

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19008

研究課題名(和文) 未分化細胞から骨細胞への分化過程を制御する遺伝子群の機能的解析

研究課題名(英文) Identification of transcriptional factors and key genes in osteocyte differentiation

研究代表者

鈴木 瑛一 (Suzuki, Eiichi)

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：50778503

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)：本研究では、未分化間葉系幹細胞から骨細胞への分化過程における遺伝子発現の変動を解析し、主に成熟骨芽細胞から骨細胞分化における制御メカニズムを明らかにすることを目的としている。遺伝子改変マウスの使用により、未分化間葉系幹細胞から骨細胞への分化に関与する主要遺伝子群の候補が示された。候補遺伝子の1つである低分子量ストレスタンパク質 B-crystallin (Cryab) は、細胞骨格における恒常性維持に働き、骨細胞への分化または骨細胞の機能維持に重要な役割を担っていることが示唆された。本研究の結果は、歯槽骨をはじめとする硬組織への分化制御機構の解明につながるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の推進により、骨細胞の分化制御機構および機能の一端を明らかにすることが可能と考えられ、その成果は骨細胞生物学の進歩に貢献できる。さらに、骨細胞の骨再生における機能は十分に明らかにされていないので、本研究の成果は骨再生治療の開発にも多くの情報を提供し、より予知性の高い歯周組織再生療法の開発にも貢献し、国民の健康とQOLの向上に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the key factors in bone formation by using Bone Marrow Stromal Cells (BMSC) derived from transgenic mice. By using transgenic mice, candidate genes involved in the differentiation from undifferentiated mesenchymal stem cells into osteocytes were identified. One of them, B-crystallin (Cryab), a low molecular weight stress protein, functions in cytoskeletal homeostasis, suggesting that it plays an important role in differentiation into osteocytes or in maintaining osteocyte function. The results of this study will lead to the elucidation of the regulatory mechanism of differentiation into hard tissues such as alveolar bone.

研究分野：歯周病学

キーワード：骨細胞分化 遺伝子改変マウス ストレスタンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化・成熟過程において、骨芽細胞は分化段階により種々の表現系を発現する。未熟な骨芽細胞である前駆骨芽細胞や前骨芽細胞は I 型コラーゲンやアルカリフォスファターゼを、成熟した骨芽細胞はオステオカルシンなどを発現している。これまで我々は、これらの発現には様々なシグナル分子が関与し、さらに複数のシグナルのクロストークにより厳密に制御されていることを明らかにしてきた (Suzuki E et al., PLoS One, 2014)。また未分化細胞から骨系細胞への分化には、骨芽細胞に特異的な転写因子である Runx2 (Komori T et al., Cell, 1997) と Osterix (Sp7) (Nakashima K et al., Cell, 2002) が骨芽細胞分化のマスター因子として働く。このように、骨芽細胞分化過程の前期においては、鍵となる転写因子並びに遺伝子群がいくつか明らかになっているが、その後の成熟骨芽細胞から骨細胞への分化を制御する転写因子・遺伝子群の詳細についてはほとんど明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

成熟骨芽細胞は石灰化骨器質に埋め込まれ骨細胞となり、Dentin matrix protein 1 (DMP1), Sclerostin, FGF23 などを産生する。本研究では、この骨細胞特異的マーカーを利用した遺伝子改変マウス (Dmp1-Cre:EGFP マウス) を使用することで、未分化間葉系幹細胞から骨細胞への分化過程における遺伝子発現の変動を解析し、主に成熟骨芽細胞から骨細胞分化における制御メカニズムを明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

