The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	変形性関節症の発症早期で発現変動する遺伝子の同定と機能解析
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2025
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/101274
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式６

申請先学部　　歯学部　採択番号　No.２

令和６年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	かたおか　しゅんすけ 片岡　俊介	学部 学科	歯学部歯学科	学年	３年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	高畑　佳史	所属	歯学研究科 ゲノム編集技術開発ユニット		
研究課題名	変形性関節症の発症早期で発現変動する遺伝子の同定と機能解析				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。（先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。）				

「研究目的」

豊かな健康長寿社会の実現には、高齢期の健康増進が社会的に喫緊の課題であり、特に運動器である骨、関節、筋肉の機能を長期にわたって維持することは健康増進にとって有益であり、全身性疾患の罹患リスクを低下させる。運動器である関節機能の維持を通して健康増進との関わりを実証する。

関節軟骨の代表的疾患には変形性関節症(OA)がよく知られており、軟骨の変性を伴う難治性疾患である（1)。超高齢社会の進行に伴い、60 歳以上の人口の 80%以上で膝関節、肘関節、股関節ならびに背骨に OA が発症し、歯科領域では変形性顎関節症（IV 型）が該当する。特に膝関節の損傷は膝の痛み、下肢の筋力低下あるいは歩行困難などの著しい QOL 低下を招く。現在の OA の薬物治療法としては、ヒアルロン酸の局所注射や消炎鎮痛剤などの対症療法に限られていて、根本的な薬物治療法は今のところ存在しない。したがって、早期診断、予防法や治療法の開発のため、OA の早期で発現変動する遺伝子を明らかにし、関節に対する機能を明らかにする。関節破壊や関節維持に関連する遺伝子をゲノム編集法にてノックアウトし、関節への影響について In vivo スクリーニングを実施する。得られた候補遺伝子の関節軟骨での機能について詳細に評価する。

「研究方法」

変形性関節症モデルマウスを用いた、関節軟骨の機能に関わる遺伝子の解析を行うため、以下の計画を順に遂行する。

(1)変形性関節症の発症時に発現上昇する遺伝子の探索

生体での変形性関節症モデルマウスの誘発には外科的侵襲を加える Destabilized Medial Meniscus 法(半月板不安定化法、DMM 法)を用いる（図１）。具体的には膝関節の内側脛骨-半月板靭帯を切除し、半月板の動きを不安定化させることで、膝関節への力学的負荷が増大し関節表層の変性、摩耗、破壊が進行させる。これらのサンプルを用いて、術後 4 週目のマウス膝関節から total RNA を回収し、RNA-seq により遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、変形性関節症の早期に発現変動する遺伝子のスクリーニングを実施する。

