

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15659

研究課題名(和文) 骨粗鬆症患者における個人差研究のためのリプログラミング因子の探索

研究課題名(英文) Search for reprogramming factors for individual difference study in osteoporosis patients

研究代表者

滝沢 崇 (Takizawa, Takashi)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40748109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞の持つ後天的な遺伝情報を残しつつ、細胞増殖能をアップレギュレートするような遺伝子セットを同定するため、新生児マウス及びラット、成熟マウス及びラットの頭蓋骨を採取して同じ条件で培養し骨芽細胞系の細胞を単離した。またそれぞれの細胞からRNAを採集して新生児マウスと成熟マウスのALPを比較した。更にDNAマイクロアレイ解析により発現遺伝子の比較を行い、骨芽細胞増殖に関わる遺伝子を同定した。その後成熟マウスの骨芽細胞に遺伝子を導入し、細胞に対する影響を評価した。

研究成果の概要(英文)：In order to identify gene sets that up-regulate cell proliferation ability while leaving acquired genetic information possessed by osteoblasts, skull bones of newborn mice and rats, adult mice and rats were collected and cultured under the same conditions And osteoblast line cells were isolated. In addition, RNA was collected from each cell and ALP of newborn mouse and adult mouse was compared. Furthermore, genes involved in osteoblast proliferation were identified by comparing expression genes by DNA microarray analysis. Then, genes were introduced into osteoblasts of adult mice, and the effect on cells was evaluated.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨芽細胞 遺伝子発現 骨再生 細胞増殖 細胞分化 間葉系骨髄幹細胞 骨粗鬆症

### 1. 研究開始当初の背景

健康長寿社会を目指す上で、骨粗鬆症の克服は重要な課題になっている。骨粗鬆症とは、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスが崩れ、骨吸収に傾いてしまうことが主な病因であり、加齢によって惹起されるという特徴を持つ。このため骨形成促進に関する研究開発は骨粗鬆症克服への治療に大きく寄与する。現在、副甲状腺ホルモンの刺激により骨形成を間接的に促進する薬剤は開発されているが、骨芽細胞に直接作用して増殖分化を促す遺伝子セットや間葉系骨髄幹細胞に作用して骨芽細胞に直接分化を促すような遺伝子セットは過去に報告されていない。更に成熟マウス及びラットから骨芽細胞系細胞を直接単離するような手法について確立されていない。骨形成促進につながる骨芽細胞の増殖もしくは分化に関わる遺伝子セットを同定することは世界初の試みであると同時に、成熟実験動物由来の骨芽細胞を扱うという手法自体が世界初である。骨芽細胞の増殖もしくは分化に関わる遺伝子セットを同定することにより従来治療のモニタリングである骨代謝マーカーでの評価を行いつつ、骨粗鬆症治療を行えることに期待を持てる。

2. 骨芽細胞にある細胞本来の遺伝情報を残しつつ、細胞増殖能もしくは分化能をアップレギュレートするような遺伝子セットを同定する。

### 3. 研究の方法

新生児マウス及び成熟マウスの頭蓋骨組織から骨芽系細胞の初代培養実験：生後2日の新生児マウス及び生後12週の成熟マウスと、生後3日の新生児ラット及び生後32週の成熟ラットの頭蓋骨を直接摘出し、コラーゲンゲルを用いて培養することによって骨髄間葉系幹細胞から骨芽細胞系細胞を単離した (Fig1a,b,c,d)。

頭蓋骨採取の段階では、骨膜や血球成分をできるだけ除去し純粋な骨組織から Out grow した細胞を骨芽細胞系細胞として初代培養を行い増殖スピードについて観察した。これらの細胞に対して ALP 染色を用いて検鏡した。また ALP 発現比について、定量化 PCR 法を用いて比較評価した。

