

## 学内グラント 報告書

## 平成25年度 学内グラント終了時報告書

丸木記念特別賞受賞

生体ネットワークの調和を目指す再生医療に向けた  
神経および骨再生を担う分子の探索

研究代表者 佐藤 毅 (大学病院 歯科・口腔外科)

研究分担者 松本 征仁<sup>1)</sup>, 榎木 祐一郎<sup>2)</sup>, 千田 大<sup>2)</sup>

## 緒言

顎顔面領域における腫瘍・炎症・骨折などによる骨欠損・変形に対する治療法としては再生医療が最も期待される。しかしながら、形態・機能を回復するのが困難な場合も少なくなく、たとえば顔面骨の大部分が欠損すると審美性や咀嚼機能の低下、さらには感覚神経麻痺が引き起こされる。とりわけ下顎骨は骨内部を太い知覚神経・血管が伴走するという特徴を持ち、単なる骨組織の再生をするだけでは機能の回復は極めて困難といえる。生体には各臓器間のネットワークシステムが存在し、内分泌系(血管系)・神経系がそれを担っており、生体反応を制御している。近年の研究から、骨組織はさまざまな臓器により制御されていることが明らかとなりつつあり<sup>1)</sup>、生体ネットワークの中でいかに骨を再生させるかを考えなければならない。血管-神経ネットワークは、このシステムを構築する重要な概念であり、血管-神経ネットワークの解明は生体の有機的応答を理解するために必要である。近年の再生医療では1つの器官の再生を目指す研究が主であるが、生体では1つの器官が独立して存在するわけではなく、器官を支配する血管・神経系のネットワークも考慮しなければならず、臓器と血管そして臓器と神経の相互作用の理解も必要である。われわれはこれまでに神経系による骨代謝の制御機構について解析を行ってきた。神経伝達物質であるアセチルコリンが骨芽細胞に作用して増殖を促進し分化を抑制することを見出し<sup>2)</sup>、骨のみならず様々な臓器においてアセチルコリンが細胞間ネットワークシグナルとしての役割を担っていることを提唱してきた<sup>3)</sup>。最近、われわれは感覚神経が海綿骨にまで及び、感覚神経由来のsemaphorin 3Aが骨代謝を制御

するという骨代謝の新たな調節機構を発見した<sup>4)</sup>。

本研究では、神経細胞と骨芽細胞との相互作用を解明することを目指した。神経細胞は骨膜において神経突起を介して骨芽細胞と接触していると考えられ、神経細胞と骨芽細胞との接触による双方の細胞への生理応答に関する影響を検討する必要がある。そこで、神経細胞と骨芽細胞の接触型あるいは非接触型共存培養系における、骨芽細胞および神経細胞の分化への影響を調べるとともに、これらを制御する因子の探索を目的として本研究を行った。

## 材料と方法

## 1. 細胞培養

細胞株として神経細胞に分化する能力を有するラット褐色細胞腫細胞株PC12およびマウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1を、培地として5% fetal bovine serum (FBS), 10% horse serum, 1% penicillin/streptomycin (P/S) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) 培地を用いた。37°C・CO<sub>2</sub>濃度5%にて培養し、2日おきに継代した。

## 2. 共存培養法

非接触型培養法では、MC3T3-E1をTranswell Permeable Supports (24 well) 0.4 μm polyester (Corning)のwell (growth area, 1.9 cm<sup>2</sup>)に3 × 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>で播種し、PC12をinsert membrane (growth area, 0.33 cm<sup>2</sup>)に3 × 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>で播種した。接触型培養法では、24 well plate (Corning)あるいは8 well chamber slide (BD Falcon)にMC3T3-E1およびPC12をそれぞれ3 × 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>で播種した。

## 3. 石灰化アッセイ

24 well plateで接触型共存培養あるいは非接触型培養を行った。培養19日目で、氷冷した70%エタノールにて固定し、洗浄後にAlizarin red 染色液で染色を行った<sup>5)</sup>。

1) ゲノム医学研究センター ゲノム科学部門

2) 大学病院 歯科・口腔外科

#### 4. 免疫染色

8 well chamber slideで接触型共存培養を行った。培養3日後、4% paraformaldehydeにて固定し、anti-connexin43抗体 (Cell Signal) および anti-neurofilament-L抗体 (Cell Signal) を用いて免疫染色を行った。2次抗体としてAlexa Fluor488 goat anti-mouse IgG (Life Technologies) およびAlexa Fluor568 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies) を用いた。Vectashield (Vector)にて封入し蛍光顕微鏡で観察した。

