

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22701

研究課題名（和文）「光」で骨を造る：革新的な骨再生療法の創出

研究課題名（英文）Building Bone with "Light": Creating Innovative Bone Regeneration Therapy

研究代表者

小野 卓史（Ono, Takashi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30221857

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000 円

研究成果の概要（和文）：近年、タンパク質工学技術の進展により様々な光遺伝学ツール（光応答タンパク質）が人工的に作られるようになり、光による細胞内シグナルの操作、遺伝子発現や遺伝子組換えの誘導などが可能になってきた。しかしながら、一つの光遺伝学ツールのみで細胞を分化させて特定の機能を持つ成熟細胞を作り出すような研究は、これまでほとんど行われていない状況であった。そこで、本研究は、光を用いて成熟破骨細胞を分化誘導する新たなツールOpto RANKを開発し、光照射を制御することで特定の場所で破骨細胞を生み出すことに成功し、その結果、局所的な骨吸収が可能とな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

本研究は光を用いて細胞を分化誘導し、機能的な細胞を生み出すという光遺伝学の新たな応用方法を示し、自由に光照射をコントロールできるメリットを生かして、細胞分化における細胞内のシグナル伝達の時空間的な詳細な解析が可能になる。また、光照射をコントロールして骨吸収を操ることができることから、骨疾患や歯科矯正の新たな治療方法の開発につながる可能性が期待される。さらに、今後、本研究の手法を転用して、新たな光遺伝学ツールを作成することで、光遺伝学研究の発展につながることも期待される。

研究成果の概要（英文）：Advances in protein engineering technology have enabled the artificial creation of various photogenetic tools (light-responsive proteins), which can be used to manipulate intracellular signals, induce gene expression and genetic recombination by light. However, few studies have been conducted to differentiate cells and produce mature cells with specific functions using only one photogenetic tool. In this study, we developed a new tool, Opto RANK, which induces differentiation of mature osteoclasts using light, and succeeded in generating osteoclasts at specific locations by controlling light irradiation, suggesting that local bone resorption is possible as a result.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：光遺伝学 光遺伝学ツール（光応答タンパク質） 破骨細胞 骨吸収 Opto-RANK

1. 研究開始当初の背景

現代の矯正歯科治療は、骨のターンオーバーに時間を要し治療期間がかかるという難題を抱えている。骨の恒常性維持において、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のダイナミックなプロセスが大きくかわる。破骨細胞の過剰な活性化は骨粗鬆症や歯周病の原因となり、破骨細胞の機能不全は骨硬化を呈する大理石骨病などの原因となることが知られている。また、破骨細胞は血球系の細胞であり、その分化前の前駆細胞は RANK タンパク質を細胞表面に発現する。RANKL タンパク質という RANK タンパク質の結合パートナーが RANK と結合することにより前駆細胞は分化誘導され巨大な多核の成熟破骨細胞になる。このような細胞の分化プロセスにおける、細胞内カルシウム(Ca)シグナルの変化が知られているが、Ca チャネルを標的にして、細胞機能を人為的に制御する研究は、現在まで報告されていず、低侵襲・迅速・確実な骨再生療法の創出が求められる。

光遺伝学は光を用いて光感受性タンパク質を可逆的に、そして時空間的に自在に制御するが、脳神経系の研究では神経活動を光で制御できるチャンネルロドプシンが広く応用され、神経ネットワークや神経機能の理解が大きく進んでいる。近年、タンパク質工学技術の進展により様々な光遺伝学ツール(光応答タンパク質)が人工的に作られるようになり、光による細胞内シグナルの操作、遺伝子発現や遺伝子組換えの誘導などが可能になってきた。

2015 年に応募者は、青色光照射によって細胞膜 Ca チャネルを人為的に開閉操作できる光スイッチタンパク質を開発し、標的細胞の Ca シグナルを非侵襲的かつ即時に制御できる技術を国内外において初めて報告し、2018 年に、光スイッチによる骨芽細胞の分化誘導を実証した。しかしながら、一つの光遺伝学ツールのみで細胞を分化させて特定の機能を持つ成熟細胞を作り出すような研究はこれまで報告されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究は、低侵襲・迅速・確実な骨再生療法の創出を目指して、光で RANK タンパク質を活性化する人工タンパク質 Opto-RANK の開発、そして Opto-RANK を用いた破骨細胞の分化誘導の検証を目的とし、新たな骨再生技術の基盤的研究を行う。

3. 研究の方法

本研究は、以下の実験を実施した

- 1) 細胞質で機能する Opto-RANKc および細胞膜近傍で機能する Opto-RANKm の 2 種類の Opto-RANK の作製
- 2) 破骨細胞の前駆細胞 RAW264.7 細胞へのレトロウイルスベクターによる Opto-RANKc 導入および Opto-RANKc 細胞の作製
- 3) 光照射による Opto-RANKc 細胞の破骨細胞分化実験

