

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19737

研究課題名（和文）破骨細胞をモデルとしたリン脂質動態による細胞融合制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism for cell fusion based on phospholipid dynamics in osteoclasts

研究代表者

入江 敦（IRIE, Atsushi）

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：10280786

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：破骨細胞前駆体が細胞融合して成熟破骨細胞となる際に、リン脂質の一種であるホスファチジルエタノールアミンの生合成、ならびに局在変化といった動的変化が起こる。筋芽細胞をはじめとする他の細胞融合系においては、脂質動態が観察されるものの、破骨細胞に比べて動的変化は小さく、破骨細胞における脂質動態は破骨細胞に特有の現象である可能性が見出された。さらに、我々が見出した脂質動態分子を骨疾患治療の標的とする目的で、我々は核酸医薬に注目して、その基盤となる研究を行った。その結果、カチオン性人工オリゴ糖とホスホロチオエート修飾型核酸を組み合わせることにより、siRNAを飛躍的に安定化できる手法を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、破骨細胞と破骨細胞以外の細胞融合系の脂質動態について比較した初めての研究であり、本研究によって、それぞれの融合系は脂質動態に関して異なった機構を用いている可能性が高いことが示唆された。今後、破骨細胞特異的な脂質動態に焦点をあてて研究を進展させることが、破骨細胞融合機構のさらなる解明につながるものと考えられる。また、本研究によってsiRNAの新しい安定化手法が見出された。核酸医薬品は、新しい世代の創薬ツールとして注目されているが、生体内における安定性という点では改善すべき点が多い。本研究はsiRNA医薬品の安定化の一助になる可能性があり、新しい骨代謝疾患治療薬への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Osteoclasts, responsible for bone resorption, are formed by cell-cell fusion of mononuclear pre-osteoclasts. We have found that rearrangement of phosphatidylethanolamine (PE) in the plasma membrane is increased during osteoclastogenesis. Although the PE dynamics in cell-cell fusion were also observed in other cell fusion phenomena, e.g., myoblasts and multinuclear macrophages, their redistribution of PE was less effective than that was detected in osteoclasts. These results suggest that the PE dynamics required for cell-cell fusion in osteoclasts are unique for osteoclastogenesis. In addition, we have developed a new strategy for siRNA stabilisation for future application of the lipid-related molecules involved in osteoclast fusion. We have found that an artificial cationic oligosaccharide combined with phosphorothioate linkages strongly improves siRNA stability.

研究分野：生化学

キーワード：破骨細胞 細胞融合 siRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内で骨吸収を担う破骨細胞は、分化の最終段階において単核の破骨細胞前駆細胞同士が細胞融合することによって、多核の成熟破骨細胞となる。破骨細胞融合機構については、未だに多くが未解明な状態で残されているが、近年、我々の研究により、破骨細胞融合の際に細胞膜リン脂質の動的変化が起こり、細胞融合機構の一翼を担っていることが明らかとなっている。生体内では、破骨細胞以外にも細胞融合を起こす細胞系がいくつか知られているが、未だに種々の細胞融合現象に共通の分子機構が働いているか否かについては、統一された見解が得られていない。

(2) 破骨細胞は、骨粗鬆症や関節リウマチといった骨疾患の増悪因子であり、破骨細胞形成を抑制することが、これら骨疾患の有効な治療方法となる可能性がある。しかし、現状では我々が見出した破骨細胞融合に関わる脂質関連分子が、骨疾患治療のターゲットとなりうるかどうかは不明である。

### 2. 研究の目的

(1) 破骨細胞の分化過程において、細胞膜二重層内層に局在しているホスファチジルエタノールアミン(PE)が細胞膜外層に移行し、この脂質の動的変化が破骨細胞融合に必要となる。破骨細胞と同様に細胞融合することが知られている筋芽細胞や多核マクロファージにおいて、破骨細胞で観察された脂質動態機構が働いているかどうか明らかにする。

(2) 破骨細胞融合に関わる脂質関連分子による骨疾患の治療方法の一つとして、これら分子の発現を siRNA によって抑制することが考えられる。しかし、siRNA は生体内で分解されやすい欠点があり、我々の意図する治療方法の開発の障害となっている。そこで、将来的な siRNA による骨疾患治療を目指して、その基盤となる siRNA の安定性の改善方法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

マウスより単離した骨髄細胞を M-CSF と TGF- $\beta$ 存在下 3 日間培養してマクロファージ様前駆体を得た。この細胞を RANKL と M-CSF 存在下培養して成熟破骨細胞を得た。一方、この前駆細胞を GM-CSF 存在下培養することにより、多核マクロファージを得た。さらに、マウス筋組織より単離した筋芽細胞を、栄養飢餓培地で培養することによって細胞融合した成熟筋管細胞を得た。

#### (2) 蛍光顕微鏡観察

細胞表面上の PE は、PE 結合性ペプチド Ro09-0198 をストレプトアビジン-ビオチン化(SA-Bio-Ro09-0198)した後に細胞に添加し、細胞を固定化後、FITC 標識化抗 SA 抗体を用いて可視化し、蛍光強度を定量した。

#### (3) 定量的 PCR

細胞から全 RNA を単離し、逆転写酵素により cDNA を合成した。これを鋳型にして定量的 PCR を行い、遺伝子発現量を定量した。

#### (4) siRNA の生物学的安定性測定

siRNA を血清と混和したのち、37 °C でインキュベートした。経時的にサンプリングして、サンプル内に残存する siRNA をポリアクリルアミド電気泳動で分離し、蛍光染色することにより定量した。

