

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11784

研究課題名(和文)骨細胞への分化誘導法を確立する新たなアプローチ

研究課題名(英文) A new approach to establish the culture system for inducing differentiation into osteocyte

研究代表者

村田 有香 (MURATA, YUKA)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90755068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞は、多数の細胞突起を伸ばしてメカニカルストレスを感知することにより、骨代謝を調節している。しかしながら、未分化な細胞から骨細胞へと分化誘導させる手法は完全には確立されていない。本研究は、効果的に骨細胞へと分化誘導させる新たな手法を確立することを目的とした。マウスMC3T3-E1細胞を型コラーゲンゲル内に包埋あるいは型コラーゲンゲル上に播種して三次元的に培養を行い、培養液にはリン酸などの試薬を添加した。その結果、骨細胞様の突起の形成および骨細胞分化マーカーの発現上昇が確認され、未分化な細胞から骨細胞様の細胞へと分化誘導させる新たな手掛かりが見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨細胞分化に関する研究はこれまでも多数行われており、様々な培養条件下で未分化な細胞から骨様組織へと分化させることは行われてきたが、骨細胞への分化誘導を行う手法は完全には確立されていない。本研究では、新たな培養条件を検討し、未分化な細胞から骨細胞様の細胞へと分化誘導させる新たな手掛かりが見つかった点に、学術的に大きな意義がある。本研究の成果から、頭蓋顔面の発生および成長発育、骨系統疾患などの基礎となる骨代謝に関わる分子メカニズムの解明へとつながり、骨代謝疾患への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Osteocytes extend long and branched cellular processes throughout neighbouring cells and sense mechanical strain and translate strain into biochemical signals which are vital for the regulation of bone formation and resorption. A method for differentiating and inducing osteocyte from undifferentiated cells has not been established. In our study, mouse MC3T3-E1 cells were cultured using 3D cultures in osteogenic media which contained such reagent as phosphoric acid. Collagen solution were laid on glass-bottomed dishes or mixed with media which contained the cells. Consequently, the differentiated cells extended long cell processes from the cell body and the osteocyte specific markers were upregulated. We found a new clue for the differentiation from undifferentiated cells into osteocyte-like cells.

研究分野：歯学

キーワード：骨芽細胞分化 骨細胞

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

## 1. 研究開始当初の背景

骨細胞の分化は未分化な細胞から骨芽細胞 (Osteoblast) への分化に始まる。骨芽細胞は分化に伴ってマトリックスタンパク質 (骨基質) を産生し、その骨基質の中に埋もれて石灰化することにより骨細胞 (Osteocyte) となる。骨細胞は骨組織を構成する細胞の大多数を占め、多数の細胞突起を伸ばして骨細胞間あるいは他の細胞とのネットワークを形成し、骨に対するメカニカルストレスを感知して細胞間で刺激情報を伝達することが知られている (Bonewald. J. Musculoskelet Neuronal Interact. 2005 Dec;5(4):321-4.) (図 1)。すなわち、骨細胞は、メカニカルストレス応答の主役であり細胞のコミュニケーションの中心的役割を果たしている。一方で、骨代謝は、頭蓋顔面の発生および成長発育、歯の矯正移動に伴う歯槽骨のリモデリング、骨形成不全症等の骨系統疾患など歯科矯正学分野とも深く関わっている。未分化な細胞を骨芽細胞および骨細胞へと分化させる試みはこれまでも行われており、様々な条件で検討され、実験が行われてきた。代表的なものとして、マウスの新生仔頭蓋冠から樹立された MC3T3-E1 細胞にリン酸溶液を添加した場合や低酸素状態 (Hypoxia) で培養した場合に、骨細胞への分化が促進されたという報告がある (Hirao et al. J Bone Miner Metab. 2007 Sep;25(5):266-276.)。これらのことから、リン酸添加および低酸素状態が未分化な細胞から骨細胞への分化誘導に深く関与していると考えられる。さらに、過去の研究から、MC3T3-E1 細胞はコラーゲンゲル内に包埋し三次元的に培養することで骨細胞様の突起を形成することが知られている (Murshid et al. J Bone Miner Metab. 2007 May;25(3):151-8.)。しかし、これらの条件を同時に試みた研究は未だ存在せず、骨細胞への完全な分化誘導は未だ行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、三次元培養を行い、さらには骨細胞分化を誘導する様々な因子を用いることで、効果的に未分化な細胞から骨芽細胞および骨細胞へと分化誘導させる新たな手法を確立することを目的とした。

