

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893143

研究課題名(和文) Id2欠損マウス由来iPS細胞を用いた骨芽細胞分化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of osteoblast differentiation mechanism using a Id2-deficient mice derived from iPS cells

研究代表者

裏口 真也 (Uraguchi, Shinya)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80737528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Id2ノックアウトマウスから樹立したiPS細胞を用いて骨芽細胞への分化誘導モデルを作製し、BMP誘導性の骨芽細胞分化におけるId2の役割を明らかにすること、ならびにId2に關与する分子を標的とすることによりBMPの機能を向上する技術を作製するための研究基盤を確立することを目的とし、Id2<sup>-/-</sup>およびId2<sup>+/+</sup>マウスより歯肉線維芽細胞を分離培養し骨芽細胞分化を比較検討した結果、Id2<sup>+/-</sup>iPS細胞は有意に骨芽細胞特異的遺伝子の発現を亢進した。今後、Id2に關与するこれらの分子を標的とすることでBMPの機能を向上する技術につなげていきたいと考える。

研究成果の概要(英文)：iPS cells are expected to be useful for alveolar bone augmentation/regeneration in dental implant and prothodontic treatment; however the mechanisms of iPS cell osteogenesis remain unclear. The objective is to investigate the role of Id2 in iPS cell osteogenesis by establishing Id2-deficient model iPS cells. The induction of iPS cells from gingival fibroblasts of Id2<sup>-/-</sup> or Id2<sup>+/+</sup> mice was performed by retroviral transduction. iPS cells induced osteogenic differentiation and analyzed by ALP staining etc. The Id2<sup>-/-</sup>iPS cells showed higher osteogenic gene expression than Id2<sup>+/-</sup>iPS cells. We established an osteogenesis model with Id2-deficient iPS cells, which demonstrated enhanced osteogenic differentiation and represent an important step toward the further analysis of novel mechanisms underlying iPS cell osteogenesis.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：iPS細胞 骨芽細胞分化 Id2

1. 研究開始当初の背景

骨形成蛋白質(BMP)はインプラント治療における確実な歯槽骨増生を可能にする薬剤として期待されているが、高価ゆえに、低容量で高い効果を発揮させる新たな技術が求められている。これを達成するためには、BMP-2による骨再生促進作用の分子機構の全容を解明することが重要な課題となる。BMP-2の骨増生促進効果は、細胞レベルでは骨芽細胞の前駆細胞や間葉系幹細胞におけるBMPシグナル伝達の結果であると考えられている。BMPは細胞のBMP受容体に結合するとRunx2等の骨芽細胞分化を制御する標的遺伝子に作用することが明らかとされてきた。

近年、BMPの標的遺伝子の一つにinhibitor of DNA binding/differentiation(Id)-2があることが報告され、Id2はbasic helix-loop-helix型転写因子の機能抑制因子であり、basic helix-loop-helix型転写因子とE proteinが機能的な二量体の形成を阻害することで組織特異的遺伝子の発現を負に制御する。Id2は幹細胞の”stemness”の維持に関与し、間葉系幹細胞のBMP誘導性骨芽細胞分化を調節していることが示唆されているが、骨芽細胞分化におけるId2の詳細な役割は未だ明らかとなっていない。

ノックアウトマウス(遺伝子欠損マウス)は、標的の遺伝子の欠失によって特徴的な表現型を示すため、人間の疾病を引き起こす標的遺伝子の詳細な機能解析を可能にする。しかしながら、Id2<sup>-/-</sup>マウスは、出生後の早期死亡率が高いことから、組織幹細胞の安定した供給源として用いることは困難である。近年、皮膚などの体細胞に数個の遺伝子を導入することで細胞の記憶を初期化し、人工多能性幹細胞(iPS細胞)を作製する技術が報告された。分化万能性をもつiPS細胞は、試験管内で発生・分化機構を探索する研究ツールとしても期待されている。また、iPS細胞は骨芽細胞へ分化することが可能であり、これまでにiPS細胞から分化誘導した骨芽細胞が、生体内で骨組織再生に付与することが報告された。

2. 研究の目的

Id2<sup>-/-</sup>マウスから樹立したiPS細胞を用いて骨芽細胞への分化誘導モデルを作製し、BMP誘導性の骨芽細胞分化におけるId2の役割を明らかにするとともに、Id2に関与する分子を標的としてBMPの機能を向上する技術を作製することを目的とした。

(1) Id2<sup>-/-</sup>およびId2<sup>+/+</sup>マウスより歯肉線維芽細胞を分離培養し、それぞれの細胞に山中初期化因子を遺伝子導入し得られたiPS細胞を用いて分化過程を検討する。

(2) 作製した骨芽細胞分化誘導モデルを用いてId2<sup>-/-</sup>およびId2<sup>+/+</sup>-iPS細胞の骨芽細胞分化過程を比較検討する。

