

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17110

研究課題名（和文）網羅的遺伝子解析を用いた、老齢マウスにおける骨欠損修復メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of bone defect repair in aged mice using whole transcriptome analysis

研究代表者

猪狩 洋平（Igari, Yohei）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10734270

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：高齢者の創傷治癒力は低く、骨損傷時には修復遅延や修復骨量の不足が問題となる。しかし、老化が骨修復に与える影響については知見が乏しい。そこで本研究では、マウス頭頂骨に規格化骨欠損を作製し、修復骨における遺伝子発現を網羅的に解析することで、高齢と若齢とで骨修復における分子メカニズムが異なるか、検討した。まず、生理的状態の骨に発現する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、高齢ではタンパク質分解に関わる遺伝子（MMP等）が発現上昇することがわかった。そこで骨修復過程におけるMMP9と13の発現について検討した。その結果、MMP9と13が骨欠損修復における骨基質改造に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨修復の分子メカニズムの解明を目的とした研究において、成熟した若い個体におけるデータは蓄積されてきたが、高齢における骨修復に着目した研究はほとんどなく、本研究結果は貴重な知見となる。また超高齢社会である日本では、高齢者人口の増加とともに、高齢患者に適した治療の必要性が高まっている。このような社会背景を鑑みると、本研究結果は高齢における骨欠損修復の分子メカニズムの一端を解明するものであり、社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：The wound healing ability of elderly people has been known to be lower than that of young people, and bone damage in the elderly often causes problems such as delayed repair and insufficient amount of repaired bone. However, there are few reports on bone healing in aged animals, and little is known about the effects of aging on bone defect repair. Therefore, this study was designed to investigate whether the molecular mechanism of bone defect repair differs between the aged and the young mice using whole transcriptome analysis.

In this study, genes expressed in physiological bone were examined by whole transcriptome analysis, and genes involved in protein degradation including MMPs were shown to be upregulated in the aged. Then, the expression of MMPs 9 and 13 during bone healing was investigated. The results suggested that MMP9 and 13 are involved in bone matrix remodeling in the bone defect repair.

研究分野：老年歯科学

キーワード：老化 骨欠損修復 網羅的遺伝子解析 マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科領域では、歯周病や抜歯・嚢胞摘出等に際し、骨欠損が生じる症例が多く、骨欠損修復は臨床において重要な課題となっている。一般的に、高齢者の創傷治癒力は若齢者と比較して低いと言われており、骨損傷時の修復の遅延や修復骨量の不足等の問題がしばしば起こる。しかし、従来の骨修復に関する動物実験の多くは若齢個体を対象にしており、高齢個体における骨修復の報告はほとんどないことから、老化が骨欠損修復に与える影響については生物学的知見が乏しく、高齢における骨修復の分子メカニズムは不明である。

(2) 遺伝子解析技術の進歩により、近年、多数の遺伝子発現を網羅的に検出することが可能となった。網羅的遺伝子解析法としては、RNA シークエンスや CAGE (cap analysis of gene expression) 等が知られている。これらの手法は、次世代シーケンサーと呼ばれる装置を用いることで、数千万から数億の DNA 断片の塩基配列を同時並行的に解読し、発現遺伝子を同定することを可能とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「高齢者と若齢者とで、骨欠損修復におけるメカニズムは異なるのか」という学術的問いに答えるため、マウス頭頂骨規格化骨欠損モデルを作製して、CAGE 法を用いて老齢マウスと若齢マウスの骨欠損修復過程における遺伝子発現を網羅的に解析し、遺伝子の発現パターンを比較検討することで、老齢個体と若齢個体とで骨修復の分子メカニズムが異なるのかを調べ、老化が骨修復に与える影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

生後 18 ヶ月齢の C57BL/6 系雄性マウス：老齢マウス

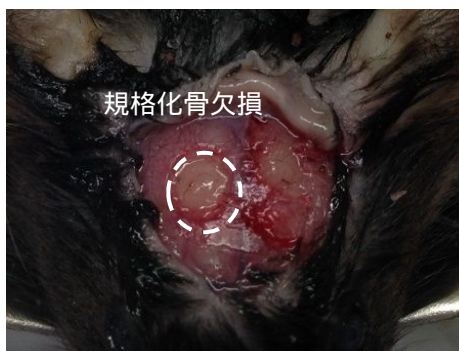
生後 10 週齢の C57BL/6 系雄性マウス：若齢マウス

(2) 規格化骨欠損の作製

全身麻酔下にてマウス頭頂骨部の皮膚を切開し、皮膚・骨膜弁を剥離し、トレフィンパー

を用いて直径 2.4mm の骨欠損を作製した。骨片を除去後、皮膚・骨膜弁を復位し、5-0

ナイロン糸を用いて縫合した。



(3) マイクロ CT 解析

骨欠損作製後 4 週・8 週・12 週で骨欠損修復部を含んだ頭頂骨を摘出した。

摘出した頭頂骨を 4% パラホルムアルデヒド固定した。

マイクロ CT にて固定後の試料を撮影し、骨修復過程を老齢と若齢とで比較検討した。

(4) 組織学的解析

マイクロ CT 撮影後の試料を脱灰し、パラフィン包埋後、5 μ m 厚の連続切片を作製した。切片にヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施して光学顕微鏡で観察し、老齢と若齢とで骨修復過程について組織学的に比較検討した。

