

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21791973

研究課題名（和文） G 蛋白を中心とした PTH の骨形成促進作用メカニズムの解明と骨再生への応用

研究課題名（英文） The elucidation of bone formation by PTH centering on G protein and its application to bone regeneration.

研究代表者 西條 英人 (SAIJYO HIDETO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80372390

研究成果の概要（和文）：本研究はPTHシグナルにおけるG $\alpha$ sとG $\alpha$ qの骨・軟骨代謝調節機構をそれぞれ骨・軟骨組織特異的に遺伝子を欠損させた遺伝子操作マウスを用いて独立に解析し、それぞれの関連シグナルを同定すると同時に、G $\alpha$ sとG $\alpha$ qシグナルのバランスによるPTHの骨形成促進作用と軟骨分化作用を解明した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify regulatory mechanism of bone and cartilage metabolism by G $\alpha$ s and G $\alpha$ q signaling via PTH using TypeI collagen Cre;G $\alpha$ s-or G $\alpha$ q-flox mice and TypeII collagen Cre;G $\alpha$ s-or G $\alpha$ q-flox mice. In vitro, using constitutively active G $\alpha$ s-or G $\alpha$ q adenoviruses, we tried to clarify osteogenic and chondrogenic function via G $\alpha$ s-or G $\alpha$ q signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：副甲状腺ホルモン、骨形成、G 蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域では顎顔面の先天性疾患や外傷などによって骨部分欠損が生じるが修復方法として自家骨移植が主に行われている。しかし、自家骨移植では健全な部位を犠牲にすることになることから、これらに取って代わる治療法として細胞を積極的に利用した組織修復を目指す再生医療的アプローチが必要であると考えられる。しかし、骨髄由来間葉系細胞の増殖能には限界があり、かつ増殖培養中に分化性能が低下することが挙げ

られる。このため、再生医療を応用した骨再生の成功のためには、この問題点を乗り越えることが不可欠である。そこで十分な骨芽分化を経て、実際に機能する再生骨を得るために骨形成促進剤を併用することを着想した。近年、副甲状腺ホルモン（PTH）に強力な骨形成促進作用があることが明らかとなり、米国ではヒト組み換え PTH(1-34)が初めての骨形成促進剤として既に FDA の承認を得て臨床の現場で用いられている。しかしながら、この PTH の薬理効果の分子メカニズムにつ

いては殆ど解明されていないのが現状であり、より効率的な骨形成促進作用薬の開発へつなげるためにもそのメカニズムの解明が切望されている。PTHの骨組織に対する多彩な作用は、G蛋白を介するこの2つの異なるシグナルの使い分けやバランスによって調節されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、この  $G\alpha s$  と  $G\alpha q$  による骨代謝調節機構を、それぞれ骨組織特異的に遺伝子を欠損させた遺伝子操作マウスを用いて独立に解析し、それぞれの関連シグナルを同定すると同時に、 $G\alpha s$  と  $G\alpha q$  シグナルのバランスによる PTH の骨形成促進作用の分子メカニズムの解明、更にはより効果が強く副作用の少ない骨再生のための骨形成促進剤の開発に結びつけることである。

## 3. 研究の方法

### ① Conditional Gas-KO および conditional Gaq-KO の作出

マウスの作成：今までの研究で、骨芽細胞において  $G\alpha q$  を介したシグナルに分化抑制作用があることが分かったが、 $G\alpha q$  の loss of function についての解析は行われていない。コンベンショナルな Gas-、Gaq-KO マウスは両者ともにすでに作成されており、Gas-KO マウスは胎生初期に死亡してしまい、また Gaq-KO マウスは胎生後期もしくは出生直後に血小板の異常により死亡してしまうため、骨量の変化が明らかとなる成人の骨の骨組織の解析が不可能である。そこで、両 G 蛋白の骨組織特異的な conditional KO マウスが必要となってくる。Cre/loxP システムを用いて作成するが、両蛋白を flox で挟み込んだ2つのターゲティングベクターの構築を行う。このベクターを用いて Conditional Gas- および conditional Gaq-flox マウスの作製を行う。作出されたそれぞれの flox マウスを、現在保有する骨芽細胞特異的に Cre を発現する I 型コラーゲン-Cre マウス、軟骨細胞特異的に Cre を発現する II 型コラーゲン-Cre マウスと交配させて、骨芽細胞および軟骨細胞特異的 conditional KO マウスを作出する。

