

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11898

研究課題名(和文) マウスES細胞による破骨細胞支持細胞の同定と生体内での検証

研究課題名(英文) Identification of osteoclast-supporting cells and the investigation of the in vivo functions of the cells using mouse ES cells

研究代表者

岡安 麻里 (Okayasu, Mari)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10610941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨芽細胞から破骨細胞への分化調節機構の理解のため、マウスES細胞を用いた骨芽細胞・骨細胞への分化誘導プロトコルを確立した。誘導した三次元骨芽細胞・骨細胞と骨髄由来細胞の共培養により、血球系細胞の破骨細胞分化を確認した。また、骨芽細胞の各分化段階における遺伝子発現解析を通して、新たな破骨細胞支持細胞や、破骨細胞制御因子を探索した。以上、本研究によりin vitro骨リモデリング確立に向けた洞察と、新規破骨細胞分化制御因子の候補因子が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立したマウスES細胞の三次元分化誘導法は、骨芽細胞だけでなく骨細胞への分化誘導を可能にした。これにより、骨芽細胞・骨細胞と破骨細胞のリモデリングをin vitroで再現できる可能性が示された。さらに本研究で得られた新規破骨細胞制御因子の候補は、将来的に研究が進みその効果を実証された場合は、新たな骨疾患治療薬の候補となる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：To better understand molecular mechanisms underlying osteoblast-mediated osteoclast functions, we developed a three dimensional differentiation protocol to direct from mouse ES cells to osteoblasts and osteocytes. We confirmed that bone marrow-derived cells differentiated into osteoclasts under co-culture with the ES cells-directed osteoblasts and osteocytes. We further performed gene expression analysis in stepwise differentiation stages from the ES cells to osteoblasts and osteocytes in order to identify novel cell-populations and factors contributing to osteoclast differentiation. These results provided insights into establishments of in vitro bone remodeling model and candidates of factors regulating osteoclast differentiation.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨代謝 ES細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常な骨組織は、恒常的な骨形成・骨吸収のバランス調節によって骨リモデリング(骨改造)が行われ、維持されている。骨形成は主に骨芽細胞により、骨吸収は破骨細胞により行われているが、その細胞分化機構は、様々なシグナル分子と転写因子によって空間的・時間的に制御されている。骨芽細胞分化においては、骨格系前駆細胞を発端としヘッジホッグシグナルや Wnt シグナルなどが連続的にはたらくことで、骨芽細胞分化・成熟が精密に制御される。一方、破骨細胞分化においては、単球・マクロファージに由来する破骨細胞の前駆細胞が、骨の微小環境において外部から様々な刺激を受けることにより破骨細胞に分化する。M-CSF(macrophage colony-stimulating factor) は、破骨細胞前駆細胞の形成と、その後の破骨細胞分化において必須であり、骨芽細胞が産生する膜結合型の分子である RANKL(receptor activator of NF- B ligand) は、破骨細胞分化・成熟において必須となる。

これまで、RANKL を産生する細胞の主体は骨芽細胞であると考えられてきたが(Suda T. et al., *Endocr. Rev.* 1999)、骨細胞が産生する RANKL が破骨細胞の分化・成熟に大きく寄与していることが明らかになってきた(Nakashima T et al., *Nat Med*, 2011)。つまり、骨芽細胞、骨細胞の分化段階に応じて RANKL の発現は異なる可能性が示唆されていた。しかし、シグナルの制御を受けて短期間に遺伝子発現が制御される環境下において、異なる各ステージの骨芽細胞を分離することは極めて困難である。加えて、たとえ分離できたとしても採取できる細胞数に限度があることから、各ステージの骨芽細胞がどのような RANKL の発現制御機構を持つか、それぞれの細胞が破骨細胞に対しどのような影響を与えているのかに関してはいまだ不明な点が多く、骨修復過程において重要な分子はわかっていなかった。

2. 研究の目的

これまで研究代表者および研究分担者らは、骨芽細胞において特異的に GFP を発現するマウス ES 細胞 (2.3kb Col1a1-GFP マウス ES 細胞)を樹立し、低分子化合物のみを用いた効率的な骨芽細胞分化誘導法を開発している (Kanke K et al. *Stem Cell Reports*, 2014)。そのため、2.3kb Col1a1-GFP マウス ES 細胞と本誘導法を用いることにより、骨芽細胞のみを単離することが可能であり、in vitro 及び in vivo の検証において骨芽細胞の持つ機能のみを確認することが可能になると考えた。そこで本研究は、マウス ES 細胞の骨芽細胞分化誘導系を用い、骨芽細胞 - 骨細胞分化系において、破骨細胞分化・成熟を正負に制御する新たなサブpopulationを見出し、骨リモデリングにおいて重要な破骨細胞調節因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)マウス ES 細胞の骨芽細胞・骨細胞分化誘導系の確立

