

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792438

研究課題名(和文) ES/iPS細胞へのMsx2遺伝子導入後の骨芽細胞への分化・機能活性に関する研究

研究課題名(英文) A study of osteoblast differentiation and activation in Msx2 gene-transfer ES/iPS cells.

研究代表者

山本 芳丈 (Yamamoto, Yoshitake)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50380465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：歯科矯正治療において不可欠である骨組織のリモデリングや再生を担う骨芽細胞の分化制御機構に関与すると考えられているMsx2遺伝子の役割については、これまで殆んど明らかにされていない。そこで、本研究ではマウスES細胞とiPS細胞を用いて、骨芽細胞への分化や機能活性におけるMsx2の役割について検討を行った。Msx2を導入したES細胞及びiPS細胞とフィーダー細胞を共存培養し、その分化能や機能について検討するために分化関連遺伝子のmRNA発現やALP活性、さらに石灰化能等について調べた。結果より、ES細胞やiPS細胞から分化した骨芽細胞に対して、重要な役割を担うものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：There have been no clear reports so far that Msx2 gene take part in the mechanism of osteoblast differentiation, which is responsible for the bone remodeling and regeneration in orthodontic treatments. The purpose of this study, therefore, was to investigate the roles of Msx2 in osteoblast differentiation and osteogenesis with mouse Embryonic Stem (ES) cells and Induced Pluripotent Stem (iPS) cells. ES cells and iPS cells which transfected with Msx2 gene were cocultured with feeder cells, and mRNA levels of osteoblastic phenotype and alkaline phosphatase activity were determined for cell differentiation and activation. The value of bone nodules was also determined for mineralization. As a result, it was suggested that Msx2 play a key role in controlling osteoblast differentiation from ES/iPS cells.

研究分野：骨代謝

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：骨芽細胞 細胞分化

## 1. 研究開始当初の背景

骨構成細胞における骨細胞・骨芽細胞・軟骨細胞・破骨細胞、その中でも骨の形成と吸収を担う骨芽細胞と破骨細胞の相互作用による骨免疫において、両者のバランスが崩れると様々な骨代謝疾患を引き起こすことから、これらの細胞が治療の標的として注目され、骨研究の中でも重要な位置を占めていると考えられている。

歯科矯正治療においても重要とされるこの骨免疫反応には生体内における微小環境下において分化増殖する免疫系細胞のサイトカイン産生や細胞膜上の分子を介した骨格系細胞の分化や機能制御といった関与により影響を受けていると考えられる。このため生体防御に伴う免疫応答や自己免疫疾患による免疫系の異常な活性化は、骨代謝に直接影響を及ぼすことから骨代謝制御における重要性が認識されるようになってきている。移動させることを治療ゴールとする歯の歯根周囲骨組織にリモデリングが生じ、歯の移動が引き起こされる歯科矯正治療において、分子レベルでの免疫系による骨代謝制御機構のメカニズムの解明が期待されている。そのため、骨吸収を担う破骨細胞の分化制御には、骨芽細胞が密接に関わっており、骨吸収促進因子による破骨細胞の活性や破骨細胞分化抑制因子による分化制御については、骨芽細胞を介して行われていることより、歯の移動における骨のリモデリングにおいても骨芽細胞の骨形成能と破骨細胞誘導能に注目する必要がある。

## 2. 研究の目的

骨芽細胞は未分化な間葉系幹細胞から前骨芽細胞を経て、成熟骨芽細胞、そして骨細胞に至る細胞分化過程において、骨芽細胞分化のマスター転写因子 Runt related transcription factor 2 の他に様々な転写因子により、その細胞分化が制御されていると考えられているが、その詳細な機能や相互作用、また生理的な意義などについては未だ殆んど解明されていない。

骨芽細胞の細胞分化における多くの転写因子のうちの一つと考えられている Msh homeobox 2 は、DNA 結合タンパクであり、その標的遺伝子及び下流遺伝子についてはこれまで不明であったが、近年ノックアウトマウスを用いた研究により、個体レベルでの機能が明らかにされつつあり、骨形成における骨化の過程に障害が認められている。また、骨芽細胞の分化に重要な因子の発現が骨軟骨組織で低下していたことにより、Msh homeobox 2 は骨芽細胞の分化に関与するのではないかと考えられている。しかしながら、

