

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601  
研究種目：若手研究(A)  
研究期間：2016～2019  
課題番号：16H06261  
研究課題名(和文)破骨細胞exosomeによるカップリング制御様式の解明

研究課題名(英文)Coupling regulation by osteoclastic exosomes

**研究代表者**

苅谷 嘉顕 (Kariya, Yoshiaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20633168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、成熟破骨細胞由来exosome (OC exosome)が骨芽細胞遊走性制御能を有することを見出した。このメカニズムは、別途明らかにしたOC exosomeの機能であるRANKL逆シグナル入力能には依存しないことが確認され、OC exosomeは、RANKL逆シグナルリガンド以外の生理的な活性変化を惹起するリガンドも保持する多機能複合体として骨代謝を制御することが示唆された。また、OC exosomeが骨吸収部位に強く局在することも明らかとなった。OC exosomeが放出される時間・空間制御を考慮すると、骨吸収から骨形成へのカップリング制御の重要因子であることが示唆された。

**研究成果の学術的意義や社会的意義**

骨吸収と骨形成の反復(骨リモデリング)は骨量・骨質維持に重要である。本研究では、この骨吸収から骨形成へのカップリングに重要な因子として、破骨細胞が放出する細胞外膜小胞に注目した。これまでの研究および本研究結果をあわせると、破骨細胞由来細胞外膜小胞は、骨吸収から骨形成への移行を促す作用を細胞分化の点で制御するほか、骨芽細胞の運動性にも影響を与えていることが見出された。これらの成果は、膜小胞というタンパク質複合体が、複数細胞が関わる複雑なカップリング現象に関して多面的に関与していることを示しており、この膜小胞の更なる解明が骨代謝理解促進に重要であることを見出した学術的に意義深い研究である。

研究成果の概要(英文)：We have revealed that exosome secreted from mature osteoclasts (OC exosome) has a function to regulate chemotactic ability of osteoblasts. Since our parallel researches have revealed that OC exosome can input RANKL reverse signaling, we checked the involvement of this signaling and have found that osteoblast chemotaxis is not regulated by RANKL reverse signaling. This result suggests that OC exosome contains multiple factors controlling bone remodeling related events and functions as a multi-functional unit. In addition, we have also revealed that OC exosome is localized to the periphery of bone resorption pits. Considering the spatiotemporal regulation of OC exosome secretion, it is suggested that OC exosome is a key regulator for the coupling from bone resorption to formation.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨リモデリング 骨芽細胞 カップリング エクソソーム 破骨細胞 細胞遊走

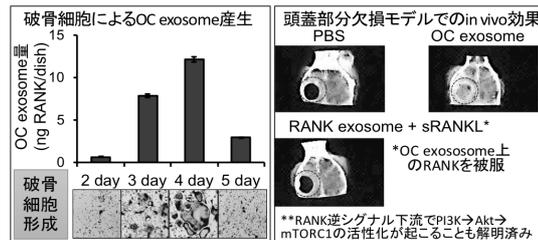
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨は、破骨細胞による骨吸収、それに続く骨芽細胞による骨形成により、損傷しマイクロクラックが生じた箇所が修復され、骨質および骨量が維持されている。そのため、このカップリング現象の機構解明は、骨代謝機構の理解の上で極めて重要であり、かつ、種々の骨代謝疾患の理解・治療法構築にも極めて重要である。2010年以前は、骨吸収は、骨芽細胞に発現する Receptor Activator of NF-kappaB (RANK) Ligand (RANKL)が、破骨前駆細胞に発現する RANKL に細胞間接触を介して結合することが起点と考えられていた。しかしながら、2011年に複数グループから相次いで、主な RANKL の供給源が骨細胞であることを示唆する報告が相次いだ。さらに、骨吸収部位での骨芽細胞の活性化を積極的に防ぐ機構の存在も示唆されていた。従来の概念であれば、破骨細胞活性化制御細胞は骨芽細胞と考えられていたため、骨吸収部位局所において成熟破骨細胞との接触を介して骨芽細胞が活性化することで、骨吸収部位に選択的な骨形成が起きると解釈し得たが、骨細胞による破骨細胞活性化制御という新規知見からは、この解釈が困難になるなどカップリング現象に関する破骨細胞・骨芽細胞の活性化制御・細胞動態制御に関わる議論が再提起される状況となっていた。