### ② 恒常的に活性を持つ CA- $G\alpha s$ と CA- $G\alpha q$ のアデノウイルス作成

①のターゲティングベクターの作成に時間がかかり、マウスを使った骨解析が遅れることが予想されたため、急遽、 $G\alpha s$ 、 $G\alpha q$  のアデノウイルスを用いた in vitro の実験系を進めることにした。作成方法は invitrogen の gateway system を用いて、恒常的に活性を持つ CA-Gas と CA-Gaq のアデノウイルス

を作成する。

### ③ 効率的な骨形成のための Gas シグナルと Gaq シグナルのバランスの検討

今まで我々が確立した、PTHの骨形成促進作用が認められる骨芽細胞様細胞株

(MC3T3E1)、軟骨細胞様細胞株 (ATDC5) 培養系を用いて PTH シグナルの下流分子の解析を行う。

具体的には Gas および Gaq を含むアデノウイルスをこれらの骨芽細胞に同時に強制発現させその発現バランスにより、骨芽細胞分化、および破骨細胞形成支持能に差が現れるかを検討する。各々の G 蛋白の発現量の差で、分化へ影響、あるいは骨吸収の指標となる破骨細胞形成支持能すなわち RANKL の発現への影響があるかどうかを検討する。具体的には 1) 骨芽細胞の増殖能を細胞増殖曲線および [3H]-thymidine 取込能により評価し、また骨芽細胞分化能・基質合成能・石灰化能をそれぞれ ALP 活性、Alizarin red 染色、von Kossa 染色によって評価。2) 骨髄細胞培養系における骨芽細胞分化能を colony forming unit(CFU)-F/ALP+、CFU-OB で評価する。

## 4. 研究成果

骨量の変化が明らかとなる成体の骨組織解析のために、骨組織特異的な conditional Gas- と Gaq- KO マウスの作出を開始した。現在 Gas- と Gaq-flox マウスを作製するためにターゲティングベクター作成を行っている。作成途中の確認作業として、のタンパク発現などを行っていたが、確認作業とベクター組み換えに時間がかかり、現在も作成中である。しかし、この間、In vitro の解析を進めた。まず、恒常的に活性を持つ CA-Gas と CA-Gaq のアデノウイルスを invitrogen の gateway system を用いて作成した。最適なウイルス濃度を确认后、各培養細胞に感染させ、それぞれの G 蛋白の発現量の差で、骨・軟骨分化への影響、あるいは骨吸収の指標となる破骨細胞形成支持能すなわち RANKL の発現への影響があるかどうかを検討した。その結果、恒常的活性型 CA-Gas による Gs シグナルの増強により、骨芽細胞において分化促進作用があり、かつ、軟骨細胞では肥大分化を強力に抑制する作用がみられた。その一方、恒常的活性型 CA-Gaq によるシグナルの増強により、骨芽細胞において分化抑制作用があり、かつ、軟骨細胞では肥大分化を促進する作用がみられた。

さらに、現在、各 Ga 蛋白を介したシグナル下流に存在しうる分子を同定するため、CA-Gas、CA-Gaq 遺伝子導入細胞と非導入対

象細胞との間の mRNA の比較を gene chip microarray を用いて行う準備中である。15000 遺伝子を搭載した gene chip を用い、2.5 倍以上で発現増加、0.4 倍以下で発現減少という基準で解析を行う予定である。

