

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07216

研究課題名(和文) iPS細胞から骨細胞への分化過程を制御する遺伝子群の機能的解析

研究課題名(英文) The detection of a specific marker during osteogenic differentiation by using transgenic mice

研究代表者

鈴木 瑛一 (Suzuki, Eiichi)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50778503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、間葉系幹細胞から骨細胞への分化過程における遺伝子発現の変動を解析した。トランスジェニックマウス由来のBMSCsを骨分化誘導すると、EGFP発現細胞の経時的な増加を認めた。EGFP陰性細胞と比較して、陽性細胞ではOsteocalcin等の骨分化マーカーmRNA発現量の有意な亢進が認められた。DNAマイクロアレイならびにリアルタイムPCRより、EGFP陰性細胞と比較しEGFP陽性細胞において、ストレスタンパク質の一つであるCryab mRNA発現量の有意な亢進を認め、Cryabが骨細胞への分化ならびに硬組織形成に参与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to profile the gene expression during osteogenic differentiation in stem cells derived from transgenic mice with Cre/LoxP system. We could confirm the expression of EGFP in osteocyte-like cells, which exhibited dendrite-like structures in OBM for 2 weeks. Differentiated BMSCs were divided into EGFP positive and negative cells by Flow cytometry. DNA microarray analysis demonstrated differences in the expression levels of some genes and some relevance (including Wnt signaling) in upregulated genes in EGFP positive cells. Cryab (crystalline-B) and some osteogenic marker genes (osteocalcin, bone sialoprotein, Dmp1) were expressed at significantly higher levels in EGFP positive cells than EGFP negative cells. These results indicated that CRYAB express at around the same time as DMP1 expression during osteogenic differentiation and may contribute to the differentiation into osteocyte and the formation of mineralized tissues.

研究分野：歯周病学

キーワード：骨細胞分化 トランスジェニックマウス

### 1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞の分化・成熟には、様々なシグナル分子が関わっており、それらのシグナルのクロストークにより厳密に制御されている。この過程で、骨芽細胞は分化段階により種々の表現系を発現する。未分化な骨芽細胞である前駆骨芽細胞や前骨芽細胞は I 型コラーゲンやアルカリフォスファターゼなどを、成熟した骨芽細胞はオステオカルシンを発現し、それらの発現は BMP などによって制御されている (Yamaguchi A et al., *Endoc Rev*, 2000)。このような分化過程では、骨芽細胞に特異的な転写因子である Runx2 (Komori T et al., *CELL*, 1997) と Osterix (*Sp7*) (Nakashima K et al., *CELL*, 2002) が重要な役割を担っている。その後、成熟骨芽細胞が石灰化骨器質に埋め込まれ骨細胞となり、Dentin matrix protein 1 (DMP1), Sclerostin, FGF23 などを産生するようになるが、成熟骨芽細胞から骨細胞への分化を制御する転写因子は明らかにされていない。

近年、Cre/loxP 発現制御システムを用いて、間葉系幹細胞から骨芽細胞、骨細胞への各分化段階で特異的に発現する遺伝子のプロモーターを分化段階得的に発現する遺伝子改変マウスを作成することが可能となっている。骨細胞で特異的に発現する DMP1 のプロモーターを用いることにより骨細胞特異的に特定の遺伝子を発現させることができる。

### 2. 研究の目的

本研究では、*Dmp1-Cre:EGFP* マウスを利用して間葉系幹細胞から骨細胞への分化過程における遺伝子発現の変動を解析する。変動のあった遺伝子の機能を同マウスから樹立した iPS 細胞を用いて解析し、骨細胞への分化・維持機構および、機能の制御機構の一端を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、Cre/loxP 発現制御システムを利用した遺伝子改変マウスを利用して骨細胞特異的に EGFP を発現させたマウスから骨細胞を効率的に採取する手法を確率する。研究の流れとして、転写因子の検討までは、トランスジェニックマウスの作成→BMSCの採取並びに iPS 細胞の誘導→骨分化誘導→FACS による *Dmp1* 陽性細胞と陰性細胞のソーティング→DNA マイクロアレイによる発現遺伝子の確認にて行う。発現の変動した遺伝子群より、特定の転写因子を選定した後、Real-time PCR にて詳細な遺伝子発現パターンを解析する。その後、ピックアップした幾つかの標的遺伝子においてそれぞれ siRNA の合成を行い、siRNA 導入用試薬を用いて BMSC, iPS 細胞にトランスフェクションを行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子改変マウスの作成