(3) Id2<sup>-/-</sup>およびId2<sup>+/+</sup>-iPS細胞にBMP-2を添加してそれぞれの細胞も用いて骨芽細胞分化過程を比較検討した。

3. 研究の方法

(1) Id2遺伝子欠失細胞から作製したiPS細胞を骨芽細胞分化誘導を行いvon Kossa染色、RT-PCR解析、Arizalin red S染色、透過型電子顕微鏡観察および電子線回折解析を用いて、基質の石灰化を評価した。

(2) Id2<sup>-/-</sup>-iPS細胞の骨芽細胞分化においてId2遺伝子が発現していないことをリアルタイムRT-PCR解析を用い、Id2<sup>-/-</sup>およびId2<sup>+/+</sup>-iPS細胞の骨芽細胞分化の相違をリアルタイムRT-PCR解析を用いて比較検討した。

(3) Id2<sup>+/+</sup>-iPS細胞にBMP-2(100 ng/ml)を添加しBMP-2が骨芽細胞分化を促進することをリアルタイムRT-PCR解析を用い、Id2<sup>-/-</sup>およびId2<sup>+/+</sup>-iPS細胞の骨芽細胞分化の相違をリアルタイムRT-PCR解析を用いて比較検討した。

4. 研究成果

(1) 山中初期化因子を遺伝子導入し得られたiPS細胞を用いて分化過程を検討

骨芽細胞分化誘導培地を用いた分化誘導によって、iPS細胞は、28日後にvon Kossa染色を行い細胞外基質の石灰化を示した。(図1)また、RT-PCR解析の結果、Collagen 1a2, Runx2, Osterix, BSP, Osteocalcin, Osteopontinの発現を更新した。(図2)骨芽細胞分化培地で10日あるいは30日培養したId2<sup>-/-</sup>およびId2<sup>+/+</sup>-iPS細胞株を透過型電子顕微鏡解析を用いた結果ハイドロキシアパタイト結晶の検出を確認した。(図3)さらに骨芽細胞分化誘導培地を用いて28日後にArizalin red S染色の結果、Id2<sup>-/-</sup>-iPS細胞は有意に高い結果を示した。(図4)

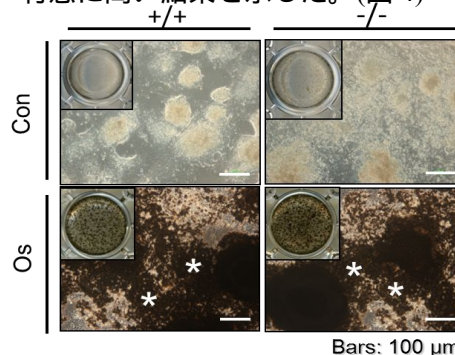


図1 Id2<sup>-/-</sup>およびId2<sup>+/+</sup>-iPS細胞の細胞外基質の石灰化

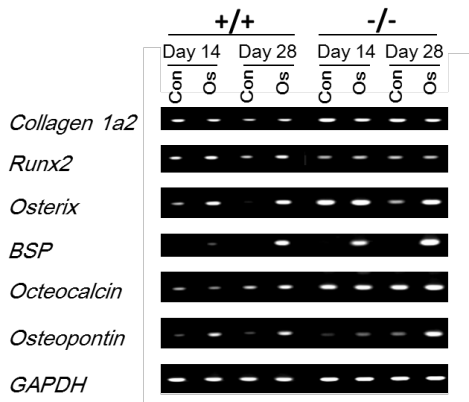


図 2 骨芽細胞特異的遺伝子の発現 (RT-PCR 解析)

