

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18591

研究課題名(和文) 時計遺伝子Npas2の発現制御に着目した新規骨再生法の探索

研究課題名(英文) Effect of Npas2 on osteogenic differentiation of stem cells

研究代表者

大川 博子 (Okawa, Hiroko)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00781296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：時計遺伝子には、体内時計の制御以外に、細胞増殖や分化に関わることが報告されている。本研究では、時計遺伝子Npas2がマウス骨髄間質細胞(BMSC)またはiPS細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにすることを本研究の目的として研究を進めた。時計遺伝子Clock欠失マウスからBMSCを採取し、骨芽細胞分化能を評価したところ、Clock欠失マウスBMSCは野生型と比較して骨芽細胞分化は抑制され、Npas2の遺伝子発現は上昇した。また、Npas2を低下させる化合物を添加してiPS細胞の骨芽細胞分化を評価すると、化合物の濃度依存的にiPS細胞の骨芽細胞分化が促進されたことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年iPS細胞などの幹細胞を用いた再生医療が注目されており、幹細胞を効率的に目的組織へ導く分化誘導技術の開発が期待されている。サーカディアンリズムは、約24時間周期で変動する生理現象で、睡眠、呼吸や体温などが制御されている。サーカディアンリズムを司る時計遺伝子は、細胞増殖や分化に関わることが報告されている。細胞分化に関わる時計遺伝子の発現を調節できる化合物などを発見できれば、幹細胞の新しい分化誘導技術の発見につながる可能性がある。本研究は、時計遺伝子が幹細胞の分化に及ぼす影響を明らかにすることで、分化誘導技術の開発につながり、再生医療の発展に貢献する学術的、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that the clock genes could affect not only regulation of the biological clock but also cell proliferation and differentiation. The purpose of this study was to clarify the effect of the clock gene Npas2 on osteogenic differentiation of mouse bone marrow stromal cells (BMSC) or induced pluripotent stem (iPS) cells. BMSC was collected from Clock-deficient mice and evaluated for osteogenic differentiation ability. As a result, osteogenic differentiation was suppressed and Npas2 gene expression was increased in Clock-deficient mouse BMSC as compared with the wild type BMSC. Moreover, when the osteogenic differentiation of iPS cells was evaluated by adding one compound that suppressed Npas2 gene expression, it was clarified that the osteogenic differentiation of iPS cells was promoted in a concentration-dependent manner.

研究分野：補綴歯科学

キーワード：iPS細胞 時計遺伝子

1. 研究開始当初の背景

サーカディアンリズムは、約 24 時間周期で変動する生理現象で、睡眠、呼吸や体温などが制御されており (Schmidt et al., 2017)、哺乳動物では、体内時計の中枢である視交叉上核 (SCN) によって制御されている。bHLH 型転写因子である *Bmal1*、*Clock*、*Npas2* は時計遺伝子と呼ばれ、*Bmal1/Clock* または *Bmal1/Npas2* のヘテロ二量体を形成し、*Per*、*Cry*、*RORs*、*Rev-ERBs* 等の遺伝子転写翻訳機構を介してネガティブ、ポジティブフィードバックループを形成し、転写を約 24 時間周期で増減させることで、サーカディアンリズムを形成する (図 1)。*Clock* ノックアウトマウスで、時計遺伝子の発現振動が完全に消失しない (De Bruybe et al., 2006) のは、*Clock* の相同遺伝子である *Npas2* が *Bmal1/Npas2* ヘテロ二量体を介した概日性の遺伝子発現を制御し、*Bmal1/Clock* の機能を補うためだと考えられている。

近年の研究では、時計遺伝子には、サーカディアンリズムの制御以外に、細胞増殖や分化に関わることが報告

されている。骨代謝研究の分野では、*Bmal1* または *Clock* ノックアウトマウスでは骨芽細胞分化阻害に起因する骨量減少 (Xu et al., 2016, Yuan et al., 2017) が報告されている。時計遺伝子はホメオスタシスや基礎生理現象の制御だけではなく、時計遺伝子をターゲットとした治療法 (Chronotherapy) として医療の面からも大きな注目を集めている。

申請者の留学先の UCLA 西村教授の研究グループでは、時計遺伝子 *Npas2* ノックアウトマウスの頭蓋骨に作製した骨欠損部位において野生型と比較して新生骨量が多いことを明らかにした。以上の結果から、*Bmal1/Npas2* ヘテロ二量体は骨芽細胞分化を抑制し、*Npas2* が欠乏すると、*Bmal1/Clock* ヘテロ二量体の働きによって骨芽細胞分化を促進すると仮説を立てた。本研究では、骨芽細胞分化における *Npas2* と *Clock* の機能発現に着目し、*Npas2* が骨芽細胞分化機構に及ぼす影響を解明することとした。