骨細胞マーカーである *Dmp1* 遺伝子のプロモーター下流に、自己消化性ペプチド (T2A) で連結された Cre 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (*Dmp1-T2A-Cre*, 慶応義塾大学 (現・東京歯科大学) 中村貴博士より入手) と Cre リコンビナーゼ存在下で EGFP を発現するトランスジェニックマウス (CAG-CAT-EGFP) の Hetero type をそれぞれ交配させ、Homo type の Transgenic mice を作成。それぞれの Homo type 同士を交配させ、*Dmp1* 存在下で EGFP を発現するマウスを作成した。(図 1)

Agarose gel electrophoresis

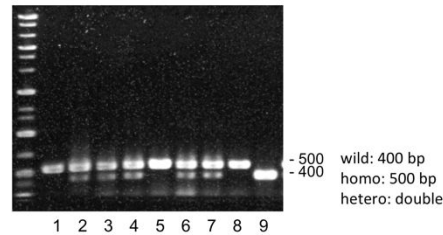


図 1 遺伝子型の確認 (ヘテロ接合型マウス交配後)

#### (2) 骨細胞様細胞の確認と単離

8 週齢のトランスジェニックマウスの大腿骨・腓骨より骨髓液を採取、2 週間培養を行い、接着し増殖する細胞集団 (BMSC) を得た。その後、分化誘導培地 (Birmingham E et al., *Eur Cell Mater*, 2012) により一定期間 (2-4 週) 培養を行った。分化誘導された細胞集団において 2 週間を超えると一部の細胞に EGFP の発現を認めた (図 2)。

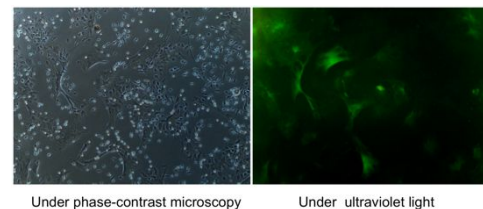


図 2 蛍光顕微鏡下における EGFP 発現の確認

#### (3) EGFP 陽性細胞の単離

trypsin-EDTA にて細胞集団を回収し、FACS を用いたフローサイトメトリーにて解析した。EGFP を標識とし、EGFP 陽性細胞、すなわち *Dmp1* 発現細胞の単離を行った (図 3)。

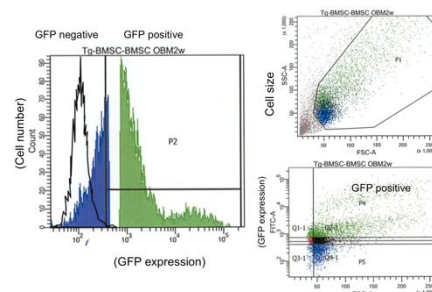


図 3 Flow Cytometer による EGFP 発現細胞の単離

#### (4) 遺伝子発現解析

EGFP 陰性細胞と比較して、EGFP 陽性細胞では Osteocalcin をはじめとする骨分化マーカー mRNA 発現量の有意な亢進が認められた ( $p < 0.05$ )。DNA マイクロアレイより *Bmp8b*, *Pdgfc*, *Cryab* 等の遺伝子群において、EGFP 陰性・陽性細胞間で有意な発現変動が認められた ( $p < 0.001$ , FDR  $< 0.05$ )。さらに発現変動遺伝子についてリアルタイム PCR 法による解析を行ったところ、EGFP 陰性細胞と比較し EGFP 陽性細胞において、ストレスタンパク質の一つである *Cryab* mRNA 発現量の有意な亢進を認めた ( $p < 0.001$ ) (図 4E)。BMSCs の骨分化誘導時における経時的な mRNA 発現量を解析すると、*Cryab* は *Dmp1* と同様の発現パターンを示し (図 4F, G)、*Cryab* が骨細胞への分化ならびに硬組織形成に関与していることが示唆された。

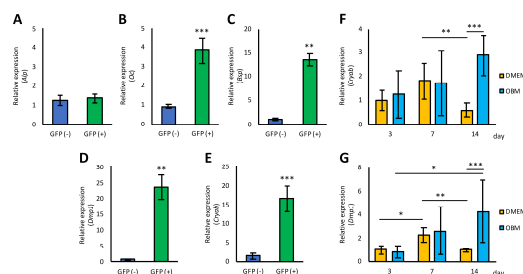


図 4 Real-time PCR 法による遺伝子発現解析

また、*Cryab* siRNA の導入後に、骨芽細胞分化誘導を行ったところ、*Alp*, *Oc* といった骨分化マーカーの有意な減少が認められた ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ )。

遺伝子改変マウスを使用により、未分化間葉系幹細胞から骨細胞への分化に関する主要遺伝子群の候補が示された。本研究の結果は、歯槽骨をはじめとする硬組織への分化制御機構の解明につながるものと考えられる。

#### 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)

1. Hisanaga Y, Suzuki E, Aoki H, Sato M, Saito A, Saito A, Azuma T.  
Effect of the combined use of enamel matrix derivative and atelocollagen sponge scaffold on osteoblastic differentiation of mouse induced pluripotent stem cells in vitro.  
J Periodontal Res 53:240-249, 2018