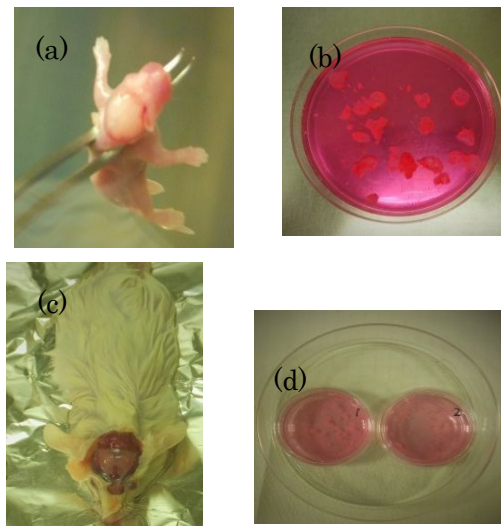


Fig1 マウス頭蓋骨から間葉系骨髄細胞の採取。(a)生後2日の新生児マウス、(b)その摘出头蓋骨細断片、(c)生後12週齢ラット頭蓋骨から間葉系骨髄細胞の採取。(d)その摘出头蓋骨細断片

候補遺伝子の同定：新生児及び成熟マウス及びラットの RNA を採取することによる DNA マイクロアレイ解析を行い発現遺伝子の比較を行った。

候補遺伝子の目的細胞への導入：32週齢の成熟ラット頭蓋由来細胞へ遺伝子導入を行い、 $8.0 \times 10^5$  Cells/dish で播種した各細胞をレンチウイルスに感染させた遺伝子 (400 $\mu$ g/ml) へ 72 時間暴露し遺伝子導入細胞のセレクションを実施し、候補遺伝子の細胞に対する増殖能につき検討した。

#### 4. 研究成果

新生児マウス及び成熟マウスの頭蓋骨組織から骨芽細胞系細胞の抽出、培養実験：細胞は約3日間の培養でコンフルエントになったのに対して、生後12週のマウス頭蓋骨から採取した細胞は約1ヶ月間培養でコンフルエントになり、成熟マウスの方が新生児マウスよりも増殖スピードが遅かった。ALP染色により細胞質と核を染めて検鏡すると、新生児マウス、ラット及び成熟マウス、ラットで細胞骨格及び核の形態に違いを認めなかった。

ラットでは更に詳細に7週齢, 45週齢, 62週齢のものを加えて培養しその特徴についても追加検討中である。新生児及び成熟細胞のALPを比較すると、どちらの細胞でもALPの発現を認めており、初代細胞培養から最終培養まで骨芽細胞系細胞の存在を確認できた。また、新生児マウスではALPは約16倍、新生児ラットでは約2.8倍発現が高く、新生児マウスでは成熟マウスと比べて骨芽細胞系細胞の増殖スピードまたは骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化スピードが早いことが示唆された (Fig2a,b)。

成熟マウス及びラットで新生児マウス及びラットよりも2倍以上発現が変化する遺伝子で且つ骨芽細胞系細胞への増殖もしくは分化に関連している情報を持ち合わせている候補遺伝子を5つ選択できた (遺伝子名はA,B,C,D,Eとする)。

これらの5つの遺伝子とも独自にPCRクローニングを行い、大腸菌用のプラスミドベクターに制限酵素を用いて遺伝子を組み込み、大腸菌用のプラスミドベクターからレンチウイルスベクターへの組み込み、ウイルスを媒介に成熟細胞への遺伝子導入に成功した (Fig3)。AからEまでの抗生剤耐性を持った遺伝子を成熟ラット骨芽細胞系細胞に導入したものに

対して抗生剤投与を行いセレクション評価を行ったところ、AからEの全ての遺伝子導入細胞の生存が確認できた。これにより *in vitro* で細胞導入について確認することができた (Table1)。現在、遺伝子の導入効率の向上について検討中である。これらの候補遺伝子を成熟細胞に導入後の影響を確認したところ、少なくとも day2 よりも day4 で増殖率が高く、遺伝子導入した細胞で増殖率が上がる傾向となった。これらの評価についてはまだ再現性を得るため追加実験が必要である。