(5) CAGE 解析

老齢と若齢マウスの下顎骨 (頭頂骨と同じ膜内骨) を採取し、超音波ホモゲナイザーで破砕後、トータル RNA を抽出した。

RNA サンプルを株式会社ダナフォームに送り、CAGE 解析を依頼した。

CAGE 法による網羅的遺伝子解析のデータを受領後、生理的状態の老齢マウスと若齢マウスの骨における発現遺伝子について GO 解析を行った。

(6) 免疫組織化学による MMPs のタンパク質発現の検討

H-E 染色を行う目的で作製したパラフィン切片を脱パラフィン後、3%過酸化水素水加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼ不活化処理を行った。

PBS で洗浄後、5%ヤギ血清/PBS を切片に滴下し、ブロッキング処理し、MMP9 と MMP13 の一次抗体 (Abcam) を用いて室温にて 2 時間反応させた。

PBS で洗浄後、シンプルステインマウス MAX-P0 (R) を用いて、30 分間、二次抗体を反応させた。

DAB 染色キット (ニチレイバイオサイエンス) を用いて、DAB 染色を行い、顕微鏡下で発色を確認し、蒸留水で染色反応を停止した。
1%メチルグリーン溶液にて対比染色を行った。

- (7) Real-time PCR 法による mRNA の定量解析のためのサンプル採取
骨欠損作製後 8 週で骨欠損内部にできた修復骨を採取した。
採取した修復骨を超音波ホモゲナイザーで破碎し、トータル RNA を抽出した。

4. 研究成果

(1) 修復骨量の変化

頭頂骨規格化骨欠損作製後、4 週・8 週・12 週で骨欠損部をマイクロ CT 撮影した。得られたデータから三次元画像を作成した (図 1)。

骨欠損のサイズが臨界径を超えていることから、完全には治癒しないものの、若齢と比較して高齢において修復骨量は少ない傾向があった。現在、定量データを基に統計学的解析を進めているところである。

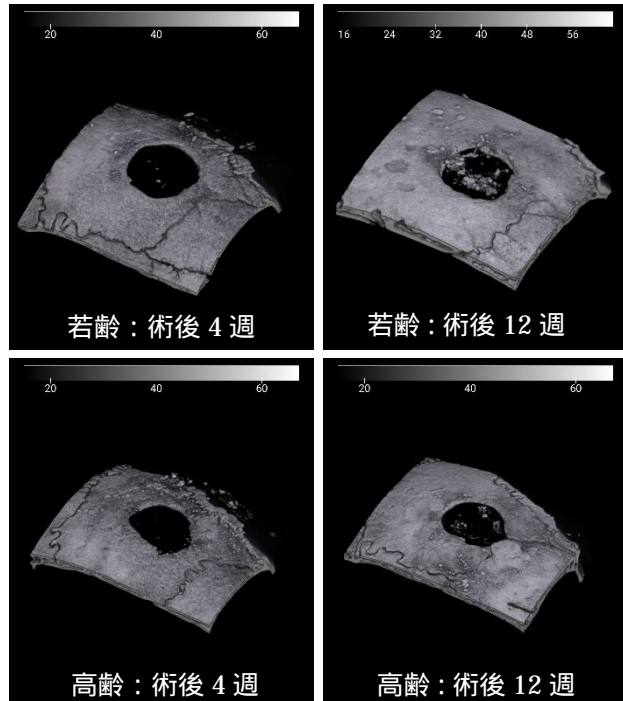


図 1. 骨欠損部の三次元画像

(2) H-E 染色の結果

頭頂骨規格化骨欠損作製後、4 週・8 週・12 週で骨欠損部の組織切片を用いて H-E 染色を施し、修復骨について観察した。

その結果、骨断端部において、また、しばしば欠損部内に島状に新生骨が観察された。概ね、若齢・高齢ともに術 4 週から術後 12 週の間に骨修復は進行していた (図 2)。