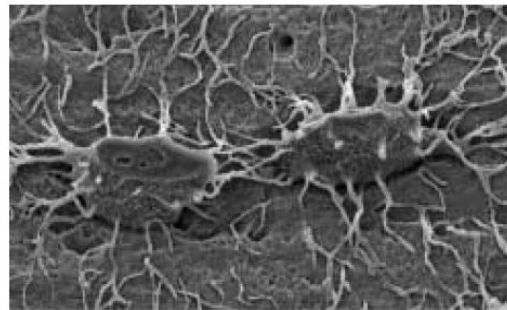


図 1. 骨細胞間のネットワーク

## 3. 研究の方法

本研究では、未分化な細胞から骨細胞への分化誘導を行い、形態観察および分子生物学的アプローチを用いて骨細胞への分化を評価する。

以下に具体的な項目を挙げる。

- (1) マウス MC3T3-E1 細胞を、リン酸添加および低酸素状態下で三次元コラーゲンゲル培養を行い、骨細胞へと分化誘導させる。
- (2) 上記培養法によって分化させた骨細胞の細胞骨格構造を、蛍光標識染色を用いて形態観察を行う。さらに、骨細胞の分化マーカーを用いて細胞の分化度を評価する。

### (1) 三次元コラーゲンゲル培養法を用いた骨細胞分化誘導法の確立

#### (i) 三次元コラーゲンゲル培養

型コラーゲンを用いてゲルを作製し、マウス MC3T3-E1 細胞をコラーゲンゲル内に包埋して三次元培養を行う。

#### (ii) 石灰化促進

コラーゲンゲル内に包埋したマウス MC3T3-E1 細胞に対して、培地にリン酸溶液を添加し、さらに低酸素状態とする。これらの状況下で培養し、骨細胞への分化を促進させる。

### (2) 三次元コラーゲンゲル培養法を用いて分化させた細胞の評価

#### (i) 細胞の形態観察

分化した骨細胞の細胞骨格構造を観察するために、ファロイジンなどの蛍光標識試薬を用いて、共焦点顕微鏡で観察する。

#### (ii) 骨細胞分化マーカーによる確認

リアルタイム PCR 法を用いて骨細胞分化マーカーの発現を解析し、骨細胞へと分化していることを確認する。

## 4. 研究成果

型コラーゲンを用いてゲルを作製し、骨原性細胞であるマウス MC3T3-E1 細胞をコラーゲンゲル

ル内に包埋あるいはコラーゲンゲル上に播種して三次元的に培養した。培養液にはリン酸などの試薬を添加した。分化誘導7日目および14日目の細胞を、ファロイジン、DAPIなどの蛍光標識染色を用いて形態観察を行ったところ、いずれにおいても細胞から突起が伸びていることが確認できた(図2)。分化誘導を行った細胞から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて骨細胞分化マーカーの発現を解析したところ、分化誘導によりこれらの遺伝子発現が上昇していることがわかった(図3)。これらのことから、未分化な細胞を分化誘導させることで骨細胞様の細胞へと分化することが示唆された。

