

令和元年6月19日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11761

研究課題名(和文) ジンクフィンガータンパクによる骨代謝制御機構の解明と骨再生医療への応用

研究課題名(英文) Possible involvement of zinc finger protein family in bone metabolism and bone regenerative medicine

研究代表者

森 良之 (MORI, Yoshiyuki)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70251296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ジンクフィンガープロテインファミリーに属する転写因子の骨軟骨代謝における機能を解析し、併せてその再生医療への応用可能性を探ることを目的に計画された。マイクロアレイ解析や細胞内機能解析等によって、Zfp423、Zfp191、Zfp467、Zfp235、Zfp800、Zfp820が骨吸収・骨形成ならびに間葉系細胞の分化能維持に関与していることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が実施した網羅的な遺伝子発現検索の結果を利用して、様々な遺伝子の発現調節機能を持つ転写因子の中でも、特にジンクフィンガープロテインファミリーに着目して、骨軟骨分化を制御すると想定される分子の発現パターンと機能解析を行った。本研究の成果は、これまでは治療が難しかった大きな骨・軟骨組織欠損を回復可能とする新たな治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the role of zinc finger protein family in bone metabolism, especially focusing on Zfp423, Zfp191, Zfp467, Zfp235, Zfp800 and Zfp820.

In conclusion, the results of this study suggested that these zinc finger proteins regulate genes involving in bone formation and bone resorption, as well as in the maintenance of multipotency of mesenchymal cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：再生医学 骨再生 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔外科臨床においては骨再生・骨造成を必要とする疾患治療を行うことが多い。そのため、整形外科等の医科領域と同様に口腔外科学分野でも、患者の負担軽減ならびに移植成績向上を目指して、骨に関する再生医学研究が盛んに行われてきていた。しかしながら、骨再建のゴールドスタンダードは依然として自家骨移植であった(現在でもそれは変わらない)。自家骨移植は多くの治療実績を有する優れた治療法であるが、治療目的部位だけでなく、採骨部にも外科的侵襲を伴うという大きな欠点があり、患者の負担は決して軽くはない。つまり、これらの状況を変える画期的な再生医療製品は登場しておらず、さらなる骨再生医療技術の進歩が期待されていた。また、骨再生医療を実現するに当たっては、使用する細胞源、担体、増殖因子やサイトカインなど、検討すべき項目は多いが、個々の項目に限っても決定的なものは同定されておらず、様々な観点からのアプローチによる研究を必要としていた。そうしたことを背景に、われわれは近未来の臨床応用可能性を重視するという観点から、再生医療における最も有力な細胞源である間葉系細胞に着目し、独自のアプローチで間葉系細胞分化多能性維持に重要であると同時に臨床応用にあたって安全な因子を同定する目的で研究を推進していた(Mori et al. Mater Sci Appl. 2013、J Cell Physiol 2013 など)。そして、その成果のひとつとして、zinc finger protein family (ジンクフィンガープロテインファミリー) に属する転写因子の中に、骨軟骨代謝学・骨再生医学発展の鍵となる分子が存在することを強く示唆する結果を得ていた。

2. 研究の目的

再生医学研究の進歩によって、間葉系幹細胞から構築した骨組織の口腔外科領域における臨床応用に関する論文も散見されるようになったが、それらの成績は必ずしも良好ではない。その主な原因のひとつとして、培養に伴う間葉系細胞の増殖・分化性能の低下が挙げられる。この問題を解消する目的で、われわれは独自のアプローチで間葉系細胞分化多能性維持に重要かつ臨床応用にあたって安全な因子を同定するための研究を推進してきた。本研究は、こうした独自の研究成果の発展形として、ジンクフィンガープロテインファミリーに属する転写因子の骨軟骨代謝における機能を解析し、併せてその再生医学への応用可能性を探ることを目的に計画された。

