

令和 6 年 4 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17104

研究課題名（和文）時計遺伝子に着目したメカニカルストレスによる骨オルガノイド作製方法の開発

研究課題名（英文）Development of Bone Organoid Fabrication Method by Mechanical Stress and Clock Genes

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、機械的刺激によって細胞内の時計遺伝子の発現パターンが変化することを明らかにしており、オルガノイド形成において機械的刺激が時計遺伝子の発現に及ぼす影響に着目している。本研究の目的は、機械的刺激によって骨芽細胞分化誘導過程のiPSC細胞内の時計遺伝子発現リズムが調整され、骨オルガノイド形成に及ぼす影響を明らかにすることである。その結果、浮遊培養が、EBの概日リズムと骨形成分化を減弱させることを示唆している。本研究は、骨分化の初期段階におけるEBの概日リズムを維持するための接着条件の重要性を示し、したがって、iPSCを用いた骨オルガノイド作製を最適化するための戦略を提供するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2017年にサーカディアンリズムを生み出す時計遺伝子の発見についてノーベル生理学医学賞が授与され、現在非常に注目が集まっている研究領域である。本研究は、バイオエンジニアリングの観点から、骨オルガノイド形成に必要な機械的刺激が時計遺伝子に及ぼす影響を解析することで、オルガノイド作製方法の確立を目指す、新しい試みである。本研究成果によって、時計遺伝子の発現リズムを調整する外的環境要因やバイオマテリアルの開発に繋がり、新しい骨再生医療の発展に貢献できると思われる。

研究成果の概要（英文）：iPSCs differentiate into a variety of cell types, which are potentially promising for regenerative medicine and drug discovery. Non-adherent floating culture is useful for iPSC embryoid bodies (iPSC-EBs) to fabricate three-dimensional (3D) bone-like tissue constructs, i. e. organoids. Although the clock genes, which govern circadian rhythms, are known to affect osteogenic differentiation of stem cells, effects of adherent/non-adherent condition on circadian rhythm remains unknown. The aim of this study was to investigate the involvement of adherent/non-adherent condition on circadian rhythms during osteogenic differentiation of iPSC-EBs. This study suggested that the floating culture attenuates circadian rhythms and osteogenic differentiation of iPSC-EBs. This study demonstrated importance of adherent condition to maintain circadian rhythms of iPSC-EBs at the initial stage of osteogenic differentiation, would provide strategies for optimizing iPSC-based bone organoid fabrication.

研究分野：補綴歯科学

キーワード：時計遺伝子 iPSC細胞

1. 研究開始当初の背景

広範囲の顎骨欠損を生じた症例において、補綴装置を支える骨組織を再生する技術の開発が重要な課題となる。iPS 細胞から骨オルガノイドを作製し再生治療に用いる技術の確立が期待されているが、オルガノイド作製過程で iPS 細胞に与える機械的刺激などの培養条件をさらに検討し、生体に近いオルガノイドを作製する必要がある。サーカディアンリズムは、時計遺伝子群がフィードバックループを形成することによって形成される生体リズムである。これまでに、未分化 iPS 細胞から分化誘導を行う過程で、時計遺伝子の発現が一定のリズムを形成することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、機械的刺激によって細胞内の時計遺伝子の発現パターンが変化することを明らかにしており、オルガノイド形成において機械的刺激が時計遺伝子の発現に及ぼす影響に着目した。本研究の目的は、機械的刺激によって骨芽細胞分化誘導過程の iPS 細胞内の時計遺伝子発現リズムが調整され、骨オルガノイド形成に及ぼす影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 接着培養での骨芽細胞分化誘導下における iPS 細胞の時計遺伝子発現パターンの解析