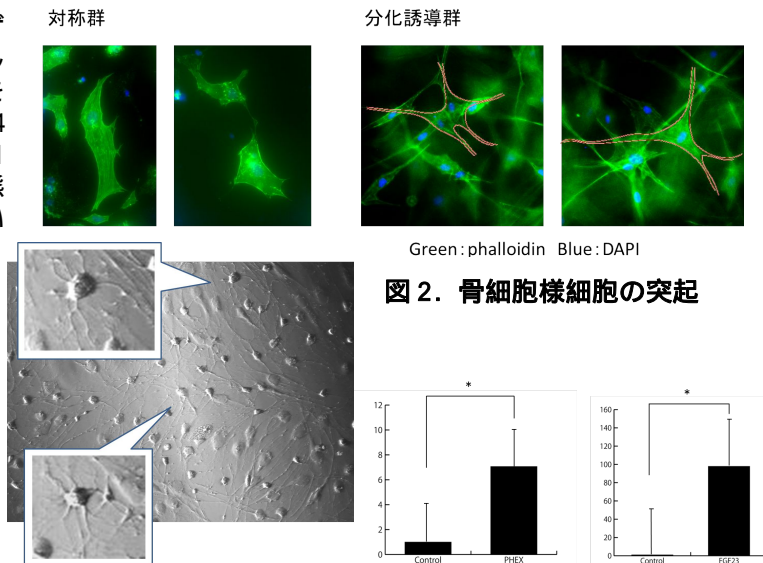


図2. 骨細胞様細胞の突起

図3. 骨細胞分化マーカーの発現

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Murata Y, Kurosaka H, Ohata Y, Aikawa T, Takahata S, Fujii K, Miyashita T, Morita C, Inubushi T, Kubota T, Sakai N, Ozono K, Kogo M, Yamashiro T: A novel PTCH1 mutation in basal cell nevus syndrome with rare craniofacial features. *Human Genome Variation*. 6, 2019 査読有

Murata Y, Oka A, Haraguchi S, Yamashiro T: The use of temporary anchorage devices for orthodontic treatment of high-angle Class III malocclusion in a patient with impacted upper canine teeth. *Orthodontic Waves*. 77: 189-195, 2018 査読有

村田 有香, 黒坂 寛, 相川 友直, 田中 晋, 古郷 幹彦, 山城 隆: 顎裂部において2分割 Le Fort 型骨切り術を行った片側性唇顎口蓋裂症例、大阪大学歯学雑誌 62(1): 21-26, 2017 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

村田有香, 犬伏俊博, 山本沙優里, 森田知里, 伊藤慎将, 黒坂 寛, 山城 隆: 骨細胞への分化誘導法を確立する新たなアプローチ、第77回日本矯正歯科学会学術大会、2018年

村田有香, 黒坂 寛, 相川友直, 古郷幹彦, 山城 隆: 両側性唇顎口蓋裂を伴う基底細胞母斑症候群の一症例 第77回日本矯正歯科学会学術大会、2018年

村田有香, 黒坂 寛, 伊藤慎将, 森田知里, 山城 隆: グルコーストランスポーター1型異常症の顎顔面口腔領域における特徴および矯正歯科治療の経過に関する報告 第60回近畿東海矯正歯科学会学術大会、2018年

村田有香, 黒坂 寛, 伊藤慎将, 田中 晋, 相川友直, 古郷幹彦, 山城 隆: 唇顎口蓋裂患者に対して上顎骨前方部骨延長術により歯列弓形態を改善した1症例 第28回顎変形症学会総会・学術大会、2018年

村田有香, 森田知里, 伊藤慎将, 三原聖美, 黒坂 寛, 山城 隆: グルコーストランスポーター1型異常症における矯正歯科診断および矯正歯科治療の経過 第59回近畿東海矯正歯科学会学術大会、2017年

村田有香、黒坂 寛、山城 隆：顎裂部において2分割 Le Fort 型骨切り術を行った片側性唇顎口蓋裂症例 第58回 近畿東海矯正歯科学会学術大会・総会、2016年

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：山城 隆

ローマ字氏名：YAMASHIRO takashi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70294428

研究分担者氏名：黒坂 寛

ローマ字氏名：KUROSAKA hiroshi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：20509369

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。