4. 研究成果

Opto-RANKc 遺伝子と TRAF6 遺伝子を培養細胞に導入し、光照射を行ったところ、Opto-RANKc タンパク質の多量体形成と同時にさらに多くの TRAF6 タンパク質の多量体形成が認められ、光照射により RANK が活性化されたことを示された。

また、培養中の Opto-RANKc 細胞に対して 7 日間特定のパルス条件で光照射した後、細胞 TRAP 染色をした結果、Opto-RANKc 細胞は赤く染色され、さらに巨大な多核の細胞が観察され、定量 PCR 解析により、分化破骨細胞に特徴的な遺伝子発現の上昇を確認された(図 1)。これらの結果から、Opto-RANKc 細胞は、光照射により成熟破骨細胞に分化したことが示された。

さらに、Opto-RANKc 細胞に骨吸収の機能があるかどうかをピットフォーメーションアッセイで調べた結果、Opto-RANKc 細胞を光によって分化させた細胞が骨吸収能を持つということ、そして骨吸収を空間特異的にコントロールできることが認められた(図 2)。

以上の結果から、本研究成果は光を用いて細胞を分化誘導し、機能的な細胞を生み出すという光遺伝学の新たな応用方法を示し、自由に光照射をコントロールできるメリットを生かして、細胞分化における細胞内のシグナル伝達の時空間的な詳細な解析が可能になる。また、光照射をコントロールして骨吸収を操ることができることから、骨疾患や歯科矯正の新たな治療方法の開発につながる可能性が期待される。さらに、今後、本研究の手法を転用して、新たな光遺伝学ツールを作成することで、光遺伝学研究の発展につながることを期待される。

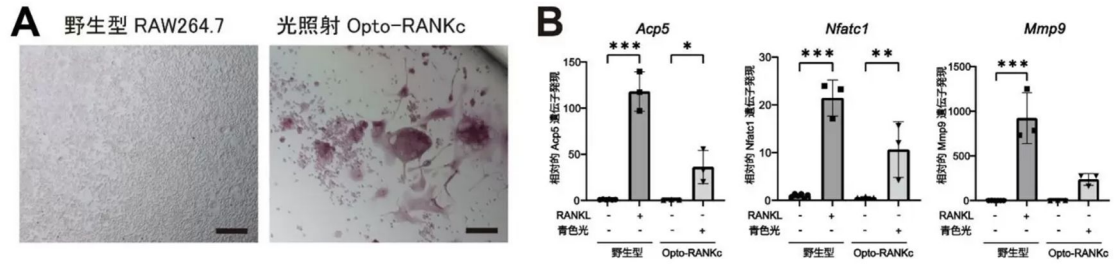


図 1 Opto-RANKc 細胞の青色光照射による分化。Opto-RANKc が RAW264.7 細胞に導入された Opto-RANKc 細胞について解析した。(A) Opto-RANKc 細胞に 7 日間、特定のパルス条件下で光照射したのち TRAP 染色をすると、赤く染色された巨大な破骨細胞ができる (右)。左は野生型 RAW264.7 細胞。スケールバーは 150 μm 。(B) 野生型 RAW264.7 細胞を RANKL で、Opto-RANKc 細胞を光により 5 日間分化誘導し、破骨細胞特異的遺伝子 *Acp5*、*Nfatc1*、*Mmp9* の遺伝子発現を定量 PCR により解析した。光照射 Opto-RANKc 細胞でこれらの遺伝子発現の上昇がみられた。

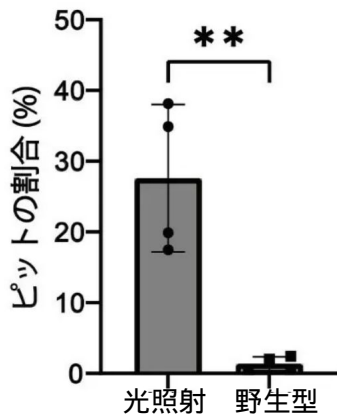


図 2 ピット形成の割合

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 1件）

1. 著者名 Takada Aiko, Asano Toshifumi, Nakahama Ken-ichi, Ono Takashi, Nakata Takao, Ishii Tomohiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of an optogenetics tool, Opto-RANK, for control of osteoclast differentiation using blue light	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-52056-w	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高田愛子、石井智浩、中浜健一、浅野豪文、小野卓史、中田隆夫
2. 発表標題 オプトジェネティクスを用いた破骨細胞分化の光制御
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sato M, Asano T, Hosomichi J, Nakata T, Ono T.
2. 発表標題 Optogenetic manipulation of intracellular calcium by blue light-activated Ca ²⁺ channel switch promotes osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells.
3. 学会等名 95th congress of the European Orthodontic Society (国際学会)
4. 発表年 2019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	中田 隆夫 (Nakata Takao) (50218004)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	光遺伝学ツールの作製、培養細胞実験モデルの確立 および維持、結果の解釈

6. 研究組織（つづき）

	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	細道 純 (Hosomichi Jun) (00420258)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	培養細胞モデルおよび動物モデルの生化学的解析、 動物モデルの形態学的解析および組織学的解析

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