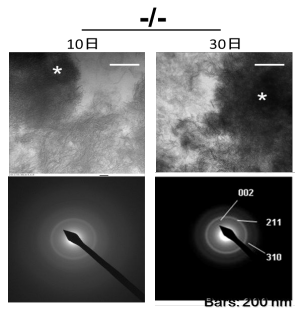


図 3 電子線回折解析における電子線回折リングパターンとハイドロキシアパタイト結晶構造の確認

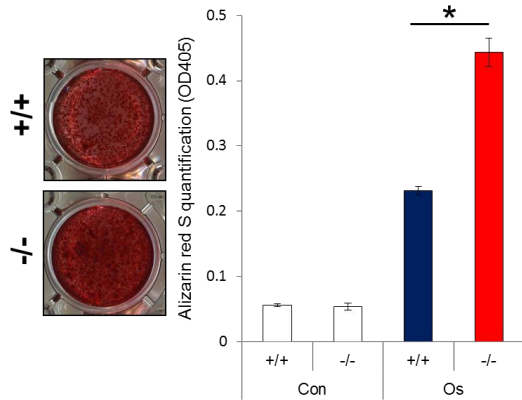


図 4 Alizarin red S 染色の結果  $Id2^{-/-}$  は  $Id2^{+/+}$ -iPS 細胞と比較して有意に発現の上昇を認めた。

(2)  $Id2$  が骨芽細胞分化にどのように影響があるかをリアルタイム RT-PCR 解析を用いて検討を行った。まず  $Id2^{+/+}$ -iPS 細胞では  $Id2$  遺伝子が経時的に発現の上昇を示し  $Id2^{-/-}$ -iPS 細胞において  $Id2$  遺伝子が発現していないことを確認した (図 5) また骨芽細胞特異的遺伝子の発現においては  $Id2^{-/-}$ -iPS 細胞は  $Id2^{+/+}$ -iPS 細胞と比較して Runx2 では発現の減少を認め、その他の骨芽細胞特異的遺伝子 (Msx2, Collagen 1a1, Osteocalcin) においてはそれぞれ発現の上昇を認めた。(図 6)

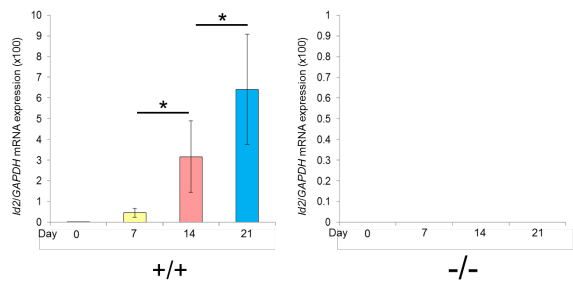


図 5  $Id2^{-/-}$  および  $Id2^{+/+}$ -iPS 細胞における  $Id2$  発現

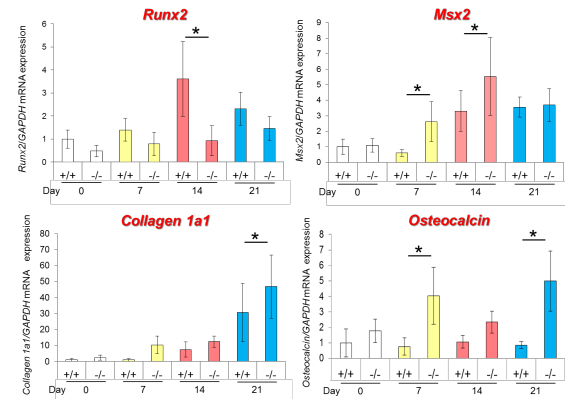


図 6 骨芽細胞特異的転写因子および骨芽細胞特異的遺伝子の発現

(3) (2)と同様に骨芽細胞分化させた iPS 細胞に BMP-2 を添加し  $Id2$  遺伝子の発現は有意に上昇した。(図 7) また、BMP-2 を添加し  $Id2$  が骨芽細胞分化にどのように影響があるかをリアルタイム RT-PCR 解析を用いて検討を行った。(図 8)

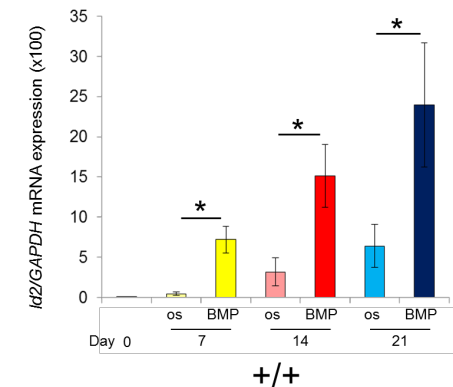


図 7 BMP-2 誘導性骨芽細胞分化における  $Id2^{+/+}$ -iPS 細胞の  $Id2$  の発現

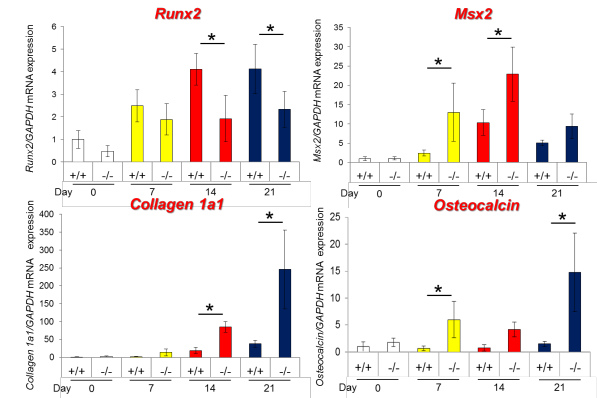


図 8 BMP-2 誘導性骨芽細胞分化における  $Id2^{-/-}$  および  $Id2^{+/+}$ -iPS 細胞の骨芽細胞特異的転写因子および骨芽細胞特異的遺伝子の発現

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

公益社団法人日本補綴歯科学会 創立 80 周年記念 第 122 回学術大会(2015. 5.18-19, 福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

裏口真也(URAGUCHI SHINYA)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号: 80737528