンス法に供し、標的遺伝子の配列確認を行った。

【AUTS2 floxed マウス】

NCBI の AUTS2 遺伝子のゲノム情報 (NC\_000071, NM\_177047) における Exon8 を loxP と FRT-Neo-FRT-loxP で挟む設計とした。Cre-loxP システムにより loxP 配列で挟まれる Exon8 を含む領域が除かれると、フレームシフトによりノックアウトされる。ユニテック社に作製を依頼した。

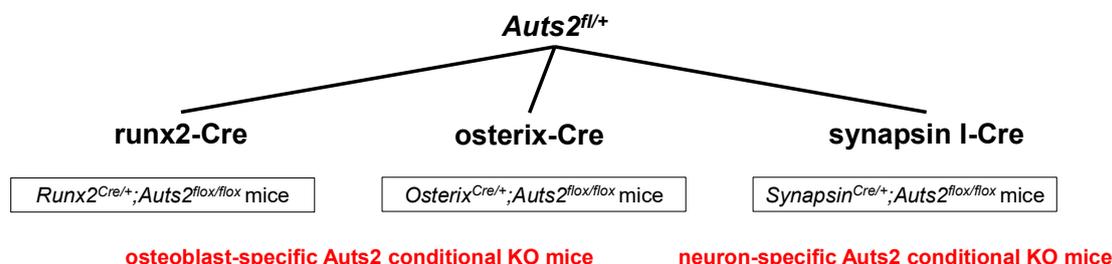
【Cre マウスの導入】

東京医科歯科大学 細胞生理学分野 佐藤信吾講師より骨芽細胞特異的 Cre 発現マウスである osterix 遺伝子 Cre マウス (Osx-Cre)、骨芽細胞特異的 Cre 発現マウスである runx2 遺伝子 Cre マウス (Runx2-Cre)、神経細胞特異的 Cre 発現マウスである synapsin 1 遺伝子 Cre マウス (Synapsin-Cre) を提供いただいた。

【Aut2 conditional knockout (cKO)マウスの作製】

Aut2 遺伝子 floxed マウスと Runx2-Cre マウスを掛け合わせて作出した骨芽細胞特異的 Aut2 cKO (Aut2<sup>runx2</sup><sup>-/-</sup>)、Aut2 遺伝子 floxed マウスと Synapsin-Cre マウスを掛け合わせて作出した神経細胞特異的 Aut2 cKO (Aut2<sup>synapsin</sup><sup>-/-</sup>)、Aut2 遺伝子 floxed マウスと Osx-Cre マウスを掛け合わせて作出した骨芽細胞特異的 Aut2 cKO (Aut2<sup>osx</sup><sup>-/-</sup>) を作出した。

### Generation of AUTS2 CKO mice (3 lines)



【μCT 解析】

それぞれの cKO マウスより大腿骨を採取して、長さを測定し、骨量および骨梁幅の解析を行った。

4. 研究成果

【AUTS2 ノックアウト細胞株：MC3T3-E1<sup>AUTS2</sup><sup>-/-</sup>細胞株の樹立】

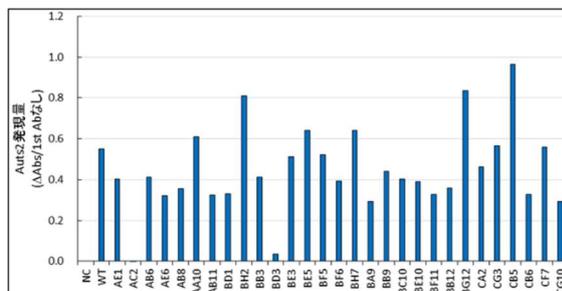
- 1) 編集用ベクター導入～FACS スクリーニング  
編集用ベクター導入～FACS スクリーニングに従って標的細胞にゲノム編集用ベクターを導入し、2 日後に GFP/RFP 共陽性細胞のソーティングを行った。
- 2) クローニング  
編集用ベクター導入～FACS スクリーニングで得られた共陽性細胞をソート 7 日後に限界希釈した。播種条件および確認されたシングルコロニーウェル数は下表の通りである。

96 穴枚数	播種密度	シングルコロニーウェル数	一時ストック済クローン数
3 枚	0.5 cells/ウェル	42	41

3) ELISA による発現確認

クローニングで得られたクローンを 12 穴プレートで 9-10 割コンフルエントまで培養し、Lysis バッファにより溶解して ELISA 用サンプルとした。各クローンについて、rabbit anti-Auts2 を一次抗体、anti-rabbit IgG-AP を二次抗体、p-Nitrophenyl phosphate を基質として 405 nm および 650 nm の吸光度を測定した。405 nm - 650 nm の数値を以降の計算に用いた。