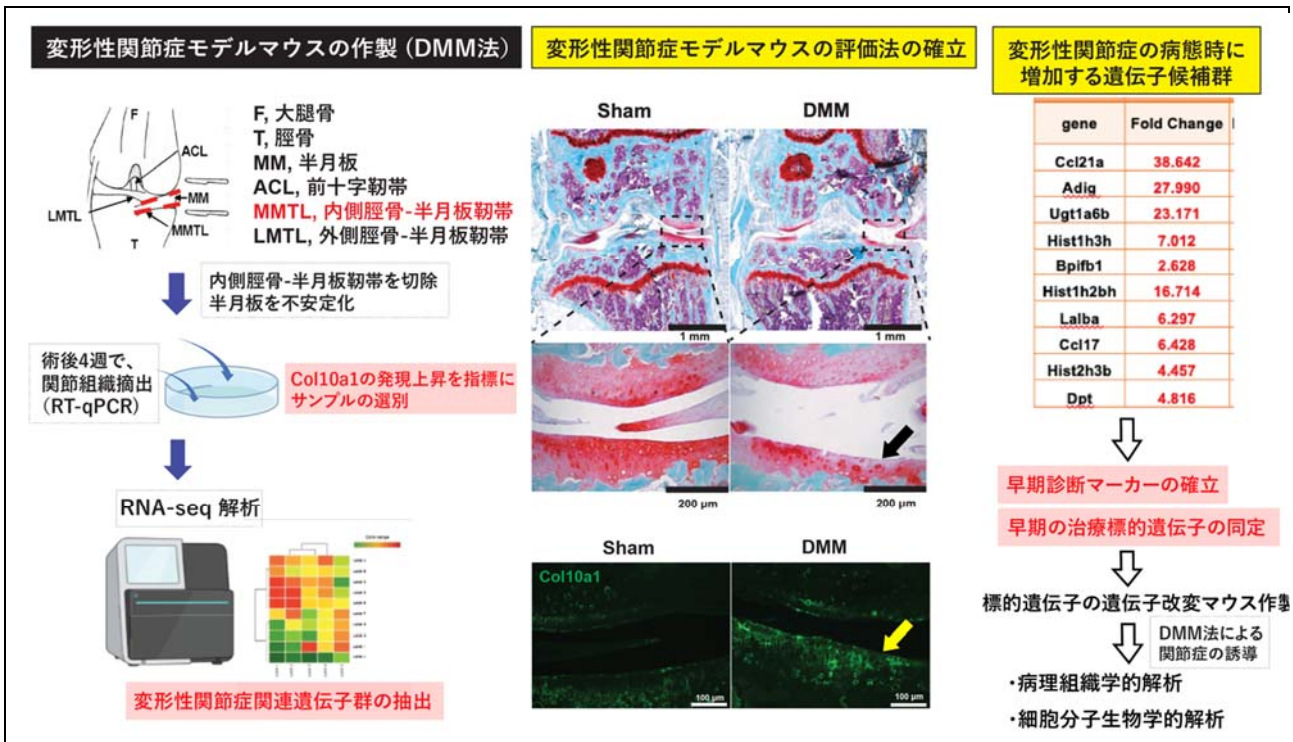

図１：変形性関節症モデルマウスからの遺伝子スクリーニング

(2)ゲノム編集技術を利用したマウス個体での候補遺伝子の機能解析

スクリーニングで得た候補遺伝子群をさらに絞り込むため、引き続きマウス個体レベルで候補遺伝子の変形性関節症に対する機能解析を行う。CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて候補遺伝子のノックアウト(KO)マウスを順次作成する。候補遺伝子 KO マウスが致死性の場合は、loxP 配列を挿入し、Prg4 や Gdf5 遺伝子プロモーターなどを用いた関節軟骨特異的 Cre ドライバーマウスと交配して、コンディショナル cKO マウスを作製する。候補遺伝子のノックアウトマウスと野生型マウスに対して半月板不安定化法にて変形性関節症モデルを誘発し、遺伝子の loss-of-function による関節軟骨に対する影響について比較する。評価には膝関節組織の薄切標本に対して SafraninO-Fast Green 染色を行い病理組織学的解析にて行う。

「研究経過」

外科的侵襲を加える Destabilized Medial Meniscus 法(半月板不安定化法、DMM 法)を用い、術後４週目のマウスから膝関節サンプルを調製した。変形性関節症の病態時に Col10 が発現上昇することを指標にサンプルの評価を行い、RNA-seq にて解析した発現上昇した遺伝子リストの中から Dpt, Nt5e 遺伝子に着目した。それぞれの遺伝子発現の上昇を確認するため、新たに１０匹のマウスの膝関節 RNA サンプルを調製し、RT-qPCR 法にて各遺伝子の mRNA 発現量の評価を行い、変形性関節症によって発現誘導されることを確認した。(図２)

当研究グループの先行研究によって Dpt の遺伝子ノックアウトマウスは既に作製されており、現在変形性関節症との関連性について解析中であるため（未発表データ)、今回、ATP の代謝に関連する酵素の一つである Nt5e(ecto-5'-nucleotidase)の遺伝子改変マウスを作製することとした。