マウス iPS 細胞から胚様体(EB)作製後、プラスチック培養プレート上に播種し、骨芽細胞分化誘導培地中にて接着培養を行う。骨芽細胞分化誘導 0、10、20、30 日目に、0.1 μ M Dexamethasone を添加して各 EB の時計遺伝子の発現をシンクロナイズしてから、6 時間おきに 48 時間 RNA を回収する。回収した RNA から cDNA を作製し、real time RT-PCR にて時計遺伝子ならびに骨芽細胞関連遺伝子の発現リズムを解析する。石灰化の評価には、アリザリンレッド染色を用いる。

(2) 振盪培養による機械的刺激が iPS 細胞由来骨オルガノイド形成過程で時計遺伝子発現パターンに及ぼす影響

EB 作製後に、フラスコ内で骨芽細胞分化誘導培地中にて浮遊・振盪培養を行う。振盪スピードは 0.2・0.3・0.5 Hz の条件で行う。培養 10、20、30 日目に同様の手順でシンクロナイズ後、6 時間おきに 48 時間 RNA を回収する。回収した RNA から cDNA を作製し、real time RT-PCR にて時計遺伝子ならびに骨芽細胞関連遺伝子の発現リズムを解析する。石灰化の評価には、アリザリンレッド染色を用いる。(1) で解析した接着培養下での時計遺伝子発現パターンとも比較する。

(3) iPS 細胞由来骨オルガノイド形成過程における接着培養と振盪培養における網羅的遺伝子解析

EB 作製後に、フラスコ内で骨芽細胞分化誘導培地中にて浮遊・振盪培養を行う。振盪スピードは 0.3 Hz の条件で行う。培養 2 日目に同様の手順でシンクロナイズ後、RNA を回収し、RNA シークエンス解析を行う。

4 . 研究成果

(1) 接着培養での骨芽細胞分化誘導下における iPS 細胞の時計遺伝子発現パターンの解析

培養初期では、接着培養を行なった EB は、震盪培養を行った群と比較して、骨芽細胞特異的マーカー遺伝子 (runx2、ocn、col1a1) の発現が有意に高く、時計遺伝子 (clock、Npas2、Bmal1) の発現はより顕著な振動パターンを示した。一方で、培養後期では、震盪培養を行なった群は接着培養と比べ、芽細胞特異的マーカー遺伝子の発現が有意に上昇し、組織学的解析では、EB の中心部に高度な石灰化を認めた。

(2) 振盪培養による機械的刺激が iPS 細胞由来骨オルガノイド形成過程で時計遺伝子発現パターンに及ぼす影響

EB の振盪培養の震盪スピードを 0.2・0.3・0.5 Hz のスピードで変化させて時計遺伝子の発現リズムを解析したところ、震盪スピード間に有意差を認めなかった。この結果から、最も骨芽細胞分化を促進した 0.3 Hz の震盪スピードを以降の実験に使用することとした。

(3) iPS 細胞由来骨オルガノイド形成過程における接着培養と振盪培養における網羅的遺伝子解析

RNA シークエンス解析を用いて、接着培養と浮遊培養間の発現を比較したところ、KEGG および Homer 解析により、浮遊培養では TEAD4 が有意に発現し、Hippo-YAP 経路の活性化が確認された。

YAP-TEAD 相互作用阻害剤 (verteporfin) を浮遊培養の EB に添加すると、減弱していた時計遺伝子の発現リズムが有意に回復し、骨芽細胞特異的遺伝子形成の発現が有意に増加した。

以上の結果から、浮遊培養が、TEAD4 を介した YAP/TAZ シグナル伝達経路の活性化を通じて、EB の概日リズムと骨形成分化を減弱させることが示唆された。本研究は、骨分化の初期段階における EB の概日リズムを維持するための接着条件の重要性を示し、iPS 細胞を用いた骨オルガノイド作製方法を最適化することに貢献できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yunyu Fu, Hiroko Okawa, Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Floating culture attenuates circadian rhythms during osteogenic differentiation of iPSCs
3. 学会等名 The 71st Annual meeting of JADR (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------