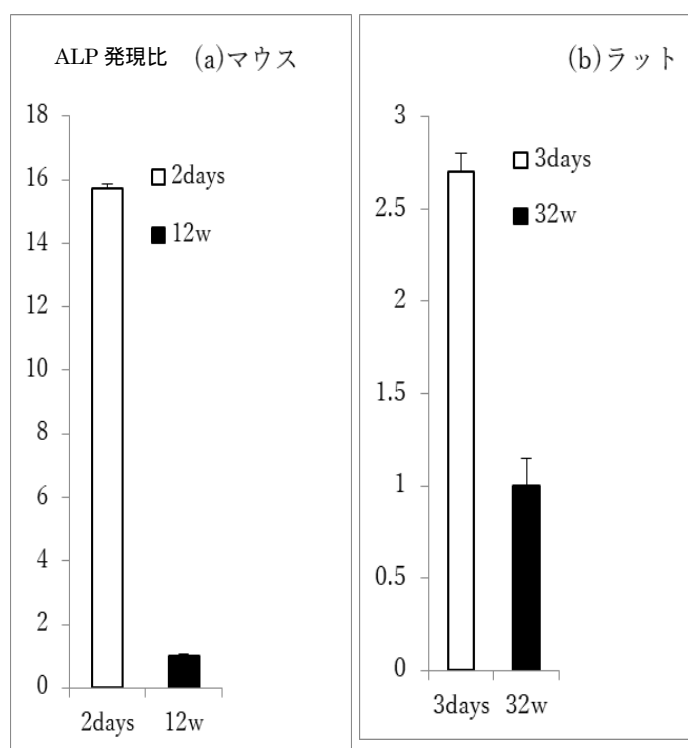


Fig2 新生児及び成熟細胞のALP発現比の比較 (a)マウス(b)ラット

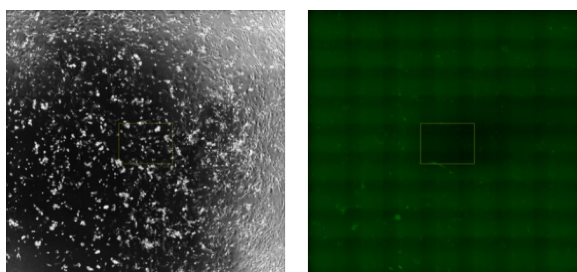


Fig3 成熟ラット骨芽細胞系細胞への遺伝子導入図 (蛍光色素部分)

遺伝子	A	B	C	D	E
総数	1.12*10 <sup>6</sup>	1.21*10 <sup>6</sup>	1.47*10 <sup>6</sup>	1.02*10 <sup>6</sup>	9.76*10 <sup>5</sup>
生存数	8.18*10 <sup>5</sup>	7.87*10 <sup>5</sup>	7.50*10 <sup>5</sup>	6.13*10 <sup>5</sup>	7.81*10 <sup>5</sup>
生存率	73%	65%	51%	61%	80%

Table1 各遺伝子導入細胞に対して抗生剤を用いたセレクション評価

### 【結論】

・成熟マウスの頭蓋骨組織から骨芽細胞系細胞を培養するという方法自体が未だ確立されていないために、この方法を確立するだけで多くの骨芽細胞系の培養実験で有用となる。

・細胞増殖や分化に向かうような遺伝子セットを同定することで、in vitro で骨芽細胞や骨髄細胞に直接作用して細胞の増殖、分化ができれば、骨再生医療への応用の期待が持てる。

増殖遺伝子セットが細胞に作用して細胞増殖することにより、細胞の持つ後天的な遺伝情報は残したまま骨再生を期待でき、PINP や TRACP-5b などの骨代謝マーカーで治療効果判定をモニタリングしながら骨形成促進を期待できる。これにより骨粗鬆症の新治療にも応用できる可能性を秘めている。

なお、上記実験の結果について今後論文投稿を進めて行く予定である。なお、同定した遺伝子セットについては論文で報告したいために、学会発表等を行わず伏せている。

### 5. 研究組織

#### (1) 研究代表者

滝沢 崇 (Takizawa Takashi)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：40748109

#### (2) 研究分担者

羽二生 久夫 (Haniu Hisao)  
信州大学・学術研究院医学系・准教授  
研究者番号：30252050  
友常 大八郎

(Tomotsune Daihachirou)

信州大学・学術研究院医学系・助教  
研究者番号：80283802