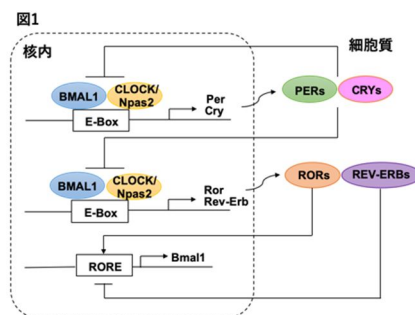
Bmal1/Clock と *Bmal1/Npas2* の補償効果を解明するためには、それぞれの遺伝子の発現上昇や抑制をすることが必要である。申請者の研究グループでは、*Npas2* の発現上昇または抑制をする化合物をドラッグスクリーニングにより、既に特定しており、*Npas2* の発現を薬理的に比較的容易に調節することができる。

2. 研究の目的

以上を背景に、時計遺伝子 *Npas2* がマウス骨髄間質細胞 (BMSC) の骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにすることを本研究の目的とする。

本研究の学術的な特色は、時計遺伝子のサーカディアンリズムを司る働き以外に注目している点である。*Npas2* による、24 時間周期のサーカディアンリズムと直接的な関係性を持たない骨芽細胞分化機構を明らかにすることで、時計遺伝子の生理学的および医学的に重要な多様な機能を明らかにできると考えられる。

本研究の結果、*Npas2* と、その相同遺伝子である *Clock* が BMSC の骨芽細胞分化に及ぼす影響を解明できれば、骨芽細胞分化機序の解明につながる可能性があることから、学術的に非常に重要な先端的研究であると考えられる。

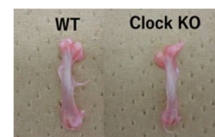


3. 研究の方法

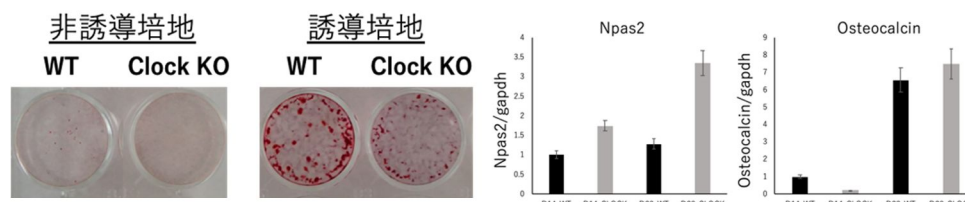
- (1) *Clock* ノックアウト(Clock KO)マウスの大腿骨の特徴を、Wild type(WT)マウスと比較して解析した。
- (2) *Clock* ノックアウトマウス大腿骨から BMSC を採取したのちに骨芽細胞分化誘導し、基質の石灰化(アリザリンレッド染色)、*Npas2* と骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現(real time RT-PCR)を検討した。
- (3) *Npas2* の発現を低下させる化合物を添加した培地中でマウス iPS 細胞の骨芽細胞分化を行い、基質の石灰化(アリザリンレッド染色)、*Npas2* と骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現(real time RT-PCR)を検討した。

4. 研究成果

- (1) WT マウスと *Clock* KO マウスの大腿骨を採取し、大腿骨長と骨質を比較したところ、*Clock* KO マウスの大腿骨の長さが有意に短かった。一方で、骨形態や骨密度に有意差は認めなかった。(右図)

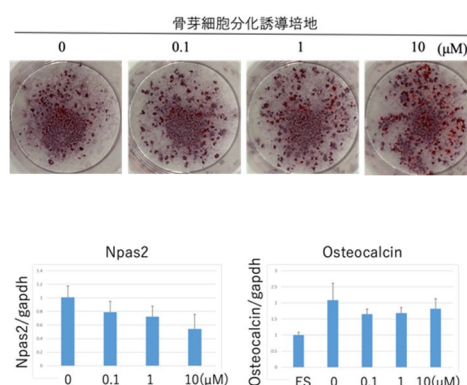


- (2) WT マウスと *Clock* KO マウスの大腿骨から BMSC を採取し、in vitro で骨芽細胞分化を28日間行ない、アリザリンレッド染色を行なったところ、*Clock* KO マウス由来 BMSC の骨芽細胞分化は、WT マウス由来 BMSC と比較して抑制されていることが明らかとなった。一方で、骨芽細胞分化誘導14日目と28日目で *Npas2* の発現と骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現を real time RT-PCR 法で解析したところ、*Npas2* の発現は *Clock* KO マウスの方が WT マウスより促進されたことが明らかとなった。骨芽細胞特異的遺伝子の Osteocalcin は14日目では WT マウスの方が発現が高かったが、28日目では *Clock* KO マウスの方が高かった。



- (3) *Npas2* の発現を低下させる化合物を添加した培地中でマウス iPS 細胞の骨芽細胞分化を28日間行なったのちに、アリザリンレッド染色を行なったところ、化合物の濃度依存的に iPS 細胞の石灰化を促進したことが明らかとなった。

Npas2 と骨芽細胞関連遺伝子の発現を解析したところ、化合物の濃度依存的に iPS 細胞の *Npas2* の発現が抑制されたが、骨芽細胞特異的遺伝子の Osteocalcin の発現に変化はなかった。



以上の結果から、*Npas2* 遺伝子の発現は、BMSC または iPS 細胞の骨芽細胞分化に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、*Npas2* が BMSC または iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす作用機序を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------