

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09718

研究課題名(和文) 骨リモデリング再現系を利用したshRNAスクリーニングによるカップリング解析

研究課題名(英文) Analysis of coupling by shRNA screening using a bone remodeling reconstitution system

研究代表者

疋田 温彦(Hikita, Atsuhiko)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：60443397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では申請者等の開発した、体内における骨リモデリングを体外で再現可能な系を応用して、スクリーニング系の開発を行った。培養上清を回収し、骨吸収マーカーであるCTX-Iおよび骨形成マーカーであるGla-Osteocalcinの濃度を測定し、これらを指標とすることで、骨リモデリングに影響を与える薬剤のスクリーニング系を確立した。また、骨リモデリング過程に影響を及ぼすと考えられるシグナル系の候補を選択し、これらのシグナル系に作用する薬剤の投与実験を行い、その影響を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨は常にリモデリング(吸収と形成)を繰り返しており、吸収と形成のバランスにより骨量が維持されている。骨リモデリングの解析を行うことは、骨粗しょう症などのより良い治療法の開発に極めて重要である。本研究において薬剤が骨リモデリングに与える影響を解析して得られた知見は、骨リモデリングについての理解を深めるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a screening system using a method by which bone remodeling in the body can be reconstituted ex vivo. By quantifying CTX-I, a bone resorption marker, and Gla-Osteocalcin, a bone formation marker, in the culture medium, and utilizing these markers as indices, a screening system for drugs which affect bone remodeling was established. In addition, candidates of signalings which affect bone remodeling were selected, and drugs which regulate these signalings were tested in the reconstitution system.

研究分野：骨代謝

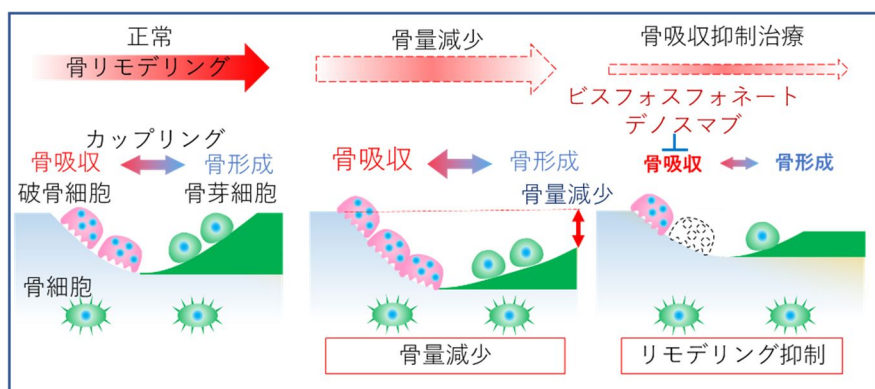
キーワード：骨リモデリング イメージング

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域においては、骨粗鬆症や悪性腫瘍の骨病変に対してビスフォスフォネートや抗RANKL抗体による治療を受けている患者に対する歯科治療で、しばしば骨吸収抑制剤関連顎骨壊死(Anti-resorptive agents-related osteonecrosis of the jaw: ARONJ) が問題となる(Imai Y. Ann Jpn Prosthodont Soc 2014)。ARONJは難治性であり、またその治療のための休薬による骨折リスクの上昇も報告されている(Curtis JR et al. Osteoporos Int 2008)。ARONJの発生の予防や治療法の確立のために、その発症メカニズムの解明は喫緊の課題である。

骨の恒常性は、骨吸収に引き続いて骨形成が生じる、リモデリングと呼ばれる一連の現象を介して維持されている。骨リモデリングにおいては、骨吸収と同一部位に骨形成が起こる(カップリング)とする仮説が提唱されている(Parfitt AM. Calcif Tissue Int 1984)。カップリングはリモデリング過程において、骨吸収と骨形成をリンクさせ、両者のバランスを保つ最も重要な機構であると考えられている。骨吸収が阻害されると、カップリングが起こらず骨形成もまた低下し、骨リモデリングが抑制される。ARONJの発症には感染の関与も考えられて

いるが、骨吸収阻害剤投与患者に共通して発症する事から、リモデリング低下が発症メカニズムの根底に存在する可能性は高い。ARONJの発症機序を解明し、予防するためには、骨リモデリングの根底にあるカップリング機構を理解し、これを制御する手法を確立する必要がある。しかし、カップリングの解析は、既存の in vitro 培養、一時点での組織学的評価では不可能である。また、2光子励起顕微鏡を用いた蛍光 in vivo イメージングについても、長期観察の困難さや、深さ方向の解像度不足などからカップリングの解析は難しい。そのため、どのような因子がどの細胞の、どの時期の、どの機能に影響しているのかなど、カップリング機構の詳細についての理解は進んでおらず、その解明が望まれている。