骨細胞特異型 EGFP 発現マウスを作成した。すなわち、骨細胞マーカーである Dmp1 遺伝子のプロモーター下流に、自己消化性ペプチド (T2A) で連結された Cre 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (Dmp1-T2A-Cre) と、Cre リコンビナーゼ存在下で EGFP を発現するトランスジェニックマウス (CAG-CAT-EGFP) を交配した。このマウス由来の細胞は Dmp1 存在下で EGFP を発現する。研究の流れとして、マウスより骨髄間葉系幹細胞 (BMSC) の採取並びに iPS 細胞の誘導、骨分化誘導、FACS による EGFP 陽性細胞のソーティング、DNA マイクロアレイによる発現遺伝子の確認を行う。その後発現の変動した遺伝子群より、候補遺伝子を選定した後、siRNA により目的遺伝子のサイレンシングを行い、骨細胞分化への影響を解析する。その後生体内における候補遺伝子の同在を評価するため、マウス大腿骨における免疫組織化学染色を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子改変マウスの作成

骨細胞マーカーである Dmp1 遺伝子のプロモーター下流に、自己消化性ペプチド (T2A) で連結された Cre 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (Dmp1-T2A-Cre 慶応義塾大学 (現・東京歯科大学) 中村貴博士より入手) と、Cre リコンビナーゼ存在下で EGFP を発現するトランスジェニックマウス (CAG-CAT-EGFP) の Hetero type をそれぞれ交配させ、Homo type の Transgenic mice を作成。それぞれの Homo type 同士を交配させ、Dmp1 存在下で EGFP を発現するマウスを作成した。

#### (2) 骨細胞様細胞の確認と単離

8 週齢のトランスジェニックマウスの大腿骨・腓骨より骨髄液を採取、2 週間培養を行い、接着し増殖する細胞集団 (BMSC) を得た。その後、分化誘導培地 (Birmingham E et al., Eur Cell Mater, 2012) により一定期間 (2-4 週) 培養を行った。分化誘導された細胞集団において 2 週間を超えると一部の細胞に EGFP の発現を認めた (図 2)。

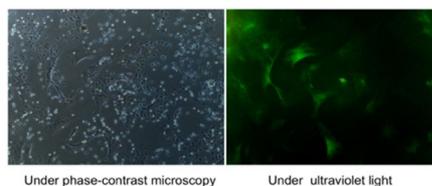


図 2 蛍光顕微鏡下における EGFP 発現の確認

#### (3) EGFP 陽性細胞の単離

trypsin-EDTA にて細胞集団を回収し、FACS を用いたフローサイトメトリーにて解析した。EGFP を標識とし、EGFP 陽性細胞、すなわち Dmp1 発現細胞の単離を行った (図 3)。

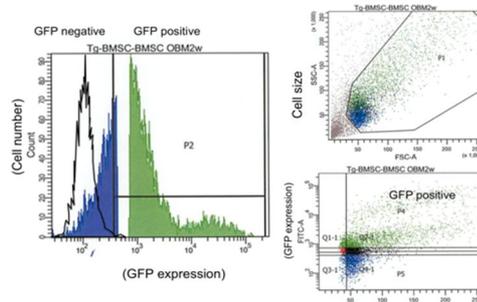


図 3 Flow Cytometer による EGFP 発現細胞の単離

#### (4) 遺伝子発現解析

EGFP 陰性細胞と比較して、EGFP 陽性細胞では Osteocalcin をはじめとする骨分化マーカー mRNA 発現量の有意な亢進が認められた ( $p < 0.05$ )。DNA マイクロアレイより *Bmp8b*, *Pdgfc*, *Cryab* 等の遺伝

図 3 Flow Cytometer による EGFP 発現細胞の単離

子群において、EGFP 陰性・陽性細胞間で有意な発現変動が認められた ( $p < 0.001$ ,  $FDR < 0.05$ )。さらに発現変動遺伝子についてリアルタイム PCR 法による解析を行ったところ、EGFP 陰性細胞と比較し EGFP 陽性細胞において、ストレスタンパク質の一つである *Cryab* mRNA 発現量の有意な亢進を認めた ( $p < 0.001$ ) (図 4E)。BMSCs の骨分化誘導時における経時的な mRNA 発現量を解析すると、*Cryab* は *Dmp1* と同様の発現パターンを示し (図 4F, G), *Cryab* が骨細胞への分化ならびに硬組織形成に関与していることが示唆された。