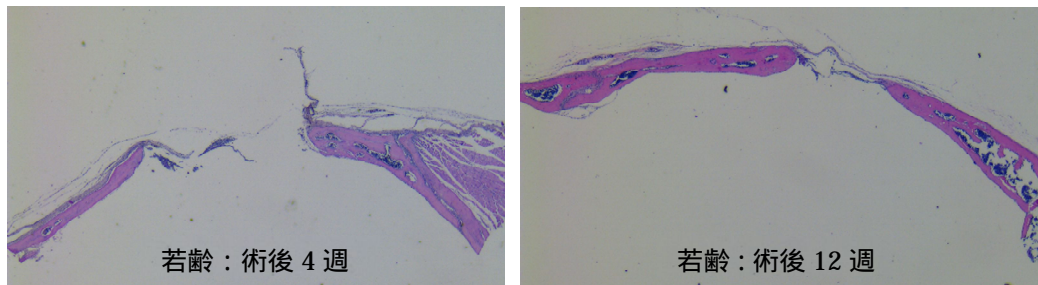


図 2. 骨欠損部の H-E 染色像

(3) GO 解析の結果

Term	Count	P-value	Benjamini
Keratinocyte differentiation	28	1.20E-28	1.80E-25
cell adhesion	26	1.20E-07	3.00E-05
proteolysis	25	1.10E-05	1.60E-03
peptide cross-linking	23	6.20E-26	4.60E-23
inflammatory response	23	1.70E-08	5.00E-06
immune response	19	2.10E-07	4.50E-05
epidermis development	18	3.10E-17	1.60E-14
immune system process	16	8.40E-04	7.00E-02
innate immune response	16	1.30E-03	9.10E-02
regulation of cell proliferation	15	1.10E-05	1.60E-03

表 1. 発現変動遺伝子が最も多かった、上位 10 個の生物学的 GO term

CAGE 解析で得られたデータを用いて発現変動遺伝子解析を行い、高齢で発現上昇した遺伝子について GO 解析を行った結果を表 1 に示す。上皮と免疫に関する GO term が多くランクインした。本研究で着目したのは 3 位の proteolysis である。この中には、細胞外マトリックス分解の中心的酵素である MMP がいくつか含まれていた。

(4) 免疫組織化学による MMP9 と MMP13 のタンパク質発現

GO 解析の結果を受け、骨欠損修復過程における MMP9 と MMP13 のタンパク質発現について検討することにした。MMP9 は破骨細胞により分泌され、MMP13 は骨形成系細胞である骨芽細胞や骨細胞により分泌される。

若齢では、術後 4 週の骨断端に MMP9 と MMP13 の免疫陽性反応がみられた。骨修復が活発に行われている時期には破骨細胞と骨芽細胞の両方が活発に基質分解している

ことが示唆される。また術後 12 週では、骨断端部の MMP13 の免疫陽性骨芽細胞はみられたが、MMP9 を発現する破骨細胞は認められなかった。破骨細胞による骨基質分解は終了したと考えられる。術後 4 週と 12 週ともに骨細胞に MMP13 の免疫反応がみられた。現在、高齢における MMP9 と MMP13 の発現を検討中である。

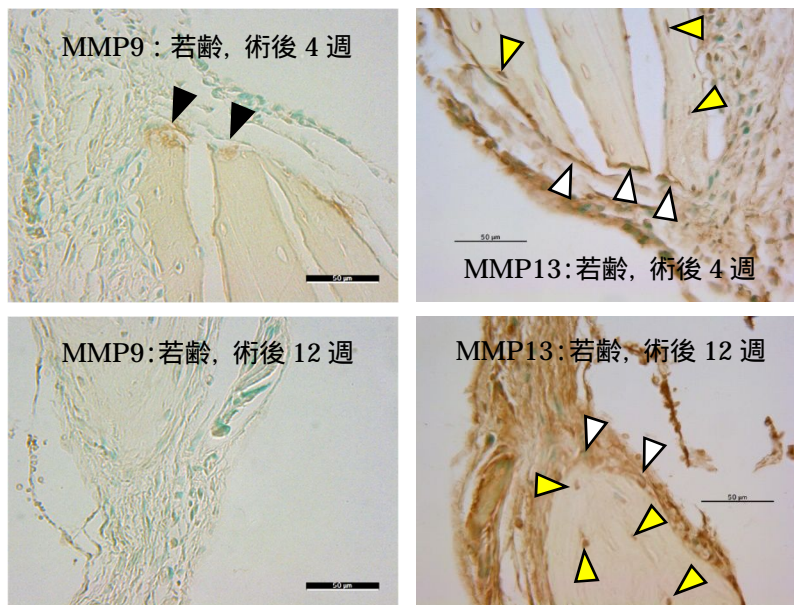


図 3. 骨欠損部の骨断端部の免疫染色像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kageyama Yoko, Nakamura Megumi, Igari Yohei, Yamaguchi Satoshi, Oguchi Akiko, Murakawa Yasuhiro, Hattori Yoshinori, Sasano Yasuyuki	4. 巻 57
2. 論文標題 Expression of matrix metalloproteinase 3 and 10 is up regulated in the periodontal tissues of aged mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 733 ~ 741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 猪狩洋平, 影山曜子, 萱場敦子, 眞柳みゆき, 中村恵, 服部佳功, 笹野泰之	4. 巻 36/37
2. 論文標題 加齢マウス脛骨における成長板軟骨の組織構造と皮質骨の石灰化に関する検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 東北大学歯学会雑誌	6. 最初と最後の頁 32 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 影山曜子, 中村恵, 猪狩洋平, 山口哲史, 服部佳功, 笹野泰之
2. 発表標題 網羅的遺伝子解析を用いた高齢マウスの下顎における細胞外マトリックス分解酵素の発現
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 影山曜子, 中村恵, 猪狩洋平, 山口哲史, 服部佳功, 笹野泰之
2. 発表標題 マウス下顎のトランスクリプトーム解析による老化関連細胞外マトリックス分解酵素の同定
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------