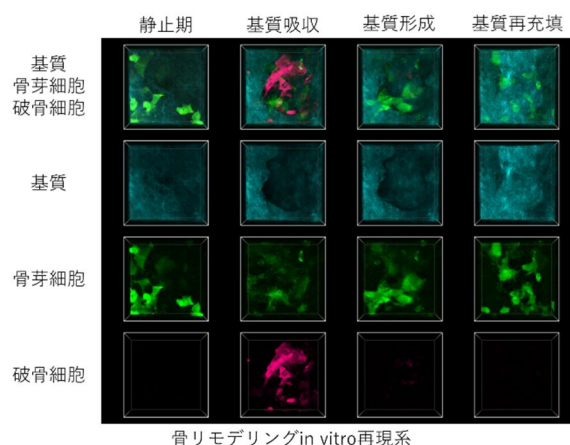


骨リモデリングに対する骨吸収抑制治療の影響

いるが、骨吸収阻害剤投与患者に共通して発症する事から、リモデリング低下が発症メカニズムの根底に存在する可能性は高い。ARONJの発症機序を解明し、予防するためには、骨リモデリングの根底にあるカップリング機構を理解し、これを制御する手法を確立する必要がある。しかし、カップリングの解析は、既存の in vitro 培養、一時点での組織学的評価では不可能である。また、2光子励起顕微鏡を用いた蛍光 in vivo イメージングについても、長期観察の困難さや、深さ方向の解像度不足などからカップリングの解析は難しい。そのため、どのような因子がどの細胞の、どの時期の、どの機能に影響しているのかなど、カップリング機構の詳細についての理解は進んでおらず、その解明が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、カップリングに影響を与える分子の high throughput スクリーニング系を確立し、骨リモデリングの根底にあるカップリング機構を制御する因子を複数同定して、それらが細胞動態に与える影響を時空間的に明らかにすることを目的とする。これまで、カップリングを細胞レベルで解析する系は存在しなかったが、申請者らは骨リモデリングを細胞レベルで観察可能な in vitro 系を確立し(骨リモデリング in vitro 再現系) カップリングが実際に生じる現象であることを世界に先駆けて報告した(Hikita A et al. Bone 2015)。現在でも、この系はリモデリング過程を再現可能な唯一の系と考えられる。本研究ではこの系をさらに発展させ、他に例を見ないカップリングに影響を与える分子の high throughput スクリーニング系を確立し、実験に用いる。



骨リモデリング in vitro 再現系

3. 研究の方法

骨リモデリング in vitro 再現系を応用して骨吸収、骨形成を high throughput に解析可能な系を構築し、shRNA ライブラリーに対するスクリーニングを行って、骨芽細胞におけるカップリング関連分子の候補を得る。これらの候補分子の抑制がカップリングに及ぼす影響を、骨リモデリング in vitro 再現系を用いて確認する。カップリングへの関連が確認された分子に関してはノックアウトあるいはトランスジェニックマウスなどの遺伝子改変マウスを作製し、また同定された分子に対する阻害剤の投与などを行い、in vivo における骨代謝への影響を解析する

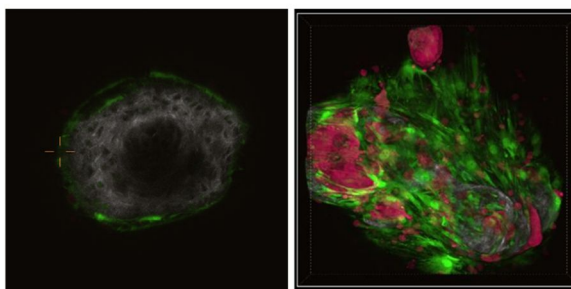
4. 研究成果

平成 30 年度は、High throughput スクリーニング系の開発を行った。EGFP マウス新生仔由来骨芽細胞を骨芽細胞分化培地で培養し、石灰化結節の形成を確認後、RANK-Cre xROSA-LSL-tdTomato マウス骨髄マクロファージとの共存培養を開始、3 週後に再び骨芽細胞分化培地に戻し、さらに 3 週培養を行った。この系において、共存培養開始時から 6 週後まで 1 週毎、計 7 時点の培養上清を回収し、骨吸収マーカーである CTX-1、および骨形成マーカーである PINP、Gla-Osetocalcin に対する ELISA を行った。結果として CTX-1 は骨吸収期に上昇し、骨再形成期には低下した。一方、PINP は骨吸収期に低下し、骨再形成期も低下したままであったが、Gla-Osteocalcin は骨吸収期に低下し、骨再形成期に再上昇した。同時に行ったイメージングにおいて、石灰化結節の定量化を行い、経時的な変化を解析した。結果として、石灰化結節の減少、増加を観察しており、ELISA の結果と合致していた。これらの結果を踏まえ、CTX-1 および Gla-Osteocalcin をそれぞれ骨吸収、骨形成の指標としたスクリーニング系を確立した。