骨芽細胞の骨形成機能における分子機構や分化制御機構に対して、どのような関与がなされているのかについては未だ不明な点が多く、Msh homeobox 2 に関して、その役割の解釈には様々な考えが存在する。

そこで本研究では、多能性幹細胞株であるマウス胚性幹細胞 (Embryonic Stem) 細胞およびマウス人工多能性幹細胞 (Induced Pluripotent Stem) 細胞の2種類の性質の異なる細胞を用いて、成熟な骨芽細胞への分化過程および骨形成能に対する Msh homeobox 2 遺伝子のその役割について検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

マウスの細胞培養実験系において、目的遺伝子のトランスフェクションを行っていないノーマルのマウス Embryonic Stem 細胞または、Induced Pluripotent Stem 細胞を各細胞それぞれマウスのフィーダー細胞と共に共存培養を行い、まず始めの実験段階として実験系全体のコントロールとしてのマウス Embryonic Stem 細胞培養系およびマウス Induced Pluripotent Stem 細胞培養系をそれぞれ樹立させ、この各培養系に骨芽細胞への分化誘導因子を加えることで、骨芽細胞への細胞分化を誘導することとした。

次に、緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識した Msh homeobox 2 遺伝子をトランスフェクションしたマウス Embryonic Stem 細胞とフィーダー細胞とを培養プレート上で共存培養し、その後増殖したマウス Embryonic Stem 細胞を分離して作製した Embryoid Body (EB) の細胞凝集塊に細胞分化誘導因子を加え、35 日間の培養を行った。また、マウス Induced Pluripotent Stem 細胞についても、同様の培養方法・条件にて細胞培養を行った。その中でも特に、Induced Pluripotent Stem 細胞については、Induced Pluripotent Stem 作製段階において導入転写因子数のそれぞれ異なる 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) と 3 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4) の 2 種類の細胞を用いた。

培養期間中の 0, 7, 21, 35 日後に培養細胞をそれぞれ採取し、骨芽細胞への分化能について検討するため、RT-PCR 法を用いた分析のために細胞より Total mRNA を抽出した。抽出した mRNA より、Msh homeobox 2 を含む骨芽細胞関連因子 (Runt related transcription factor 2、type collagen, osteopontin, osteocalcin など) の mRNA 発現の比較検討を行った。その際、比較基準としてのコントロールとして Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現を用いることとした。さらに、骨芽細胞

胞分化マーカーとしてアルカリフォスファターゼ (ALP) の染色を行うことにより、その活性について解析する目的で各培養期間中にそれぞれの細胞グループを細胞培養プレート上にて固定した。また、この培養系では培養 35 日後の最終日にも細胞を固定し、骨芽細胞の石灰化能について検討するため、細胞培養プレート上に形成された骨様の石灰化ノジュール (凝集塊) を Von Kossa 法を用いて染色し、その石灰化した表面積や形成された数についての画像解析について画像解析用イメージアナライザーソフトを用いて行った。

#### 4. 研究成果

遺伝子のトランスフェクションを行っていないノーマルのマウス Embryonic Stem 細胞およびマウス Induced Pluripotent Stem 細胞のみをそれぞれ単独で培養した結果、それぞれの異なる細胞培養系に骨芽細胞への分化誘導因子を加えても、殆んど骨様の石灰化物を形成するまでには至らなかった。

そこで、まずそれぞれの細胞グループをマウスのフィーダー細胞と一緒に培養プレート上で共存培養を行い、その後それぞれ分離した Embryonic Stem 細胞もしくは Induced Pluripotent Stem 細胞を用いて、Embryoid Body を新たに作製し、そこへ骨芽細胞分化誘導因子を培養上清中に添加したところ、多くの骨様石灰化物を形成するまでには至らなかったが、少なくとも骨形成能を有する細胞集団へと分化させることができたことを確認し、骨芽細胞への分化を誘導することに成功した。これにより、この後の研究ではこれらの培養系をそれぞれ基礎的な実験系として用いることで、実験を進めていくこととした。

