

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15537

研究課題名（和文）骨細胞アポトーシスに伴う成熟破骨細胞形成の時空間的な制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis on the spatiotemporal regulation of osteoclasts maturation via the osteocytic apoptosis

研究代表者

池淵 祐樹（Ikebuchi, Yuki）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20645725

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：初代培養骨細胞のin vitro三次元培養系を用いて、骨細胞に物理的な負荷を与えた際に認められるアポトーシス及びRANKLの発現量変動がどのように制御されているのか、解析を行った。三次元培養した骨細胞に対し物理的なストレスを与えることで、マウスin vivoで認められるものと同様のアポトーシスの誘導とRANKLの発現量上昇が再現された。Caspaseに対する阻害剤の存在下ではRANKLの誘導が抑制され、また、細胞間の接触を物理的に抑制することでも同様の傾向が認められたことから、直接アポトーシスを起こした骨細胞からの何らかの接触刺激が一連の現象を制御していることが想定された。

研究成果の概要（英文）：Using the established culturing system of primary osteocytes in collagen hydrogel, we analyzed on the regulatory mechanism of RANKL expression in apoptotic osteocytes induced by mechanical loading. As mimicking micro-cracks, hydrogels were cut by scalpel and osteocytes were collected in time- and distance-dependent manner. As a result, apoptosis was occurred and the elevation of RANKL expression was observed in osteocytes, especially located near the cutting section, as observed in mice in vivo model. These effects were suppressed in the presence of pan-caspase inhibitor. Furthermore, disturbing direct cell to cell communications using the porous membrane also showed the similar effect. These results indicated that any signals were transferred to neighboring cells from the apoptotic osteocytes through the direct cell to cell contact, and it would contribute to the efficient osteoclasts activation.

研究分野：骨・軟骨代謝

キーワード：骨代謝 骨細胞 細胞間ネットワーク

### 1. 研究開始当初の背景

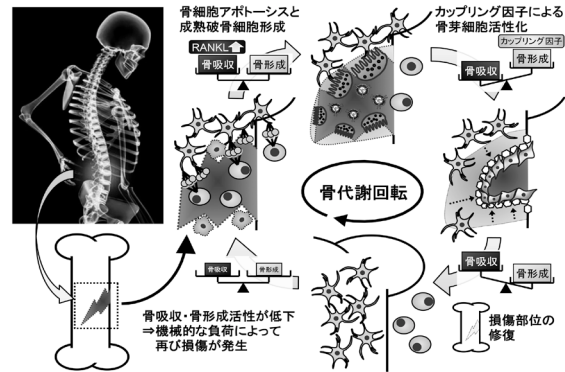
骨組織はその生理的な役割・性質上、日常的な動作下においても機械的な負荷を絶えず受けており、その結果として生じる微細な亀裂（マイクロクラック）の修復を繰り返すことで代謝回転が行われ、組織全体の質および量を維持している。一連の代謝サイクルは損傷した骨組織の破骨細胞による除去・骨吸収から始まり、高齢期の骨粗鬆症等では修復されずに蓄積したマイクロクラックの影響で骨の頑強性が低下し、骨折リスクを高めるものと考えられていることから、破骨細胞の分化・成熟・活性化機構の詳細な解明は重要な課題である。

成熟破骨細胞の形成においては、従来想定されて来た骨芽細胞ではなく、骨細胞からの Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) Ligand (RANKL) の供給が主に寄与していることが 2011 年前後に報告されて以降、破骨細胞形成を起点とした一連の骨代謝制御機構の全体像の理解が急速に進みつつある。研究代表者らも、過去に骨芽細胞において解明していた RANKL の細胞内局在制御機構が骨細胞においても多くは保持されており、生理的な環境を反映した骨細胞と破骨前駆細胞との共培養系においては、骨細胞が伸長する樹状様突起との直接接触が破骨前駆細胞の分化には必須であることを見出している (Honma M, Ikebuchi Y. et al, J Bone Miner Res. 2013)。