#### 5. リアルタイムPCR

細胞を回収後、ISOGEN (ニッポンジーン)にて全RNAを抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies) を用いてcDNA合成を行った。TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) を使用し、TaqMan プライマーとしてALP (Mm01187113\_g1), *Osteocalcin* (Mm03413826\_mH), *GAPDH* (Mm03302249\_g1) を用いて、Applied Biosystems Prism 7900HT Sequence Detection System (Life Technologies) で検出した。遺伝子発現はGAPDHに対する相対値を計算した。

#### 6. DNAマイクロアレイ

接触型共存培養後0時間、24時間および72時間で

細胞を回収してISOGENにて全RNAを抽出し、Amino Allyl MessageAMP II aRNA Amplification Kit (Life Technologies)にてCy3あるいはCy5で標識した。マイクロアレイは3D Gene Mouse Oligo Chip 24K (TORAY) および3D Gene Rat Oligo Chip 24K (TORAY)を用いた。ハイブリダイゼーション・シグナルのスキューンはScanArray Express Scanner (PerkinElmer)にて行い、GeneSpringGX11.5 (Molecular Devices)にて解析した。各遺伝子の検出シグナルはグローバルノーマライゼーション法により標準化した。

#### 結果

##### 1. 神経系細胞と骨芽細胞の接触型共存培養にて骨芽細胞分化が促進される

PC12とMC3T3-E1を接触型共存培養させたところ、19日目で石灰化が促進された(図1)。一方でPC12をTranswellメンブレンに播種し、MC3T3-E1をプレートに播種し、非接触型共存培養を19日間行ったところMC3T3-E1の石灰化は促進されなかった(図1)。次に接触型共存培養にて3日間培養してRNAを採取し、骨芽細胞分化マーカーの発現を調べたところ、ALPおよびOsteocalcin遺伝子の発現が上昇していた(図2)。

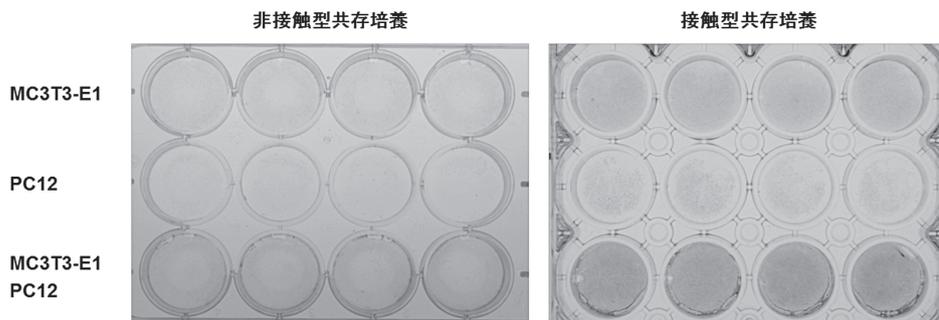


図1.

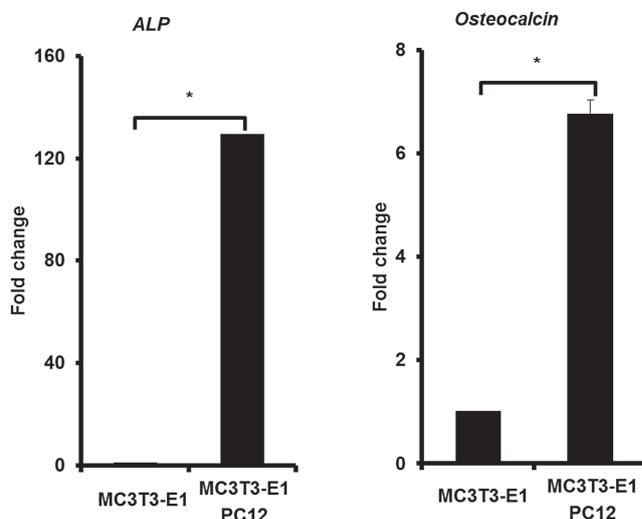


図2.