[学会発表] (計 11 件)

1. 青木栄人, 鈴木瑛一, 久永幸乃, 佐藤正敬, 小野寺晶子, 篠 宏美, 齋藤暁子, 齋藤 淳, 東 俊文  
Runx2 ホモ欠損マウス由来 iPS 細胞を用いた骨芽細胞分化機構における Runx2 非依

#### 存的経路の解析

第 301 回東京歯科大学学会例会, 平成 28 年 6 月 4 日, 東京都  
歯科学報, 116:232, 2016

2. Aoki H, Suzuki E, Hisanaga Y, Sato M, Onodera S, Ochiai-Shino H, Saito A, Azuma T. and Saito A.

Investigating the Runx2 Independent Pathway During Osteoblastic Differentiation Using iPS Cells Established

From Runx2 Homo-Deficient Mouse

American Academy of Periodontology, 102nd Annual Meeting, September 8th, 2016, San Diego, USA

Journal of Periodontology 88:e77, 2017

3. 青木栄人, 鈴木瑛一, 久永幸乃, 佐藤正敬, 小野寺晶子, 篠 宏美, 齋藤暁子, 東 俊文, 齋藤 淳

Runx2 null iPS 細胞を用いた骨芽細胞分化機構における Runx2 非依存的経路の解析

第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会, 平成 28 年 10 月 7 日, 新潟市

日本歯周病学会会誌 58 (秋季特別号):106, 2016

4. 久永幸乃, 鈴木瑛一, 青木栄人, 佐藤正敬, 東俊文, 齋藤 淳

エナメルマトリックスタンパク質とアテロコラーゲンスポンジの併用がマウス iPS 細胞の分化に及ぼす影響

第 60 回春季日本歯周病学会学術大会, 平成 29 年 5 月 12 日, 福岡市

日本歯周病学会会誌 59 (春季特別号):136, 2017

5. 鈴木瑛一, 篠 宏美, 青木栄人, 久永幸乃, 佐藤正敬, 東 俊文, 齋藤 淳

遺伝子改変マウスを使用した骨形成過程における新規転写因子の解明

第 60 回春季日本歯周病学会学術大会, 平成 29 年 5 月 12 日, 福岡市

日本歯周病学会会誌 59 (春季特別号):138, 2017

6. Aoki H, Suzuki E, Hisanaga Y, Sato M, Onodera S, Shino H, Saito A, Azuma T. and Saito A.

Investigation of the role of RUNX2 during osteoblastic differentiation using iPS cells generated from Runx2 homo-deficient mouse  
National Symposium Osteology Japan 2017, June 3rd, 2017, Tokyo, Japan

Osteology Japan 2017 On-Site Program, 2017

7. Suzuki E, Aoki H, Hisanaga Y, Sato M, Azuma T. and Saito A.

Identification of key factors in bone formation by using transgenic mice

National Symposium Osteology Japan 2017,  
June 3rd, 2017, Tokyo, Japan  
Osteology Japan 2017 On-Site Program, 2017

8. Suzuki E, Aoki H, Hisanaga Y, Sato A,  
Azuma T. and Saito A.  
Gene Expression Profiles in Bone Formation  
by Using Transgenic Mice  
American Academy of Periodontology 103rd  
Annual Meeting, September 10th, 2017,  
Boston, USA  
AAP 103rd Annual Meeting On-Site Program,  
p55, 2017

9. Hisanaga Y, Suzuki E, Aoki H, Sato M,  
Saito A, Azuma T. and Saito A.  
In vitro effect of the combined use of enamel  
matrix derivative and atelocollagen sponge  
scaffold on differentiation of mouse induced  
pluripotent stem cells  
American Academy of Periodontology 103rd  
Annual Meeting, September 10th, 2017,  
Boston, USA  
AAP 103rd Annual Meeting On-Site Program,  
p55, 2017

10. Aoki H, Suzuki E, Hisanaga Y, Sato M,  
Azuma T. and Saito A.  
Investigating the role of RUNX2 during  
osteoblastic differentiation using iPSCs  
The 65th Annual Meeting of Japanese  
Association for Dental Research, November  
18th, 2017, Tokyo, Japan  
Program & Abstracts, p.91, 2017

11. Suzuki E, Aoki H, Hisanaga Y, Sato M,  
Nakamura A, Azuma T. and Saito A.  
Gene expression profiling during osteogenic  
differentiation by using transgenic mice  
The 65th Annual Meeting of Japanese  
Association for Dental Research, November  
18th, 2017, Tokyo, Japan  
Program & Abstracts, p.90, 2017

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 瑛一 (SUZUKI EIICHI)  
東京歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号 : 50778503