研究代表者らは、研究開始時までに破骨細胞の活性化制御機構の解明として、骨細胞内の RANKL 細胞内動態の解析を進めており、骨細胞においては、RANKL の細胞表面での局在は微量であり、大部分は細胞内でリソソームへ輸送されていることを見出していた。リソソーム内の RANKL は、骨細胞の架足が破骨前駆細胞と接触することで刺激依存的に接触面に輸送されること、更には、この RANKL 輸送は、RANK 細胞外領域を表面に固相化したポリスチレンビーズとの接触によっても生じることを見出し、RANK から RANKL への逆シグナルがすることを示唆する知見を得ていた。また、骨芽細胞における RANKL 局在制御も、骨細胞と概ね同様であることも確認できており、骨芽細胞においても RANKL の逆シグナルの存在が示唆された。また、生理的な RANKL 逆シグナルの実体探索の過程で、破骨細胞がその成熟過程において exosome (OC exosome) を分泌すること、OC exosome には RANK が搭載されていること、マウス頭蓋骨損傷マウスモデルに OC exosome 含浸マトリックスを留置した際に欠損部の骨修復が促進する一方で、RANK を可溶性 RANKL で被覆した OC exosome ではその効果が消失すること (図1)、が確認された。これらのことから、OC exosome が RANKL 逆シグナルのリガンドとして機能し骨形成誘導を担う可能性が示唆され、OC exosome は新たなカップリングファクターであることが想定された。しかしながら、RANKL 逆シグナルを介した骨促進作用以外の生理機能は、その有無を含め、未解明な状況であった。

図1. OC exosomeは骨形成促進能を有する



### 2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究では、OC exosome のカップリングにおける新たな機能の探索を目的とした。特に、膜小胞という形態で細胞外に放出されている事実に着目し、可溶性タンパク単体では困難な制御がなされている可能性を想定し、そのような制御が見出された場合には、背後のメカニズム解明を目指すこととした。

### 3. 研究の方法

#### (1) OC exosome の単離取得

RAW264.7 細胞あるいはマウス頸骨・腓骨より単離した骨髄マクロファージに可溶性 RANK および M-CSF 添加し、3 日程度培養することで破骨細胞を活性化させ、その後培養上清を交換し、24hr~48hr 程度培養した上清を回収した。その後、300×g 10分、800×g 10分、16000×g 20分、100000×g 60分、遠心した後の沈降画分を exosome として用いた。

#### (2) 細胞・切片観察および画像解析

各種薄切片作成には、凍結ミクロトーム (CM3050S、ライカ) を用いた。各種細胞や切片の観察には、蛍光顕微鏡 (BZ-X800、キーエンス) あるいは、共焦点顕微鏡 (FV10、Olympus) を用いた。また、撮影画像の解析は各機器に付随しているソフトウェア、あるいは、IMARIS (Bitplane) を用いて行った。Exosome 検出の際には、抗 CD9 抗体あるいは抗 Alix 抗体を用いて免疫染色を行い、骨吸収窩の染色には、蛍光分子でラベルされた wheat germ agglutinin を用いた。

#### (3) ショットガンプロテオミクス

分析対象のタンパク質可溶化液に、50:1 (w/w) の割合で trypsin を添加し、37 °C にて 4 hr 書した。さらに同量の trypsin を再添加したのち、37 °C にて 12 hr 処理した。その後、trypsin 消