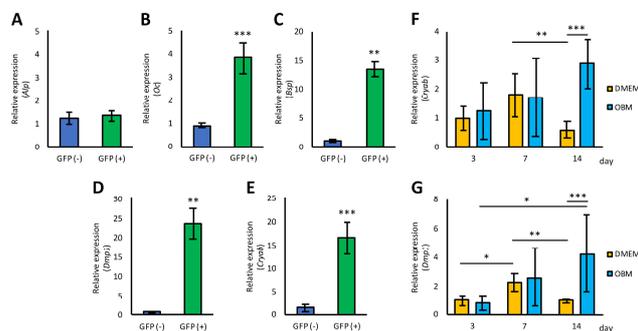


図 4 Real-time PCR 法による遺伝子発現解析

#### (5) *Cryab* 抑制による骨関連マーカー遺伝子発現の変動

リポフェクション法により BMSCs に *Cryab* siRNA の導入を行った。*Cryab* タンパク発現はウエスタンブロット法にて確認を行った。上記と同様に *Cryab* 抑制 BMSCs に対し骨芽細胞分化誘導を行ったところ、*Alp*, *Oc* といった骨分化マーカーの有意な減少が認められた (図 5: Real-time PCR 法,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ )。

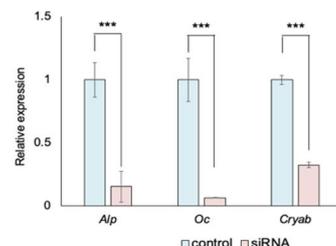


図 5 *Cryab* 抑制による遺伝子発現解析

#### (6) マウス大腿骨における免疫組織化学染色

マウス大腿骨における免疫組織化学染色をおこなった所、DMP1 と近似した位置において *CRYAB* タンパクの発現が認められた (図 6)。

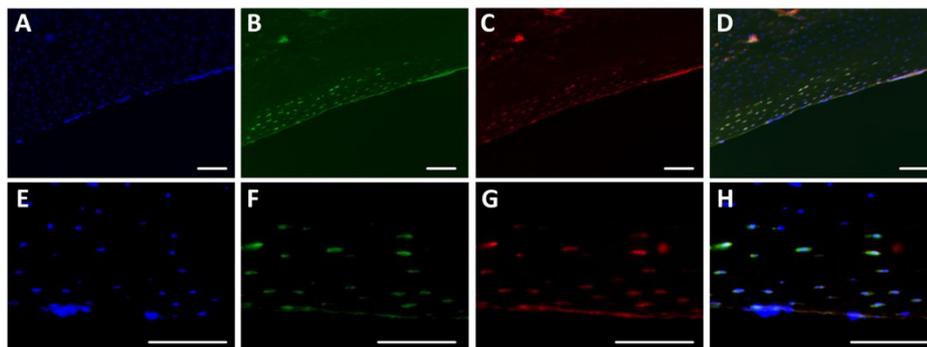


図 6 マウス大腿骨におけるタンパク発現 DAPI (A and E, blue), DMP1-EGFP (B and F, green), CRYAB (C and G, red), and merge images (D and H).  $\times 40$  magnification (A-D) and  $\times 100$  magnification (E-H). Scale bars = 100  $\mu$ m.

遺伝子改変マウスの使用により、未分化間葉系幹細胞から骨細胞への分化に関与する主要遺伝子群の候補が示された。B-crystallin (*Cryab*) は低分子量ストレスタンパク質であり、細胞骨格における恒常性維持に働く。骨細胞ネットワークは、メカニカルストレスに反応して骨量の調整を行っていることから、*Cryab* は骨細胞への分化または骨細胞の機能維持に重要な役割を担っていることが示唆された。本研究の結果は、歯槽骨をはじめとする硬組織への分化制御機構の解明につながるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Aoki Hideto, Suzuki Eiichi, Nakamura Takashi, Onodera Shoko, Saito Akiko, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Nishimura Ken, Saito Atsushi, Azuma Toshifumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cells from homozygous Runx2-deficient mice show poor response to vitamin D during osteoblastic differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-022-00317-w	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0件

〔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
---------	---------