通常の細胞培養プレートに加え、アテノコラーゲンを用いた三次元培養を検討した。具体的には、マウス ES 細胞を 10^5 細胞/ $10 \mu\text{L}$ ドロップ状に調整し、アテノコラーゲンに添加した。その後、3時間培養インキュベーターに静置後、培養液を加えた。幹細胞の未分化性維持のため Leukemia inhibitor factor(LIF)、GSK 阻害剤 CHIR99021(CHIR)および ERK/MEK シグナル抑制剤 PD0325901(PD)を使用した。また骨芽細胞・骨細胞分化誘導のため、ヘッジホッグシグナル阻害剤 Cyclopamine、ヘッジホッグシグナル活性化剤 SAG および骨分化誘導剤 TH を用いた。

(2)骨芽細胞・骨細胞分化系譜における網羅的遺伝子発現解析

マウス ES 細胞から異なる期間培養後、totalRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。発現変動遺伝子は、コントロール群と比較し2倍以上の発現変化を示し、複数の統計テストで有意性を示した遺伝子群を抽出した。

(3)骨芽細胞・骨細胞と破骨細胞の三次元共培養法

8週齢マウスの脛骨・大腿骨より骨髓由来細胞を flush out により取り出し、実験に用いた。

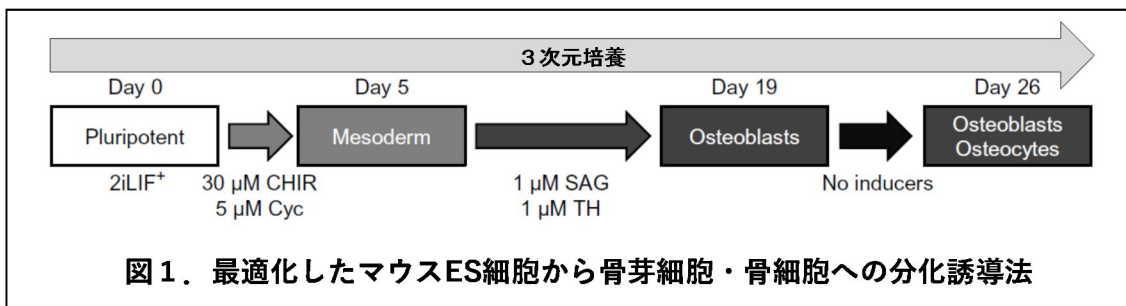
4. 研究成果

(1)マウス ES 細胞の骨芽細胞・骨細胞分化誘導系の確立

マウス ES 細胞の分化誘導法の検討の結果、アテノコラーゲンを用いた三次元培養により幹細胞の多分化性の維持と骨細胞への分化誘導が可能になった。本三次元培養を用いた多分化性維持培養下では、多分化性の維持に必要な Leukemia inhibitor factor(LIF)、CHIR99021(CHIR)および PD0325901(PD)の添加なしに、多分化性マーカー遺伝子の Nanog, Pou5f1 および Sox2 の発現が維持されることが RT-qPCR 法により確認された。また、免疫組織学的解析の結果、NANOG に加え、多分化性マーカーの SSEA1 タンパク質の発現が確認された。重要なことに、この時内胚葉分化マーカーの Sox17、中胚葉分化マーカーの T、および外胚葉分化マーカーの Sox1 の発現は低かった。また、テラトーム形成実験において、三胚葉由来組織が認められた。

次に、三次元培養下で骨細胞への分化誘導が可能か検討するため、先行研究において確立した骨芽細胞分化プロトコル(Kanke K et al. *Stem Cell Reports*, 2014)を基盤に、さらなる条件検討を行った。その結果、骨芽細胞への分化誘導後、7日間 inducer なしに培養することで、骨細胞まで分化することが判明した(図1)。本プロトコルを用いた二次元培養と三次元培養において、遺伝子発現を RT-qPCR 法を用いて比較した。その結果、三次元培養により骨芽細胞中

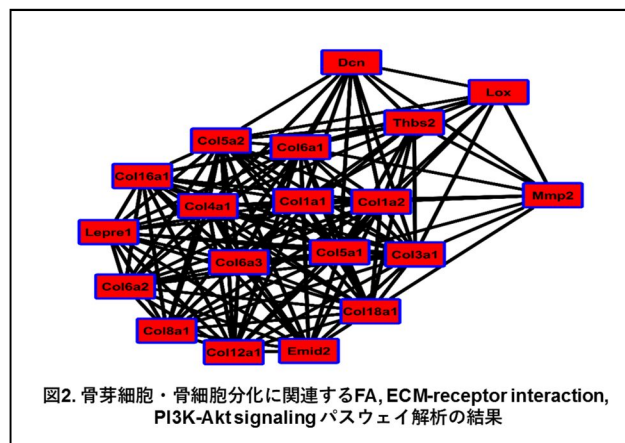
期の分化マーカーである Ibsp だけでなく、骨細胞分化マーカーの Dmp1 や Sost の発現が有意に上昇した。重要なことに、RANKL をコードする遺伝子 Tnfsf11 の発現も三次元培養により誘導が亢進した。また、石灰化組織を染める von kossa 染色の結果、3次元培養組織において石灰化沈着が確認された。以上より、従来の方法で取得可能であった、骨格系前駆細胞、前骨芽細胞、骨芽細胞前駆細胞、および成熟骨芽細胞に加えて、新たに骨細胞への分化誘導法の確立が確認された。