化産物は、dithiothreitolにて還元、iodoacetamideにてアルキル化した後、ナノフロー液体クロマトグラフィシステム(nLC; Easy nLC 1000, Thermo Scientific)に接続された orbi-trap型質量分析機(Q-Exactive, Thermo Scientific)により分析した。nLC条件としては、15 cmのC18カラムを接続し、0.1% ギ酸水溶液、および、0.1%ギ酸含有アセトニトリルを移動相として用い、アセトニトリル濃度0%から35%まで、220分掛けて線形に上昇させた濃度勾配を掛けた。Q-Exactiveは、m/zとして350~1500のプリカーサーイオンを網羅的にスキャンした後、イオン強度が高い上位15イオンについて、プロダクトイオンをそれぞれ網羅スキャンした。得られた質量スペクトルデータは、Proteome discoverer (Thermo Scientific)を用いてMASCOTデータベース参照にて同定した。

#### (4) Chemotaxis assay

Transwellを用いた細胞遊走性試験は、24 wellプレートにtranswellインサート載せ、transwell上に初代培養骨芽細胞を播種し、6時間後にOC exosome等を添加、さらに12時間後にインサート裏面に接着している細胞数を係数することで、評価した。

#### (5) 細胞培養

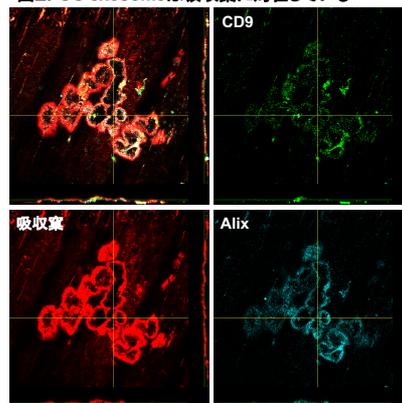
RAW264.7細胞、初代培養骨芽細胞は、 $\alpha$ -MEM培地に10%の胎児牛血清(FBS)、ペニシリン・ストレプトマイシン、L-グルタミンを添加し培養した。成熟破骨細胞形成のための分化誘導にあたっては、100 ng/mLの可溶性RANKL組み換えタンパク質、および、10ng/mLのM-CSF組み換えタンパク質の添加を行った。また、初代培養骨芽細胞や、各種事前検討に用いたMC-3T3E1細胞、ST2細胞も、上記の培地にて培養した。なお、初代培養細胞の取得は、6~8週齢のC57BL/6マウスの頸骨・腓骨(骨髄マクロファージ)あるいは2~3日齢の頭蓋骨(初代培養骨芽細胞)より行った。

### 4. 研究成果

#### (1) OC exosomeのカップリング部位における局在

OC exosomeが成熟破骨細胞から放出されること、膜小胞として放出されるため、可溶性タンパク質と比較して拡散速度が遅いと考えられる。そこで、OC exosomeは、破骨細胞活性化部位近傍に留まることで、骨吸収部位をマーキングし、骨リモデリングにおける骨の埋め戻しを目印となっているという作業仮説を設定した。まず、OC exosomeが吸収窠に存在するか、検証することとした。象牙切片上にRAW264.7細胞を播種し、可溶性RANKLおよびM-CSF存在下で培養することで成熟破骨細胞を形成させ、象牙切片を免疫染色することで、吸収窠にexosomeが検出されるか検証した。その結果、吸収窠のマーカーとして用いたWGAと、exosomeマーカーであるAlix、CD9は、共局在していることが確認された(図2)。また、切片上に接着している成熟破骨細胞を除去した後、同様の実験を行った場合でも共局在が確認され、OC exosomeは、吸収窠に通常の細胞以上に強固に接着することが示唆された。