**2. 神経系細胞と骨芽細胞の接触型培養にて神経分化が促進される**

PC12とMC3T3-E1を接触型共存培養させ、3日間培養したところ、神経分化マーカーであるneurofilament Lの発現が上昇していた(図3)。

**3. 神経系細胞と骨芽細胞の接触型共存培養における遺伝子発現の網羅的解析**

共存培養後0時間から24時間で発現が2倍以上上昇し、72時間後も発現が維持または上昇

するマウス遺伝子群が1058遺伝子、0時間から24時間で発現が0.5倍以下に低下し、72時間後もさらに発現が低下するマウス遺伝子群が390遺伝子であった(図4)。一方、0時間から24時間で発現が2倍以上上昇し、72時間後も発現が維持または上昇するラット遺伝子群が200遺伝子、0時間から24時間で発現が0.5倍以下に低下し、72時間後もさらに発現が低下するラット遺伝子群が3遺伝子であった(図5)。

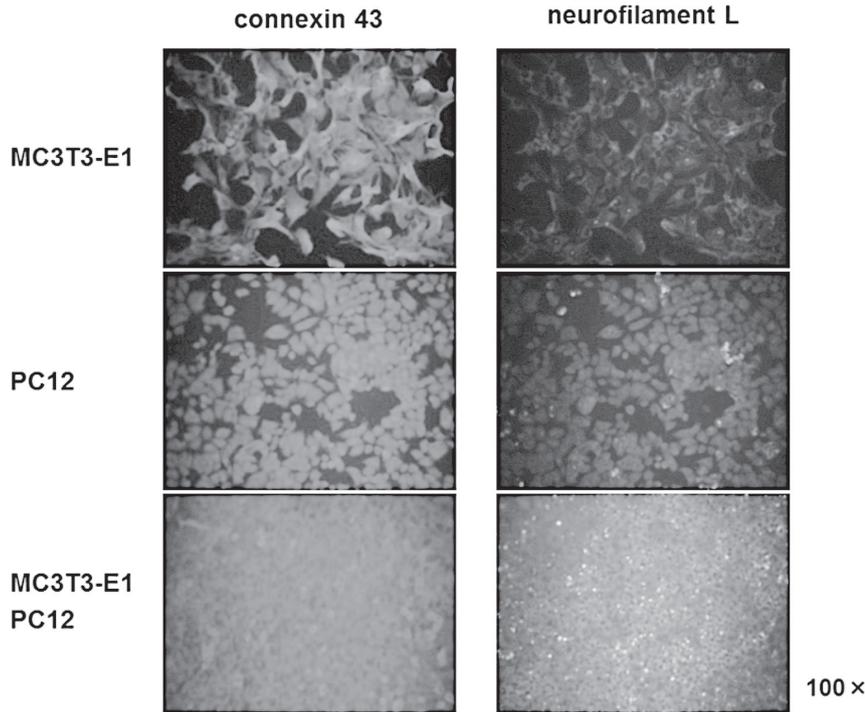


図 3.

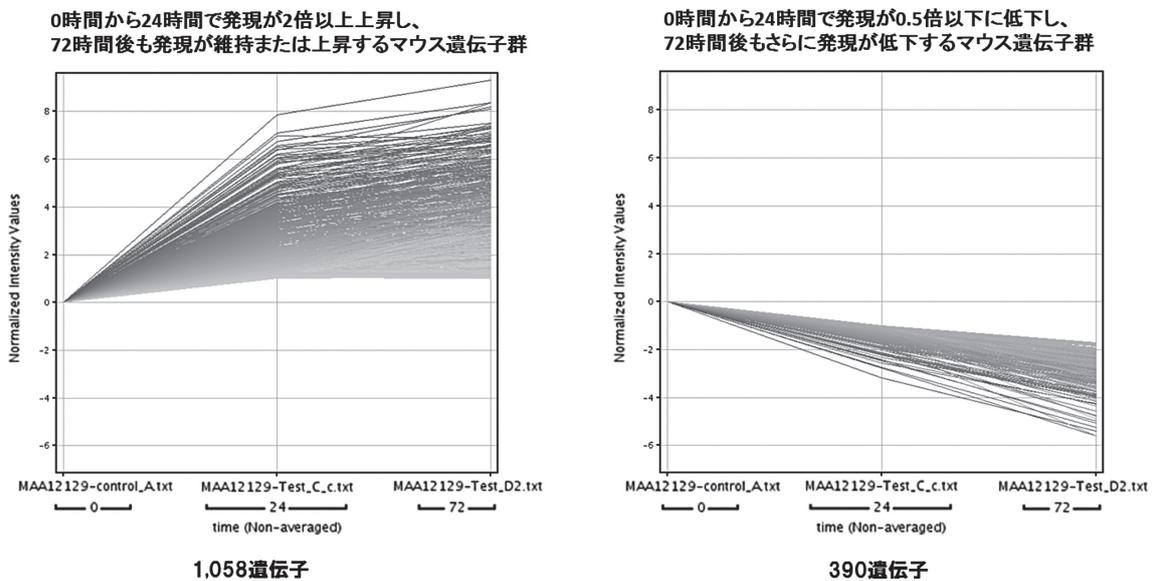


図 4.