一方で、マイクロクラックの形成を感知し、その空間的近傍において破骨細胞の効率的な活性化がどのように制御されているのかに関しては、未だ統一した見解が得られていない。マウス *in vivo* での過去の報告から、骨損傷部や骨細胞のアポトーシスにより生じる骨腔窩の周辺では RANKL の発現量及び破骨前駆細胞への提示量が増加し、局所において効率的な骨吸収が行われると想定される。このようなアポトーシスを介した一連のシグナル伝達・ストレス応答は「Bystander 効果」と呼ばれ、虚血時の組織損傷等を対象に精力的に解析が試みられているが、一連の反応の起点であるアポトーシスによって隣接する細胞へと「何が」「どのように」伝達されるかは不明確なままである。骨細胞・破骨細胞間のシグナル伝達においても類似した制御機構の存在が想定され、その詳細な機構を明らかにすることは、骨代謝分野以外の領域においても重要な発見につながるものと期待される。

骨細胞は生体内では骨基質中に埋め込まれるようにして存在し、伸長した多数の突起群が形成する細胞間ネットワーク構造を介して機械的刺激のセンサーとして機能すると考えられている。しかしながら、骨細胞の形質をよく保持した培養細胞系が限られることもあり、その詳細な機構は明らかにされていない。研究代表者らは、これまでに、幼若マウスの頭蓋骨から単離した初代骨細胞

を使用し、I 型コラーゲンおよびマトリゲルの混合ゲル中で三次元培養をすることにより、骨細胞がその形態や遺伝子発現などの性質をよく保持することを明らかにしている (Honma M, Ikebuchi Y. et al, J Bone Miner Metab. 2015)。



### 2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究では、骨細胞ネットワークに生じた微細な亀裂局所での成熟破骨細胞形成が時間的及び空間的にどの様に制御されているかを検証し、骨リモデリング機構の一端を解明することを目的とした。具体的には、

- (1) 骨細胞におけるアポトーシスに伴う RANKL 発現制御の関連性
- (2) アポトーシスを起点とする骨細胞間シグナル伝達機構
- (3) 骨損傷部位への破骨前駆細胞の誘引機構

の解明を主目的とした。一連の解析は、骨リモデリングもしくは骨折等の病態時に認められる骨吸収活性化機構の全体像の解明に繋がる意欲的な研究であり、その分子基盤の理解は生理学的・骨代謝学的に非常に意義深いものと考えている。

### 3. 研究の方法

(1) 骨細胞 *in vitro* 三次元培養系における機械的負荷による影響評価

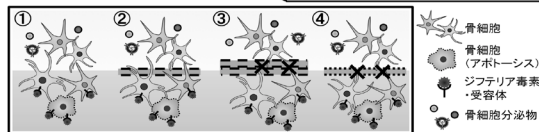
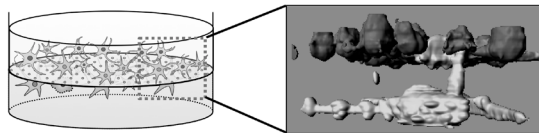
幼若マウスの頭蓋骨より単離した初代培養骨細胞は通常の平面培養下ではその形質を早期に失い、詳細な解析を困難にさせてしまうが、代表者らは、I 型コラーゲンに基底膜マトリクスを豊富に含むマトリゲルを混合したゲル中で包埋し三次元培養することで、その特徴的な突起状構造を含む多くの形質を長期に渡って保持することを見出している。この培養下にある骨細胞に対して、実験用メスを用いて直接ゲルを破断することで、マイクロクラックを模した物理的刺激を負荷した。破断面からの距離に応じて段階的に骨細胞を回収し、RANKL を始めとする骨代謝関連分子群、およびアポトーシス関連分子群の mRNA 発現量を測定した。

また、ゲル破断面から周囲へのアポトーシ

スの伝播をより視覚的に捉えるために、Hoechst33342およびPropidium Iodideを用いた核の二重染色により観察した。さらに、一連の現象がアポトーシスを引き金として起こっていることを、Caspaseに対する阻害剤を併用することで検証した。

## (2) RANKL 発現誘導における細胞間ネットワークの関与の解析

ゲル破断面近傍から認められる RANKL の発現誘導が、遠隔の細胞へも伝播していくことが骨細胞間のネットワークを介した直接的な接触によるものかどうか、多孔性フィルターを用いて検証を行った。ポアサイズの異なる複数のフィルターを組み合わせることで、骨細胞の細胞体同士や樹状様突起同士の接触を段階的に阻害していくことで、RANKL の発現誘導にどのような影響が見られるかを評価した。また、細胞間シグナル伝達への関与が広く知られる Connexin43 に関しては、その選択的な阻害剤、あるいはノックダウンを併用することでその関与を検証した。



メンブレン	細胞体	樹状突起	液性因子	RANKL誘導
①なし	○	○	○	?
②孔径3μm	×	○	○	?
③孔径3μm×2	×	×	○	?
④孔径0.1μm	×	×	○	?