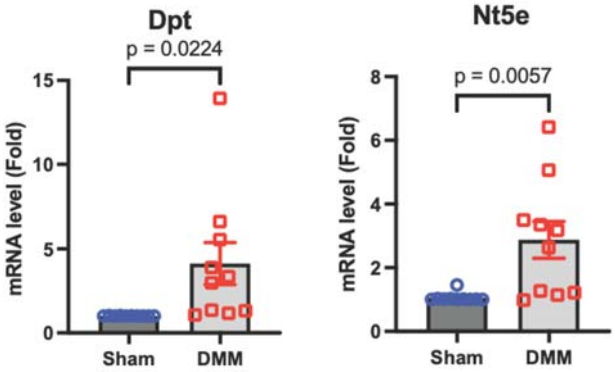

図２：変形性関節症の発症早期で発現上昇する遺伝子候補

ノックアウトマウス作製のために Nt5e のエクソン１内に存在する開始コドン ATG の直下にストップコドンを挿入するよう設計を行い、このストップコドン挿入型遺伝子改変マウスは Nt5e タンパク質の翻訳が行われない。したがって Nt5e の機能的欠損のため、ストップコドンの DNA 挿入配列にはどのフレームにもインフレームとなるよう TATAATTGATTAGGCTAGC を用いた（図 3A)。

遺伝子改変マウスを作製するために、TAKE 法（2）によるマウス受精卵へのゲノム編集技術を用いた。Cas9 に結合する sgRNA の合成には crRNA(IDT)と tracrRNA(IDT)とを等量混合し、熱変性後、室温にてアニーリングを行った。sgRNA の標的配列は、CAGCCACTTGGGTACCTTAG を用いた。Cas9, sgRNA 複合体をマウス前核期受精卵に導入し、翌日２細胞期胚を ICR レシピエントマウスに移植を行った。移植から１９日後、複数の産仔が得られその中から陽性となる個体を選別し、シークエンスにてストップコドンがノックインされているかシークエンスにて確認した（図３A)。

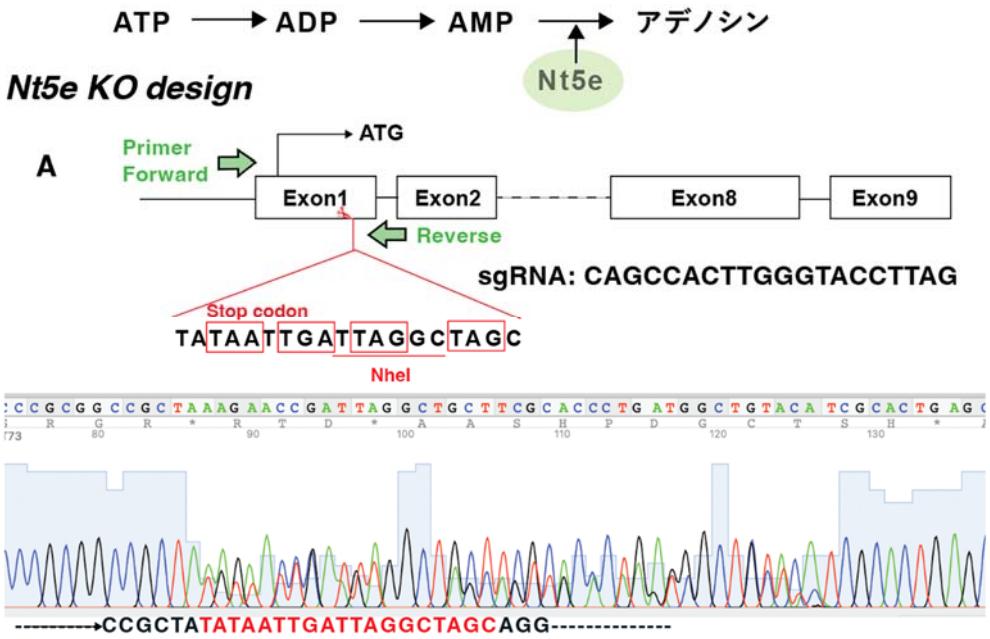

図３：Nt5e ノックアウトマウスの作製

次世代 F1 系統にて生殖細胞系列へのトランスミッションを確認し(図４A)、ヘテロ欠損マウス同士を交配させ、ノックアウトマウスを得た。タンパクレベルで Nt5e の発現消失を確認するため、ノックアウトマウス由来の関節軟骨細胞を調製し細胞溶解液のタンパク質サンプルに対して Nt5e の抗体を用いたウェスタンブロットを行った。野生型（WT）から抽出したサンプルで Nt5e の発現を検出でき、ノックアウトマウス由来のサンプルは Nt5e の発現が消失していることを確認した（図４B)。

