

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24075

研究課題名(和文) OCSTAMPを分子標的とした病的破骨細胞誘導の制御による骨吸収性疾患の再生治療

研究課題名(英文) Bone regenerative medicine by regulation of pathological osteoclastogenesis targeting OC-STAMP.

研究代表者

山本 健太 (Yamamoto, Kenta)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：00636160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、OC-stampは特に病的な破骨細胞誘導に関与している可能性が示唆されており、これを制御することができれば、通常の骨リモデリングを阻害することなく、歯周病や関節リウマチのような骨吸収性疾患に対する治療のターゲットとなりえる。そこで、本研究で標的細胞のOC-stamp発現を抑制し、破骨細胞への分化抑制効果を検討した。その結果、OC-stampの発現抑制を行った群では、TRAP染色やqRT-PCRにて破骨細胞分化を抑制しえることを確認した。しかしながら、本研究手法では、破骨細胞分化抑制効果は限定的であった。今後さらなる検討を必要とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、病的破骨細胞誘導に関与している可能性が示唆されているOC-stampを特異的に抑制することで、副作用の少ない、骨再生療法の基盤開発を目指したものである。本研究の成果より、OC-stampを抑制することで、破骨細胞分化を制御できうる可能性が示唆された。本研究成果は安全で効果的な新規骨再生療法の基盤技術確立の一助となりえ、学術的意義と社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It was reported that OC-stamp is involved in rather pathological osteoclast formation as cell-cell fusogen than in osteoclastogenesis as regular bone remodeling. Thus, if we can regulate the expression of OC-stamp, it will be new bone regenerative therapy for osteolytic diseases such as periodontitis and rheumatoid arthritis without inhibiting normal bone metabolism. We evaluated osteoclastogenesis of target cells by down-regulating the expression of OC-stamp. The cells down-regulated OC-stamp expression showed lower osteoclasts formation than non-transfected cells by TRAP staining and qPCR. However, the inhibition of osteoclastogenesis was limited. Further studies are needed.

研究分野：再生医学

キーワード：骨再生 病的破骨細胞誘導抑制

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病、関節リウマチ、骨粗鬆症といった骨吸収性疾患では、骨リモデリングの恒常性が崩れ、骨形成の減少と骨吸収の増大が起きている。そして現在骨吸収抑制剤としてビスフォスフォネート製剤や抗 RANKL 抗体が、骨粗鬆症やガンの骨転移の治療に使用されており、大きな効果を上げているが、正常な骨吸収まで阻害することもあり、顎骨壊死や大腿骨の非定型骨折などの有害事象も報告されている。

そこで、我々は一律に破骨細胞分化を制御するのではなく、主に病的な破骨細胞誘導を制御しつつ、通常の骨リモデリングに必要な破骨細胞分化は維持しえる手法はないかと考えた。

Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-stamp) は、破骨細胞の成熟における細胞融合に参与する GPCR family の膜受容体である。我々は最近、この OC-stamp の KO マウスのフェノタイプを解析した結果、通常では大理石骨病などの骨病変を示さないが、歯周病を誘導すると歯槽骨骨吸収に抵抗性を示すことを発見した。これはつまり、病態局所で、OC-stamp を特異的に制御することが出来れば、副作用の少ない効果的な治療法になりうる可能性を秘めていると考えられる。

しかしながらこれまでに、歯槽骨をはじめ骨吸収部位で OC-stamp の発現を抑制し、その効果を検討した報告は認められない。

2. 研究の目的

本研究では、OC-Stamp siRNA を、siRNA 導入用ナノゲルを用いて標的細胞に導入することで、OC-stamp 抑制療法の有用性を検証し、効果的で安全な新規骨再生療法開発の基盤技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

● RAW264.7 細胞に対する OC-stamp siRNA のノックダウン効果の検討

まず RAW264.7 細胞を用いて、3 種類の OC-stamp siRNA と 3 種類の導入用ナノゲルを用いて RAW264.7 細胞の OC-stamp の遺伝子発現がノックダウンされるか、されるならどの組み合わせが良いかの検討を行った。