令和元年度は、上記の骨モデリングおよびリモデリングインビトロ再現共存培養系より回収した培養上清を用いた、骨吸収マーカーである CTX-1、および骨形成マーカーである Gla-オステオカルシンに対する ELISA、および上記共存培養系における経時的なイメージング解析の結果、さらには過去の骨モデリング・リモデリングに関連する報告などを基に、骨モデリングおよびリモデリングにおける一連の事象において活性が変化する、あるいはこれらの事象に影響を及ぼすと考えられるシグナル系の候補をピックアップした。また、このシグナル系の活性化および抑制が骨代謝関連細胞の動態に及ぼす影響を解析するために、まず上記の骨モデリングおよびリモデリングインビトロ再現共存培養系に対する薬剤投与とプロトコール検討実験として、共存培養系に種々の濃度の候補薬剤を添加して培養し、アリザリンレッド染色吸光度測定を行い、適切な薬剤投与条件を設定した。さらに、シグナル活性化を蛍光で検出可能な蛍光プローブの作製を開始した。

2光子顕微鏡による薬剤の影響についての評価

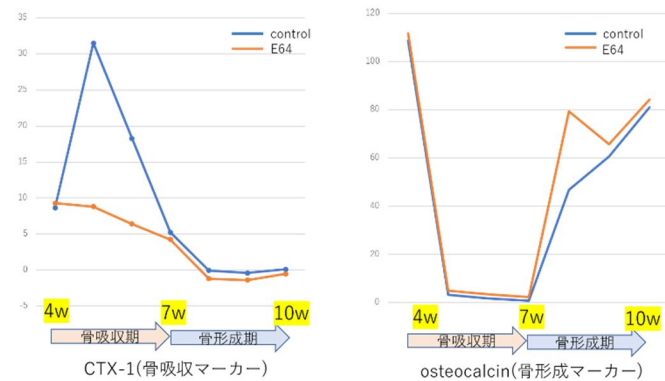
共存培養1週



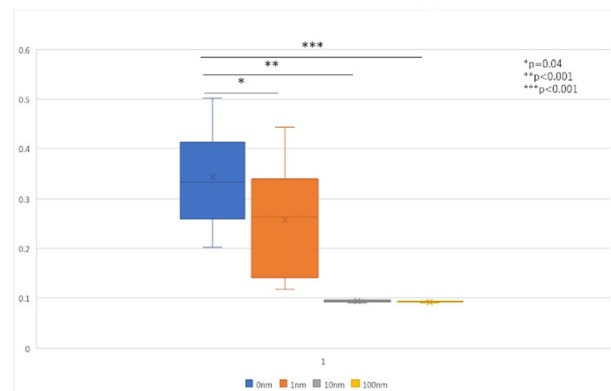
薬剤添加なし

薬剤添加あり

上清中の骨吸収・骨形成マーカーの評価 (ELISA)



薬剤濃度とアリザリンレッド染色吸光度



共存培養系に種々の濃度の候補薬剤を添加して培養し、アリザリンレッド染色吸光度測定を行い、適切な薬剤投与条件を設定した。さらに、シグナル活性化を蛍光で検出可能な蛍光プローブの作製を開始した。令和 2 年度は、候補シグナル系の活性化および抑制が骨代謝関連細胞の動態に及ぼす影響を、上記の骨モデリングおよびリモデリングインビトロ再現共存培養系に対して薬剤投与を行うことで解析した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 疋田 温彦、坂本 朋昭、小口 修矢、星 和人
2. 発表標題 2 光子顕微鏡を用いた骨評価
3. 学会等名 第39回日本骨形態計測学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小口修矢, 星和人, 疋田温彦
2. 発表標題 作用機序の異なる骨吸収阻害薬存在下における骨リモデリングの in vitro 観察
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 疋田 温彦、坂本 朋昭、小口 修矢、星 和人
2. 発表標題 骨代謝細胞ネットワーク再現系を用いた薬効評価
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会 （招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 疋田 温彦、山脇 孝徳、梅山 遼、星 和人
2. 発表標題 3 次元プリンタを用いた再生骨足場の開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	星 和人 (Hoshi Kazuto) (30344451)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究 分担者	杉山 円 (Sugiyama Madoka) (90451814)	東京大学・医学部附属病院・客員研究員 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------