各クローンの吸光度について、一次抗体ありの数値から一次抗体なしの数値を差し引いた差分(以降ΔAbs)を Aut2 発現量とし、右グラフに示した。



各吸光度のΔAbs について、一次抗体なしの吸光度に対する割合を算出し、下グラフに示した。



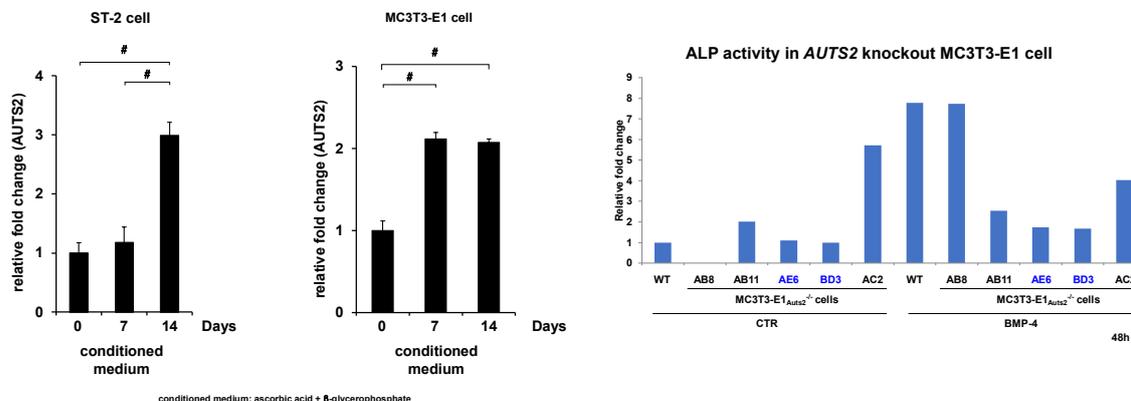
※1, ※2: 欠損塩基数は同じであるが、ゲノム配列の削れ方が異なっている。

### 【骨芽細胞分化における AUTS2 遺伝子の役割の解析】

骨芽細胞株 ST-2 細胞および MC3T3-E1 細胞を骨分化誘導培地で培養したところ、経時的に *Auts2* 遺伝子発現が上昇した (下図)。

MC3T3-E1 細胞に BMP-4 を添加したところ、野生型細胞では ALP 活性が上昇したが、ノックアウト細胞である AE6 および BD3 では上昇が著しく抑制されていた (下図)。

以上より *Auts2* 遺伝子は骨芽細胞分化に重要である可能性が示唆された。



### 【in vivo における AUTS2 遺伝子の役割の解析】

3週齢 (オス) の *Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup>* mice は体格が小さく、大腿骨の長さはコントロールと比較して有意に短くなっていた (下図)。また、骨量については8週齢 (オス) の *Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup>* mice がコントロールと比較して有意に低下していた (下図)。骨梁幅については、有意差はないが、*Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup>* mice が低い傾向にあった (下図)。

5週齢 (オス) の *Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup>* mice は体格が小さく、大腿骨の長さはコントロールと比較して有意に短くなっていた (下図)。また、骨量については8週齢 (オス) の *Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup>* mice がコントロールと比較して有意に低下していた (下図)。骨梁幅についても、*Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup>* mice がコントロールと比較して有意に低下していた (下図)。

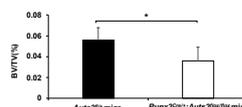
#### *Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup>* mice (3-week, ♂)



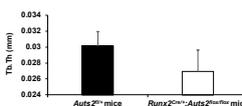
	length of femur (mm)
<i>Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	14.467
<i>Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	13.4*

\*p<0.05

#### *Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup>* mice (8-week, ♂)



	min	SD	t-test
<i>Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	0.02097449	0.01913205	0.008
<i>Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	0.04682	0.01286058	



	min	SD	t-test
<i>Runx2<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	0.02632071	0.00170794	0.04
<i>Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	0.0316	0.00286051	

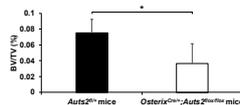
#### *Osterix<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup>* mice (5-week, ♂)



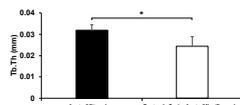
	length of femur (mm)
<i>Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	15.067
<i>Osterix<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	14.233*

\*p<0.05

#### *Osterix<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup>* mice (8-week, ♂)



	min	SD	t-test
<i>Osterix<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	0.027	0.011	0.002
<i>Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	0.071	0.028	



	min	SD	t-test
<i>Osterix<sup>Cre/+</sup>;Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	0.026	0.003	0.004
<i>Auts2<sup>flx/flx</sup></i> mice	0.027	0.004	

以上より、骨芽細胞特異的 *Auts2* ノックアウトマウスでは骨の異常が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eiji Ikami, Tsuyoshi Sato, Taketo Tomoda, Yosuke Fukushima, Shoichiro Kokabu, Tetsuya Yoda	4. 巻 32
2. 論文標題 Soluble factors mediate the interaction between Schwann cells and osteocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 394-399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2019.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Okubo M, Ito K, Yamazaki F, Mizuno Y, Isozaki Y, Asoda S, Usui M, Sato T	4. 巻 in press
2. 論文標題 Contact Co-culture of Osteoblasts and Sympathetic Neuronal Cells Promotes the Differentiation of Both Cell Types.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	臼井 通彦  (Usui Michihiko)  (10453630)	九州歯科大学・歯学部・准教授   (27102)	
研究分担者	古株 彰一郎  (Kokabu Shoichiro)  (30448899)	九州歯科大学・歯学部・教授   (27102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	有吉 渉  (Ariyoshi Wataru)  (40405551)	九州歯科大学・歯学部・教授     (27102)	

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