● 骨髄由来単球細胞の破骨細胞分化に対する OC-stamp siRNA の効果の検討

上記で得られた一番良い組み合わせでの OC-stamp siRNA とナノゲルを用いて、骨髄由来単球細胞に siRNA を導入し、破骨細胞分化させた。任意の日数後に RNA 抽出を行い、Real-time RT-PCR により破骨細胞関連遺伝子の発現レベルを検討するとともに、TRAP 染色を行い、TRAP 陽性多核細胞のセルカウントを行い、破骨細胞分化抑制について検討した。

● RAW264.7 細胞に対する CRISPER Cas9 plasmid を用いた OC-stamp ノックアウトの検討

より強く OC-stamp 発現を阻害するために、GFP が組み込まれた CRISPER Cas9 plasmid と OC-stamp siRNA を用いて、種々の条件でリポフェクションならびにエレクトロポレーションにて RAW264.7 細胞への導入を行った。そして RAW264.7 細胞への導入効率を、蛍光顕微鏡を用いて GFP 陽性細胞を確認することで評価した。

4. 研究成果

● RAW264.7 細胞に対する OC-stamp siRNA のノックダウン効果の検討

Scramble siRNA を導入した RAW264.7 細胞に比し、特定の組み合わせの OC-stamp siRNA とナノゲルでは OC-stamp 発現の減少を認めた。

● 骨髄由来単球細胞の破骨細胞分化に対する OC-stamp siRNA の効果の検討

OC-stamp siRNA を導入した骨髄由来単球細胞では、Scramble siRNA を導入した骨髄由来単球細胞と比較し、OC-stamp の発現は減少した。また OC-stamp siRNA を導入した骨髄由来単球細胞では、Scramble siRNA を導入した骨髄由来単球細胞と比較し、TRAP 陽性多核細胞の細

胞数の減少に加え、破骨細胞関連遺伝子である DC-stamp ならびに ACP5 の発現レベルの減少も認めた。

- RAW264.7 細胞に対する CRISPER Cas9 plasmid を用いた OC-stamp ノックアウトの検討

エレクトロポレーションを用いた OC-stamp siRNA と CRISPER Cas9 plasmid の RAW264.7 細胞への導入では、高電圧が必要なためか、導入後の RAW264.7 細胞の生存状況は不良であった。一方で、リポフェクションにて導入した群では、生存にはあまり影響を与えないものの、わずか数%の GFP 発現を認めるのみであった。その後セルソーターで GFP 陽性細胞をのみを抽出し、増幅を試みるも良好な結果は得られなかった。

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 Nakamura Koya, Yamamoto Toshiro, Ema Ryo, Nakai Kei, Sato Yoshiki, Yamamoto Kenta, Adachi Keiji, Oseko Fumishige, Yamamoto Yoshiaki, Kanamura Narisato	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of mechanical stress on human oral mucosa derived cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Diseases	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） 10.1111/odi.13638	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sato Y, Yamamoto K, Takizawa S, Adachi K, Oseko F, Kishida T, Mazda O, Yamamoto T, Kanamura N
2. 発表標題 Bone regeneration by osteoblasts transplantation using nanogel as a scaffold
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Reserch Asua Pacific Region (IADR APR) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto T, Sato Y, Yamamoto K, Adachi T, Oseko F, Kanamura N
2. 発表標題 Transplantation of dental pulp-derived cell sheets cultured on human amniotic membrane
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Reserch Asua Pacific Region (IADR APR) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中井 敬, 佐藤良樹, 山本健太, 足立哲也, 滝沢茂太, 足立圭司, 大迫文重, 山本俊郎, 金村成智
2. 発表標題 ダイレクト・コンバージョン技術による新規骨再生療法の確立
3. 学会等名 第31回日本口腔科学会近畿地方部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本健太、山本俊郎、佐藤良樹、岸田綱郎、松田修、金村成智
2. 発表標題 ケミカル・ダイレクト・リプログラミングによる機能性ヒト骨芽細胞の創出
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤良樹、山本健太、中井 敬、大迫文重、山本俊郎、岸田綱郎、松田修、金村成智
2. 発表標題 ダイレクト・コンヴァージョン技術を用いた骨芽細胞と多孔質ハイブリッド架橋ナノゲル足場を活用した骨組織再生の評価
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
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
研究協力者	松田 修 (Mazda Osam)		
研究協力者	秋吉 一成 (Akiyoshi Kazunari)		
研究協力者	中井 敬 (Nakai Kei)		

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