## (3) 骨細胞から分泌される液性因子の網羅的な探索

骨細胞間の直接的な接触だけでなく、分泌される液性因子が一連の制御機構に関わっている可能性も想定し、その探索を試みた。I 型コラーゲン、マトリゲルの混合ゲル中での物質の拡散性を、各種の蛍光標識されたプローブ化合物で確認し、刺激伝達に関与するか否かをまずは分子サイズの点から選別した。続いて、ゲル切断による物理的な刺激によって変動する種々の代謝物、分泌因子を網羅的に、メタボロミクス・プロテオミクスの手法での探索を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 骨細胞 in vitro 三次元培養系における機械的負荷による影響評価

骨細胞を I 型コラーゲン・マトリゲルの混合ゲル中で培養し、実験用メスで一部に切り込みを入れたところ、破断面に面した骨細胞だけでなく、数十 μm の範囲内に存在する骨細胞においては Propidium Iodide 陽性のも

子が観察された。このことは、ゲル破断面を中心として同心円状に培養ゲルを切り出し、それぞれに含まれる骨細胞における mRNA 発現量を測定した結果とも一致し、直接的な物理刺激を受けていない骨細胞においても Caspase-3,8 の発現量の上昇が認められた。同時に、RANKL を始めとする骨代謝関連分子の mRNA 発現量も確認したところ、Caspase3,8 と同様にゲル破断面の近傍でも顕著な発現量上昇が認められた一方で、100μm 以上離れたさらに遠隔の骨細胞においても有意な発現量の上昇が認められた。RANKL に対するデコイ受容体として機能し、破骨細胞の活性化を負に制御する Osteoprotegerin (OPG) はこれとは正反対の挙動を取り、破骨細胞活性化能の指標の一つである RANKL/OPG 比は大きく上昇していた。これらの結果は過去にマウス in vivo で報告されているものとよく一致しており、ゲル破断によってアポトーシスを起こした骨細胞からの何らかの刺激がより遠隔の骨細胞へも伝達され、効率的な破骨細胞の活性化に繋がっていることを示唆するものと考えられた。また、骨細胞から分泌され骨芽細胞の分化を負に制御する Sclerostin の発現量変動は RANKL とよく似た傾向を示し、骨吸収が活発に行われる領域においては一時的に骨形成が抑制されていることが示唆された。

さらに、一連の分子群の発現量変動は、Caspase に対する汎阻害剤 zVAD-fmk の存在下では有意に抑制されることも認められ、アポトーシスを起こした骨細胞が起点となって何らかの刺激伝達が行われているものと想定された。

### (2) RANKL 発現誘導における細胞間ネットワークの関与の解析

アポトーシス細胞を起点とした周辺の骨細胞への影響が、細胞間の直接的な接触によるものか否か、検証を試みた。代表者らの以前の研究から、多孔性のフィルター上に播種した上で骨細胞をゲル中で包埋すると、フィルター内のポアを通して数十 μm ほど樹状様突起が伸長され、生体内での骨小腔構造に類似した細胞間ネットワークを形成させることが見出されている (Honma M, Ikebuchi Y. et al, J Bone Miner Res. 2013)。さらに、フィルター上のポアサイズを徐々に狭める、あるいは複数枚を重ねることで細胞間のネットワーク形成を阻害することも可能であり、種々の条件においてアポトーシスに伴い観察される RANKL の発現量上昇が影響を受けるか検証した。その結果、樹状様突起間の接触を妨げるポアサイズを狭めた場合、フィルターを複数枚重ねた場合のいずれにおいても、ゲル破断後に認められる RANKL の発現誘導は著しく減弱した。一方で、周辺細胞におけるアポトーシスの誘導も細胞間の接触を妨げることで有意に低下し