(2)骨芽細胞・骨細胞分化系譜における網羅的遺伝子発現解析

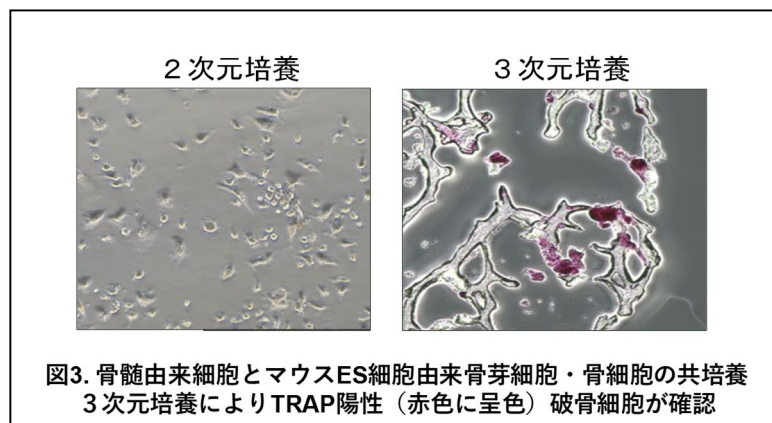
マウス ES 細胞から骨芽細胞・骨細胞系譜への各細胞分化段階における網羅的遺伝子発現解析を、マイクロアレイを用いて行った。これまでに確立した各分化段階（骨格系前駆細胞、前骨芽細胞、骨芽細胞前駆細胞、成熟骨芽細胞および骨細胞）の細胞集団において、total RNA を回収後、実験に用いた。その結果、骨芽細胞分化に伴いマーカー遺伝子（Col1a1, Runx2, Ibsp および Sp7）の発現上昇が確認された。

次に、Tnfsf11 の発現上昇が認められた成熟骨芽細胞の時期に注目し、その分化段階において発現が有意に変化する遺伝子群をバイオインフォマティクス解析により同定した。その結果、615 個の有意な発現上昇遺伝子と 551 個の有意な発現減少遺伝子が認められた。これらの変動遺伝子群を用いた Gene ontology 解析の結果、Focal adhesion、ECM-receptor interaction などを含む複数のシグナルパスウェイの関与の可能性が明らかになった（図2）。変動遺伝子群には、シグナルパスウェイのリガンド因子や、細胞外分泌タンパク質をコードする遺伝子も含まれており、これらの遺伝子は、骨芽細胞成熟に伴いその発現が上昇し、破骨細胞の分化を調整する可能性が示された。



(3)骨芽細胞・骨細胞と破骨細胞の三次元共培養法の確立と新規因子の検証実験

これまでに得られた新規破骨細胞分化誘導因子の機能を検証するため、骨芽細胞・骨細胞と破骨細胞の三次元共培養法の確立を試みた。(1)で最適化したプロトコールを用いて、マウス ES 細胞由来三次元骨組織を作製した。ここにマウス骨髄由来血球系細胞を共培養した。酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（Tartrate-Resistant Acid Phosphatase ; TRAP）染色の結果、TRAP 陽性の破骨細胞が確認された（図3）。



以上より、本研究により確立された三次元培養系を用いることで骨芽細胞・骨細胞と破骨細胞のカップリング機構が再現できる可能性が示された。現在、同定したシグナル因子の活性化剤および細胞外分泌タンパク質を用いて、破骨細胞分化に対する効果の検証を進めている。本研究を通して、新規破骨細胞制御因子の同定が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zujur Denise, Kanke Kosuke, Onodera Shoko, Tani Shoichiro, Lai Jenny, Azuma Toshifumi, Xin Xiaonan, Lichtler Alexander C., Rowe David W., Saito Taku, Tanaka Sakae, Masaki Hideki, Nakauchi Hiromitsu, Chung Ung-il, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 19 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.010	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

1. 著者名 Qi Pan, Ohba Shinsuke, Hara Yuichi, Fuke Masaya, Ogawa Takayuki, Ohta Seiichi, Ito Taichi	4. 巻 189
2. 論文標題 Fabrication of calcium phosphate-loaded carboxymethyl cellulose non-woven sheets for bone regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 322 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carbpol.2018.02.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zujur Denise, Kanke Kosuke, Lichtler Alexander C., Hojo Hironori, Chung Ung-il, Ohba Shinsuke	4. 巻 3
2. 論文標題 Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 e1602875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.1602875	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ohba S
2. 発表標題 Identification of gene regulatory landscape in skeletal formation and maintenance
3. 学会等名 Japan - Latin America Academic Conference 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
研究 分担者	大庭 伸介 (Ohba Shinsuke) (20466733)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授 (12601)	
研究 分担者	北條 宏徳 (Hojo Hironori) (80788422)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教 (12601)	
研究 分担者	菅家 康介 (Kanke Kosuke) (90779810)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	