図2. OC exosomeは吸収窠に局在している

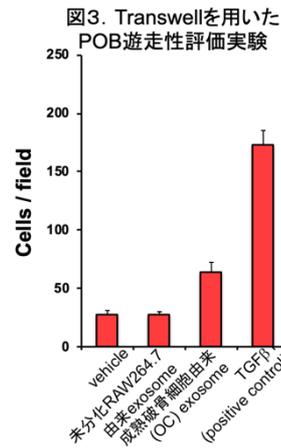


#### (2) OC exosome 搭載タンパク質の同定

OC exosomeが吸収窠局所にて行っている生理機能を推定するために、OC exosomeに搭載されているタンパク質の網羅的同定を試みた。具体的には、RAW 264.7細胞を可溶性RANKLおよびM-CSF添加下で培養し、成熟破骨細胞が十分形成された段階での培養上清を取得し、その上清を段階遠心することで、exosomeを精製した。精製されたexosomeを界面活性剤存在にて可溶化後、trypsinにて酵素消化することで取得したペプチド断片を、ショットガンプロテオミクスの手法にて分析・タンパク質同定を行った。その結果、RANKの他に、Sema3Aシグナルの受容体Neuropilin 2、Sema4Dシグナルの受容体PlexinB2、強いカルシウム結合能を有し、かつexosome形成への関与も示唆されるAnnexin A1、Annexin A4、糖タンパク質との結合性を有するlectin類が含まれていた。これまでに、Sema3Aは骨芽細胞が分化非依存的に産生し、破骨細胞活性化・遊走性を抑制すること(Hayashi M *et al.* Nature 2012)、Sema4Dは活性化破骨細胞が分泌し骨芽細胞の活性化抑制・遊走性亢進に作用すること(Negishi-Koga T. *et al.* Nat Med 2011)から、OC exosome上に搭載されているSema3A、Sema4D受容体はデコイレセプターとして機能することで、細胞遊走性に寄与する可能性が想定された。なお、本解析で取得したOC exosome含有タンパク質に関するプロテオミクスデータは、PRoteomics IDentification Database (PRIDE accession: PXD010500)に登録し、公表済みである。

### (3) OC exosome による遊走性制御能の可能性検証

OC exosome がカップリング過程において何らかの細胞の遊走性制御をする場合、OC exosome が多量に放出されるタイミングが破骨細胞活性化後であることから、その後発生する骨形成制御を担う骨芽細胞の動態を制御している可能性を着想した。そこで、OC exosome が骨芽細胞遊走性に与える影響を検証するために、初代培養骨芽細胞(POB)を transwell に播種し、chemotaxis assay を行った。その結果、OC exosome には、遊走性を亢進させる効果が認められた (図3)。対比として、分化させていない RAW264.7 細胞が少量放出している exosome (Raw exosome) を同タンパク質量になるよう添加した場合には、遊走性の向上が認められないことも確認され、成熟破骨細胞から放出される exosome に強い遊走性制御能があることが示唆された。



### (4) OC exosome による遊走性制御の分子機構

OC exosome が骨芽細胞の遊走性を制御する分子実体を探索するため、OC exosome 上の分子で生理機能を発揮することが我々のこれまでの研究から明らかとなっていた RANK の寄与を検討することとした。細胞の動態特性をより詳細に観察する目的もあわせ、本検証においては、ガラスボトムディッシュに POB を播種し、OC exosome 添加後の経時的に細胞の挙動を観察し、さらに、POB の軌跡をトラッキングすることで細胞移動速度を評価した。その結果、本培養系においては、OC exosome 添加後の運動性に一定の方向性などの規則性が見出されなかった (図4)。また、OC exosome 添加群では、chemotaxis assay の結果と一致して、コントロール群よりも、移動速度が遅い細胞の割合がやや減少し、逆に移動速度が上昇している細胞の割合はやや増加している傾向であった (図5)。また、OC exosome に搭載されている RANK を、事前に可溶性 RANKL で被覆した exosome を用いた場合と、未処理の OC exosome を比較した場合でも大きな差は認められず、この遊走性制御に、骨芽細胞内の RANKL 逆シグナルが関与している可能性は低いと考えられた。そこで、RANK 以外のどの分子が遊走性制御に関与している解明するために、OC exosome を POB に添加した際の、細胞内シグナル伝達の変化を検証することとした。OC exosome を POB に添加後のリン酸化度合いを網羅的に解析するリン酸化ショットガンプロテオミクスを進めることとした。実験系の確立は出来たものの、POB を、OC exosome にて刺激した場合、RANKL 被覆した OC exosome にて刺激した場合、などで共通して認められ、かつ、遊走性制御に関連が示唆される分子の同定には、至っておらず、引き続き、種々の実験による詳細な分子メカニズム検討を続けている。