さらにこの実験系において、マウス Embryonic Stem 細胞および Induced Pluripotent Stem 細胞それぞれに非ウィルスベクター法であるリポフェクション法による化学的手法を用いて Msh homeobox 2 遺伝子のトランスフェクションを行った。遺伝子の導入効率については生物学的手法であるウィルスベクター法にはやや劣るが、マウス Embryonic Stem 細胞および Induced Pluripotent Stem 細胞それぞれに遺伝子が導入されたことを確認 (GFP 陽性を顕微鏡にて確認) した上で、ノーマルなもの (ネガティブコントロール) と同様に骨芽細胞への細胞分化誘導実験を行った。その結果、Msh homeobox 2 遺伝子のトランスフェクションを行った細胞群では、培養最終日において形成された骨様石灰化ノジュールの表面積が増大し、骨形成能力が促進されたと考えられた。また、アルカリフォスファターゼ (ALP) の強い陽性細胞の分布にも変化が認められ

た。つまり、ノーマルなマウス Embryonic Stem 細胞および Induced Pluripotent Stem 細胞では、培養プレート上の細胞集団において全体的に弱い活性化が認められたが、遺伝子のトランスフェクションを行なったマウス Embryonic Stem 細胞および Induced Pluripotent Stem 細胞では、細胞が凝集した周辺において特に強い活性化が認められた。また、それぞれの細胞の分化に対する影響について分析するために調べた骨芽細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現についても、RT-PCR の結果として、骨芽細胞への細胞分化を促進させる傾向を示す発現パターンが確認された。これらのことより、骨芽細胞の細胞分化過程において、最も重要な転写因子 Runt related transcription factor 2 ほどの大きな影響力は認められなかったものの、これらの発現に相互的な促進的関与をすることで、結果として骨芽細胞への細胞分化や細胞の持つ機能活性を制御していることが推察された。したがって、結論として Msh homeobox 2 は骨芽細胞への分化制御過程および骨形成において、他の因子と相互作用し、促進的に影響を及ぼしうる因子として働いている可能性が示唆された。

今後の展望としては、マウス胚性幹細胞とマウス人工多能性幹細胞を用いてこれまで行ってきた手法と同様に、さらに発展的な研究としてヒトの Embryonic Stem 細胞、あるいはヒトの Induced Pluripotent Stem 細胞を用いた同様な検証を行い、より実践的な臨床への応用を今後検討していく予定である。それと併用する実験系として、今回用いた培養系にメカニカルストレスや磁場刺激等を与え、その刺激の応答に対する Msh homeobox 2 の発現や変化などについてもこれまでに検討を進めている。メカニカルストレスは、細胞培養プレートに圧力や遠心力を負荷することにより、また磁場刺激は高い磁束密度を発生させる磁場を与えることで生じさせており、特にこれらの刺激は負荷するタイミングが重要となると予測されるので、いくつかの負荷の組み合わせにより、その反応を確かめる予定である。また一方で、In vitro での研究のみにとどまらず、In vivo での研究も重要であると考えられるので、In vivo におけるマウスやラットを用いた歯牙の移動動物実験モデルにおける Msh homeobox 2 の発現変化および骨関連因子との関係性を明らかにするための HE 染色や免疫染色等を用いたそれぞれの関連性について、随時解析を行なっていく予定である。またその際、骨芽細胞とともに重要な破骨細胞との相互作用に関して、骨のリモデリング時にどのような役割・相互作用を有するのかについても検討を行うため、破骨細胞の分化や局在あるいは骨吸収といった起こりうる機能的な変化などについても今後分析を行なっていく予定にしている。

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)

山本芳丈(代表者)、三井薫、小賤健一郎、  
宮脇正一

Effects of Msx2 gene on osteogenesis in osteoblasts differentiated from ES/iPS cells

日本矯正歯科学会学術大会、2013年10月9日 長野

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 芳丈 (YAMAMOTO YOSHITAKE)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：50380465

(2)研究分担者

該当者なし

(3)連携研究者

該当者なし

(4)研究協力者

三井 薫 (MITSUI KAORU)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師  
研究者番号：40324975

小賤 健一郎 (KOSAI KEN-ICHIRO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：90301663