たものの、その程度は弱く、アポトーシスの誘導とRANKLの発現量上昇には異なる因子が介在していることが示唆された。

続いて、全身の細胞の多くで細胞間のシグナル伝達に関与することが知られ、骨細胞においても一部の遺伝子の発現制御に関与することが報告されている Connexin43 が、RANKL の発現誘導に影響を与えるか否かを検証した。アデノウイルスを用いた Connexin43 のノックダウン、あるいは選択的な阻害剤を用いた検討からは、Connexin43 の寄与の程度は低いことが示唆されたため、今後さらなる解析が必要である。

### (3) 骨細胞から分泌される液性因子の網羅的な探索

骨細胞の三次元培養に使用する I 型コラーゲン・マトリゲルの混合ゲル中において種々の分子がどの程度の拡散性を持つのか、蛍光を有するプローブ化合物を使用して推定した。具体的には、細胞培養用のトランスウェルチャンバー上に混合ゲルを準備し、上層にプローブ化合物を添加することで、一定時間ごとに下層側にどの程度の蛍光分子が移行するかで評価した。対象のプローブ化合物は、多くの細胞間シグナル伝達に関与することが知られる一酸化窒素、低分子のプローブとして calcein、一般的な分泌タンパク質と同程度の分子サイズと見込まれる GFP 精製タンパク質、さらに高分子量の蛍光標識された抗体分子の 4 種とした。その結果、一酸化窒素および calcein の低分子に関しては、上層に添加後 1 時間以内に速やかに拡散し、上層・下層共にほぼ同じ濃度の平衡に達した一方で、GFP は数時間をかけて徐々に、また抗体は 24 時間をおいた場合においても 1 割程度しか下層に分散しておらず、分子サイズによって混合ゲル中の分子の移動性・拡散性が大きく影響を受けることが示された。先述した、ゲル破断による周辺の骨細胞への影響は数時間以内に速やかに引き起こされていることから、骨細胞間の直接的な接触以外の要因に関しては、比較的分子量の因子が関与しているものと想定された。

過去の報告から、骨細胞間のシグナル伝達に一酸化窒素やプロスタグランジン E2 の関与が示唆されていたため、両者の蛍光プローブ存在下で骨細胞にゲル破断ストレスを与えたところ、ゲル破断面の周囲で一過的に蛍光シグナルの上昇が観察された。しかしながら、それぞれのシグナル伝達に対する選択的な阻害剤の存在下においても、ゲル破断後に見られる RANKL の発現上昇はほぼ影響を受けず、寄与は小さいものと考えられた。

今後、高分解能の質量分析計 (Orbitrap) を用いた代謝物および分泌タンパク質の一斉網羅解析手法の構築を試みる予定である。骨細胞の形質を保持した *in vitro* 培養系がこれまでに確立されていなかったことが、骨細胞の生理的な機能解析が十分になされてい

ないことの一因となっているが、骨細胞は骨代謝だけでなく、脂質代謝や糖代謝など、全身の様々な恒常性維持に重要な役割を担っていることが示唆されている。本実験系を用いることで、その生理的な役割の解明に向けた重要な知見が得られるのではないかと期待している。

## 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 2 件)

(1) Sugamori Y, Mise-Omata S, Maeda C, Aoki S, Tabata Y, Murali R, Yasuda H, Udagawa N, Suzuki H, Honma M, Aoki K. Peptide drugs accelerate BMP-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mTORC1 signaling. *Bioessays*. 2016 Aug;38(8):717-25.

DOI: 10.1002/bies.201600104.

(査読あり)

(2) Notomi T, Kuno M, Hiyama A, Ezura Y, Honma M, Ishizuka T, Ohura K, Yawo H, Noda M. Membrane depolarization regulates intracellular RANKL transport in non-excitabile osteoblasts. *Bone*. 2015 Dec;81:306-14.

DOI: 10.1016/j.bone.2015.07.031.

(査読あり)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

東京大学医学部附属病院薬剤部試験研究室/  
臨床薬物動態学教室

<http://plaza.umin.ac.jp/~todayiak/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

池淵 祐樹 (IKEBUCHI, Yuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20645725

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4)研究協力者

本間 雅 (HONMA, Masashi)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60401072