引き続き、Conditional Gas-および conditional Gaq-flox マウスの作成は行っていく予定である。

#### 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 15 件)

- 1) Hideto Saijo, et al., : A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. Int J Oral Maxillofac Surg. 査読有, 2011 ; 40 955-960
- 2) Hideto Saijo, et al., : Evaluation and analysis of bone formation at palate of cleft lip and palate patients after palatoplasty based on computed tomographic scanning and three dimensional data. : Scand J Plast Reconstr Surg Hand SURG. 査読有, 2010 Feb;44(1):21-25.
- 3) Hideto Saijo, et al., : Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. J Artif Organs. 査読有, vol.12: 200-205, 2009
- 4) Hideto Saijo, et al., An alternative method for correction of nasal deformity using ear cartilage for bilateral cleft nasal correction in school-age children. Asian J Oral Maxillofac Surg. 査読有, 2009; 21 : 109-13.
- 5) 末永英之、西條英人、杉山円、森良之、飯野光喜、高戸毅 : 舌下腺に発生した濾胞性リンパ腫の 1 例. 日本口腔外科学会雑誌 査読有、55(7) : 373-377, 2009
- 6) 近津大地、森 良之、西條英人、藤原久子、飯野光喜、高戸毅 : 口外法により下顎枝舌側部に再発したエナメル上皮腫を切除した 1 例. 査読有、日本口腔外科学会雑誌 55: 241-245, 2009.

[学会発表] (計 6 件)

1. 西條英人、他 : 吸収性メッシュトレーと PCBM を用いた斜顔裂二次形成術の経験. 第 35 回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2011 年 5 月 25 - 26 日 朱鷺メッセ 新潟
2. 西條英人、他 : 粘膜下口蓋裂の診断基準に関する検討-第 1 報 : 骨欠損に関して -. 第 34 回日本口蓋裂学会総会 2010 年 5 月 28 日 東京
3. 西條英人、他 : シンポジウム 8 「歯科領

域の再生医療」 顎骨の再生医療. 第 9 回日本再生医療学会総会 2010 年 3 月 18 日 広島

4. 古賀陽子、阿部雅修、菅野勇樹、斎藤健太郎、西條英人、近津大地、飯野光喜、森良之、高戸毅 : 下顎枝後方切開を用いた下顎骨関節突起基部骨折の治療経験. 第 55 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2010 年 10 月 18 日 千葉
5. 須佐美隆史、森良之、大久保和美、長濱浩平、西條英人、高戸毅 : 口唇口蓋裂患者における二段階上顎骨延長・下顎後方移動術を用いた 外科的矯正治療の治療結果. 第 28 回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会. 2010 年 10 月 29 日 京都大学 吉田キャンパス 百周年時計台記念館 京都.
6. 近津大地、藤川由美子、末永英之、杉山円、古賀陽子、阿部雅修、西條英人、森良之、飯野光喜、高戸毅 : Cyclooxygenase-2 は膜性骨の骨折治療における key factor である. 第 54 回日本口腔外科学会総会, 2009 年 10 月 11 日, 札幌コンベンションセンター, 北海道.
7. 前田祐二郎、近津大地、末永英之、杉山円、斎藤健太郎、西條英人、森良之、飯野光喜、高戸毅 : 口蓋裂、分葉舌、下顎下口唇重複体を伴った上顎体の 1 例. 第 54 回日本口腔外科学会総会, 2009 年 10 月 9 日, 札幌コンベンションセンター, 北海道.
8. 阿部雅修、西條英人、飯野光喜、菅野勇樹、斎藤健太郎、近津大地、森良之、高戸毅 : 確定診断が困難な下顎悪性歯原性腫瘍の 1 例. 第 188 回日本口腔外科学会関東地方会, 2009 年 12 月 26 日, 東京慈恵会医科大学, 東京.
9. 斎藤健太郎、西條英人、菅野勇樹、杉山円、前田祐二郎、飯野光喜、高戸毅 : チタンメッシュトレーによる上顎骨再建後にインプラントを用いて咬合回復を行なった 1 例. 第 13 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会, 2009 年 12 月 12 日, アバンセ, 佐賀.

[図書] (計 4 件)

1. 飯野光喜、森 良之、近津大地、西條英人、大久保和美、高戸毅 : In vivo tissue engineering による顎骨再建の実際 「CLINICAL CALCIUM」 Vol.18 No.12 特集 ; 骨・軟骨の再生医療 UPDATE・Therapy : 1757-1766, 2008.
2. 飯野光喜、森良之、近津大地、西條英人、大久保和美、市川直子、前田祐二郎、高戸毅 : In vivo tissue engineering による下顎骨再建 Series 再生医学のいまー基礎

研究から臨床への展開に向けて— 治療  
91 (9) 2311-2315、2009

[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◇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

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/archive.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西條 英人 (SAIJYO HIDETO)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80372390