3. 研究の方法

【検討項目1】

間葉系細胞に特定の遺伝子を導入することで、骨軟骨分化能を向上させた複数の細胞株(われわれが、これまでの研究において独自に樹立してきた細胞株である)とそれらの対照細胞を用いて、遺伝子操作によってもたらされた骨軟骨分化能促進に伴って細胞株内の発現が変動する分子をマイクロアレイ解析で網羅的に探索したところ、変動遺伝子の中にジンクフィンガープロテインファミリーに属する転写因子が数多く含まれていた。

最初に1次スクリーニングとして、それらのマイクロアレイ解析の結果をバイオインフォマティクス解析に供し、主に骨軟骨代謝における既知のシグナルネットワークとの関連が推測されるもので、かつ遺伝子導入細胞と対照細胞との間での発現変動が2倍以上(骨軟骨分化能向上細胞における発現が対照細胞における発現と比較して2倍以上または0.5倍以下)であったものを約40分子選択した。次いで、2次スクリーニングでは詳細な文献検索を行うとともにわれわれの未発表の研究データとの比較を実施して、詳細な解析対象とする分子として、6分子(Zfp423、Zfp191、Zfp467、Zfp235、Zfp800、Zfp820)を選択した。

【検討項目2】

Zfp423、Zfp191、Zfp467、Zfp235、Zfp800、Zfp820、それぞれの細胞内発現変動がマイクロアレイ解析の結果と一致するかを確認するとともに、各分子が骨系統細胞でどのような発現変動を示すかを検討する目的で、以下の条件でサンプル回収を行った。

(1) 骨芽細胞分化系(マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 を BMP 刺激後に経時的に RNA ならびにタンパクを回収: コントロールは BMP 未処理細胞とし、同様の条件で RNA とタンパクを回収)

(2) 破骨細胞分化系(マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を RANKL 刺激後に経時的に RNA ならびにタンパクを回収: コントロールは RANKL 未処理細胞とし、同様の条件で RNA とタンパクを回収)

(3) 軟骨細胞分化系(マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 をインスリン刺激後に経時的に RNA ならびにタンパクを回収: コントロールはインスリン未処理細胞とし、同様の条件で RNA とタンパクを回収)

(4) 間葉系細胞骨軟骨分化系(マウス間葉系細胞株 C3H10T1/2 を BMP 刺激後に経時的に RNA ならびにタンパクを回収: コントロールは BMP 未処理細胞とし、同様の条件で RNA とタンパクを回収)

(5) 間葉系細胞分化能維持向上系(われわれが独自に樹立した細胞株(上述)を BMP 刺激後に経時的に RNA ならびにタンパクを回収: コントロールは BMP 未処理細胞とし、同様の条件で RNA とタンパクを回収)

まず、上記(1)~(5)で得られた RNA サンプルを用いて定量的リアルタイム PCR を行い、骨芽細胞・破骨細胞・軟骨細胞分化系と間葉系細胞分化能維持向上系における Zfp423、Zfp191、

Zfp467、Zfp235、Zfp800、Zfp820 の発現変動パターンを解析した（なお、上記（1）～（5）の RNA サンプルに関しては、定量的リアルタイム PCR で各細胞の代表的分化マーカーが十分に上昇していることは確認済みであり、タンパクも同時に培養した細胞から回収しているため、各分化系が機能していることが検証された条件で得られたサンプルを用いている）。細胞内発現変動パターンの検討と並行して、各条件で回収したタンパクを用いたウエスタンブロットもを行い、6 分子を選択する絞り込み過程で重要な根拠となったシグナルネットワークにおいて中心的役割を果たしている分子の発現変動パターンの確認、あるいは、それらの分子のリン酸化を検討した。

【検討項目 3】

非ウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いて、Zfp423、Zfp191、Zfp467、Zfp235、Zfp800、Zfp820 の過剰発現系と発現抑制系を確立、RNA サンプルを回収して定量的リアルタイム PCR 解析に供し、骨芽細胞・破骨細胞・軟骨細胞の代表的分化マーカーの発現変動を確認することで、各分子の細胞内機能解析を実施した。