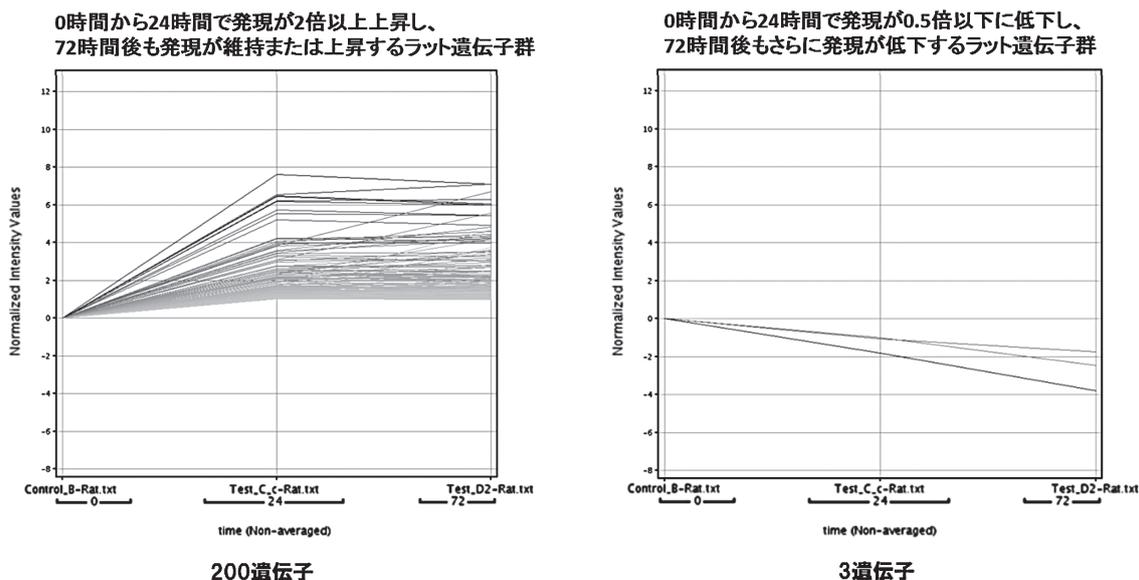


図 5.

## 考 察

今回の研究では神経系細胞と骨芽細胞の相互作用について *in vitro* での実験を行った。神経細胞と骨芽細胞を接触型共存培養で行うことで、骨芽細胞の分化が誘導されるが、非接触型共存培養では誘導されなかったことから、神経細胞による骨芽細胞分化の促進には細胞接触が重要である。最近、われわれは *in vivo* において神経系が骨形成を促進させることを示した<sup>4)</sup>。今回は *in vitro* においても神経系細胞が骨芽細胞の分化を促進させることが明らかとなった。

また、接触型共存培養では神経系細胞の分化マーカー発現が上昇していることから、神経分化も促進される可能性が示唆された。これまでに骨芽細胞が神経細胞を促進する報告はない。

さらに、経時的に発現の上昇する遺伝子群を調べたところ、ラットよりもマウスで非常に多いことがわかった。これらの遺伝子の中で骨芽細胞分化に関与するマウスの遺伝子および神経分化に関与するラットの遺伝子が存在するかどうかは今後検討する予定である。

## 参考文献

1) Karsenty G, Ferron M. The contribution of

bone to whole-organism physiology. *Nature* 2012;481(7381):314-20.

2) Sato T, Abe T, Chida D, Nakamoto N, Hori N, Kokabu S, et al. Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. *FEBS Lett* 2010;584(4):817-24.

3) Sato T, Chida D, Iwata T, Usui M, Hatori K, Abe T, et al. Non-neuronal regulation and repertoire of cholinergic receptors in organs. *BioMol Con* 2010;1(5-6):357-66.

4) Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, et al. *Sema3A* regulates bone mass accrual through sensory innervations. *Nature* 2013;497(7450):490-3.

5) Sato T, Abe T, Nakamoto N, Tomaru Y, Koshikiya N, Nojima J, et al. Nicotine induces cell proliferation in association with cyclin D1 up-regulation and inhibits cell differentiation in association with p53 regulation in a murine pre-osteoblastic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377(1):126-30.

## 研究成果リスト

なし