図4. OC exosome 添加時のPOB挙動の追跡

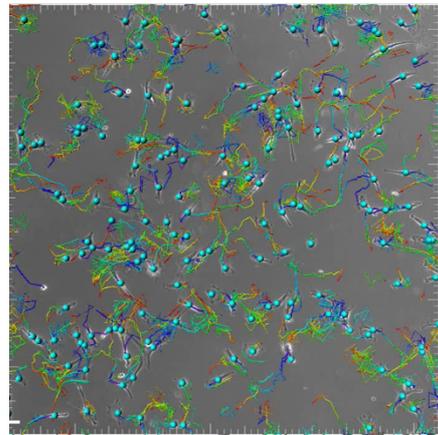
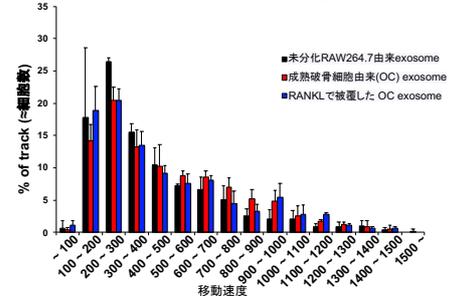


図5. OC exosome 添加時のPOBの移動速度変化



### (5) OC exosome による骨芽細胞動態制御の波及範囲検討

上記(1)で、骨吸収窠への OC exosome の沈着が認められた。一方で、骨芽細胞の遊走性亢進を促す場合、骨吸収窠外縁局所のみならず、より近傍の空間への作用することが生理的に合理的な可能性がある。そこで、OC exosome を in vitro あるいは in vivo で可視化することで、OC exosome の拡散性を評価でき、更には、骨芽細胞動態へ影響を与える空間範囲を同定出来ると考えられる。そこでまず、OC exosome に蛍光タンパク質を搭載させるための発現系構築を行った。具体的には、未熟な破骨細胞由来の exosome に発現がなく、OC exosome に高発現しているタンパク質 X とタンデム Tomato 蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を、破骨細胞選択的プロモーターである TRAP の下流にて発現させるプラスミド DNA およびアデノウィルスを構築した。しかしながら、成熟破骨細胞に構築したアデノウィルスを添加した場合であっても、成熟破骨細胞自体に十分な蛍光強度が観察されず、また、この上清から exosome を回収した場合であっても、傾向顕微鏡等では可視化が困難状況であった。この原因として検討を進めたところ、破骨細胞へのアデノウィルスの感染効率が不十分であることを示唆する知見を得たため、アデノウィルスを構成する外殻タンパク質に、特定のペプチドタンパク質を発現させる改変を行ったところ、感染効率 (あるいは発現効率) の改善が認められた。現在、この系を応用して、OC exosome への蛍光ラベルを導入し、拡散性を評価する各種 in vitro 実験へ供する予定である。

(6)まとめ

本研究では、OC exosome が骨芽細胞の遊走性制御能を有することを見出した。更に、このメカニズムは、OC exosome の有する機能として既に報告されている RANKL 逆シグナル入力では説明が出来ないことが示唆され、RANKL 逆シグナル入力以外にも、生理的な活性変化を惹起するリガンド複合体として機能していることが示唆された。また、この OC exosome は、骨吸収窠周辺に強く局在していることも明らかとなり、OC exosome が放出される時間制御・空間制御を考慮すると、カップリング制御の重要因子であると示唆された。一方で、OC exosome が骨芽細胞の遊走性を制御するメカニズム、および、生理的意義に関しては現在も引き続き解析中であり、OC exosome がカップリング機構に与える影響の包括的な理解には、更なる研究の推進が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuki Ikebuchi, Shigeki Aoki, Masashi Honma, Madoka Hayashi, Yasutaka Sugamori, Masud Khan, Yoshiaki Kariya, Genki Kato, Yasuhiko Tabata, Josef M. Penninger, Nobuyuki Udagawa, Kazuhiro Aoki, Hiroshi Suzuki	4. 巻 561
2. 論文標題 Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 195-200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-018-0482-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----