4 . 研究成果

(1) 選択した 6 分子に関して、マイクロアレイによる網羅的な発現変動解析結果と実際の各細胞内における遺伝子発現変動とが基本的には一致することが確認された。

(2) Zfp423 は間葉系細胞の多分化能維持と骨芽細胞分化には抑制的に機能しているが、軟骨細胞と破骨細胞の分化には強く関与していない

Zfp191 は間葉系細胞の多分化能維持と骨芽細胞・破骨細胞分化に促進的に働くが、軟骨細胞の分化には強く関与していない

Zfp467 は間葉系細胞の多分化能維持に抑制的に機能している一方で、骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞の分化には促進的に機能している

Zfp235 が間葉系細胞の多分化能維持と軟骨細胞分化には抑制的に機能しているが、骨芽細胞と破骨細胞の分化を促進的に機能している

Zfp800 が骨芽細胞・破骨細胞分化に促進的に機能しているが、軟骨細胞の分化には強く関与していない

Zfp820 は骨芽細胞と破骨細胞分化に促進的に機能しているが軟骨細胞の分化には抑制的に機能している

上記 ~ のそれぞれを示唆する知見を得た。

(3) Zfp800 と Zfp820 に関しては、それらの間葉系細胞多分化能維持における役割は単純ではなく多様性があり、分化促進的に機能するか、あるいは逆に分化抑制的に機能するかは、細胞の分化段階によって変化することを示唆する結果を得た。

(4) Zfp423、Zfp191、Zfp467、Zfp235、Zfp800、Zfp820 が制御するシグナルに関しては、骨軟骨分化における代表的なシグナルである BMP シグナル、Wnt シグナル、ヘッジホッグシグナル、インシュリンシグナルの関与だけでなく、Rho シグナルやカルシウムシグナルの関与も示された。さらに興味深いことに、筋分化を制御するシグナルとの関わりも推測された。

以上の結果から、本研究で検討したジンクフィンガープロテインファミリーに属する Zfp423、Zfp191、Zfp467、Zfp235、Zfp800、Zfp820 は、間葉系細胞分化能維持あるいは骨軟骨代謝に関わる重要遺伝子の発現・機能制御機能を有することが示された。

本研究の成果は現在国際雑誌へ投稿準備中である。今後は本研究の成果を発展させ、間葉系細胞の分化制御機構の解明を目指すとともに、その成果を骨再生医学へ還元するべく研究を継続する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

Sakuyama A, Hayasaka J, Hayashi H, Tachikawa N, Mori Y: Implant treatment using a block bone graft from the medial plate of the ilium: a case study. 13th Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery, Taipei Marriott Hotel, Taipei, Taiwan, November 8-11, 2018.

杉山知子, 野口忠秀, 小濱亜希, 三宅真次郎, 笹栗健一, 須永 中, 森 良之: 層板骨を用いた顎裂部骨移植術後の骨架橋形成に関する評価 . 第 42 回日本口蓋裂学会総会・学術集会, 大阪, 2018 年 5 月 24-25 日

〔その他〕

ホームページ等

自治医科大学歯科口腔外科学講座ホームページ

<http://www.iichi.ac.jp/dent/7.html>

アウトリーチ活動

(招待講演)

小笠原 徹：骨軟代謝・再生医療における細胞周期関連分子の役割。
東京農工大学跡見研究室セミナー 東京農工大学，東京 2018年6月22日

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小笠原 徹

ローマ字氏名：OGASAWARA, Toru

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：20359623

研究分担者氏名：野口 忠秀

ローマ字氏名：NOGUCHI, Tadahide

所属研究機関名：自治医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30275705

研究分担者氏名：土屋 欣之

ローマ字氏名：TSUCHIYA, Yoshiyuki

所属研究機関名：自治医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：00343442

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。