以上の結果から Cas9 ゲノム編集法による Nt5e のノックアウトマウス作製が完了した。

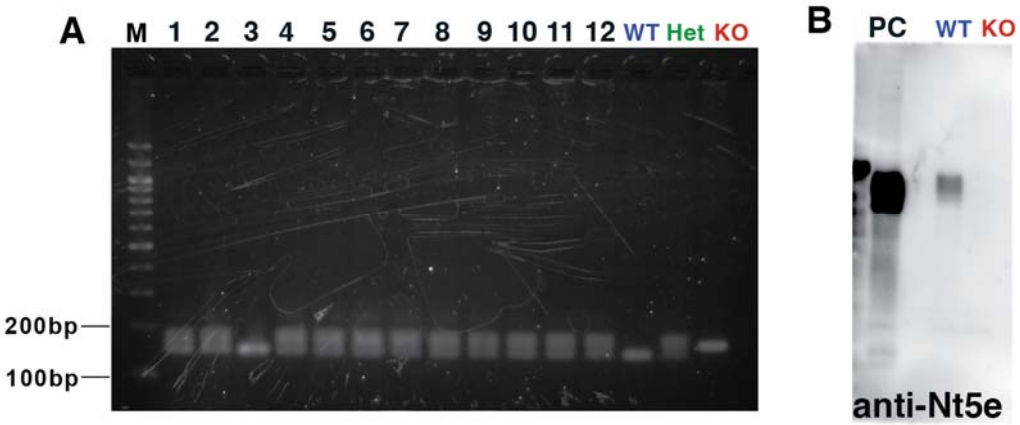

図４：Nt5e ノックアウトマウス系統樹立と Nt5e 発現確認

「研究成果」

Nt5e の関節形成に対する影響については現在進行形で、解析中である。Nt5e のヘテロマウス同士を交配して得た妊娠１７日目の胎児の同腹仔に対してアルシアンブルー、アリザリンレッドによる二重染色骨格標本を作製し、骨表現型を解析した。野生型マウスと Nt5e ノックアウトマウスで脛骨の全長および、内軟骨骨形成による石灰化部位に差は認められず、軟骨成長過程への影響は認められなかった。今後、病理組織切片を作製し、関節軟骨の遺伝子マーカーである Prg4 の発現解析や、Nt5e ノックアウトマウスに対する変形性関節症モデルの解析を通じて、生体での膝関節に対する影響などを検討していく予定である。

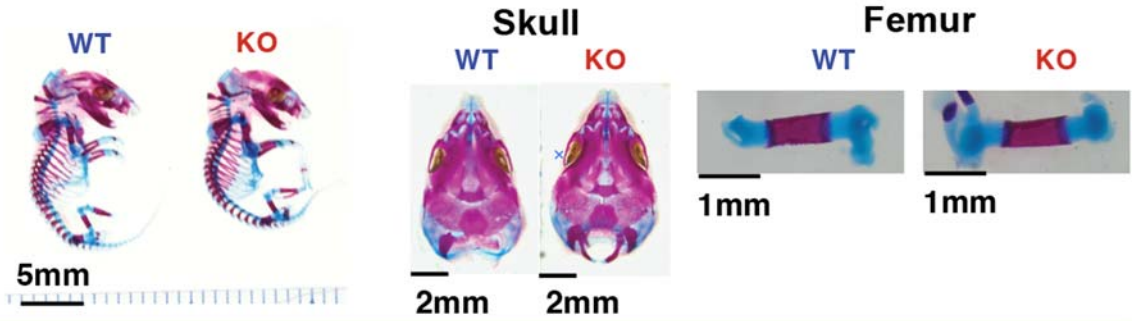

図５：Nt5e ノックアウトマウス骨形成への影響

参考文献

1. Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, et al. Osteoarthritis. Lancet. 2015;386(9991):376-387.

2. Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T, Mashimo T. Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. Sci Rep. 2014;4:6382