#### (5) siRNA の熱安定性測定

siRNA を 20 °C から 95 °C に 0.5 °C/分の割合で温度変化を加え熱変成した。この熱変成時に UV 吸光度を測定し、siRNA の RNA 二重鎖が一本鎖に解離する温度 ( $T_m$  値)を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 破骨細胞以外の細胞融合系における脂質動態

培養筋芽細胞の分化過程において、分化前後の細胞を顕微鏡観察により比較したところ、分化後の細胞融合した筋芽細胞において、細胞表面の PE が増加していることが明らかとなった。次に、マクロファージについて同様の検討を行ったところ、細胞融合した多核マクロ

ァージにおいて、細胞膜表面の PE が増加することが確認された。しかし、破骨細胞の分化融合過程において、細胞膜表面の PE が大きく増加するのに対して、筋芽細胞やマクロファージの融合系では PE の増加量は大きくはなかった。また機能的解析によって、破骨細胞融合の際には、PE 動態が融合に必要なという結果を我々は得ていたが、筋芽細胞や多核マクロファージにおいては、現状では PE 動態が融合の必要条件であると確認できる結果を得ることができなかった。

破骨細胞が細胞融合する際には、脂質輸送トランスポーター分子の ABCB4 と ABCG1、ならびに脂質合成酵素の LPEAT2 が PE 動態の責任分子である。マクロファージ融合系において、これら脂質関連分子遺伝子の発現を確認したところ、ABCG1 の発現を見出すことができたが、分化過程における発現の上昇は見られず、さらに、他の分子の発現量も弱かった。また、筋芽細胞においても、破骨細胞融合で見出された脂質動態関連分子の明確な発現量の変動は観察されなかった。したがって、破骨細胞とは別の分子によって、脂質動態が起こっている可能性が考えられる。

以上の結果より、破骨細胞以外の細胞融合系において、PE の局在変化や量的変化といった脂質動態が起こるものの、破骨細胞に比べて小さな動きとなっていることが明らかとなった。このように、種々の細胞融合過程において共通の脂質動態が起こっているという我々が当初予想していた仮説を裏付ける結果とはならなかった。破骨細胞融合時には膜表面上に PE が局在した無数の偽足様突起が伸長し、隣り合う細胞の偽足様突起が接触することにより細胞融合が起こっている。このことが、破骨細胞融合において非常にダイナミックに脂質動態が起こる要因の一つと想像されるが、一方、筋芽細胞融合や多核マクロファージにおいては、それ程大きな細胞膜の動きがなくても細胞が融合しており、破骨細胞に比して大きな PE 動態を必要としない可能性が考えられる。

## (2) カチオン性人工オリゴ糖分子による新しい siRNA 安定化手法の開発

破骨細胞は骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨疾患の増悪因子の一つであり、我々が見出した破骨細胞融合の脂質動態を引き起こす分子が、骨疾患の新しい治療ターゲットになるのではないかと考え、治療へのアプローチの方法を模索した。その際、本研究課題開始当初は想定していなかったことではあるが、核酸医薬の一種の siRNA によって脂質動態分子の遺伝子発現を抑制することを着想し、siRNA 医薬品の研究グループ（東京理科大学薬学部・和田猛研究室）と共同研究を開始した。siRNA は有望な創薬ツールではあるものの、生体内で容易に分解されやすい欠点があり、我々は性急に骨疾患への応用研究を行うのではなく、まずは siRNA の安定化方法を開発することが最優先と考えて研究を行った。

和田研究室が開発した siRNA 安定化分子であるカチオン性人工オリゴ糖・オリゴジアミノガラクトース 4 量体 (ODAGa14) について、種々の siRNA を用いて siRNA の生物学的安定性を解析した。siRNA に ODAGa14 を添加して、血清中における分解速度を測定したところ、解析した全ての siRNA において分解速度が遅くなっており、生物学的安定性が向上することが明らかとなった。

siRNA に 2'-O-メチルやホスホロチオエートといった化学修飾を加えて、ODAGa14 による安定化効果を解析したところ、未修飾型 siRNA に比べて生物学的安定性が向上し、特にホスホロチオエート修飾した RNA が、ODAGa14 によって顕著に安定化された。

siRNA の  $T_m$  値を測定することにより熱安定性を解析したところ、ODAGa14 は siRNA の  $T_m$  値を上昇する効果を示した。 $T_m$  値の上昇は特にホスホロチオエート化した RNA において顕著であり、ホスホロチオエート修飾と ODAGa14 の組み合わせが、熱安定性の向上に非常に有効であることがわかった。

ホスホロチオエート化した RNA 二重鎖は、未修飾型 RNA に比べて、ODAGa14 への結合親和性が強く、このことが、RNA 二重鎖とホスホロチオエート修飾の組み合わせによって生物学的安定性や熱安定性が向上する要因と考えられる。

siRNA を細胞に導入し、遺伝子発現抑制活性を測定したところ、ODAGa14 は、未修飾、修飾型いずれの RNA の遺伝子発現抑制活性にも影響を及ぼさなかった。

ODAGa14 は細胞毒性を示すことなく、siRNA を安定化することが明らかとなった。

以上の結果から、ODAGa14 は、特にホスホロチオエート修飾と組み合わせることにより、既存の化学修飾を上回る siRNA 安定化効果を示すことが明らかとなった。また、ODAGa14 は siRNA の遺伝子発現抑制活性を妨げることなく、細胞毒性を示すこともないことから、非常に有望な siRNA 安定化手法と言える。この研究では、我々が目標としている in vivo 投与、特に骨疾患治療への応用実験までは達成できなかったため、この点については今後の課題として残った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Atsushi Irie, Kazuki Sato, Rintaro Iwata Hara, Takeshi Wada, Futoshi Shibasaki	4. 巻 10
2. 論文標題 An artificial cationic oligosaccharide combined with phosphorothioate linkages strongly improves siRNA stability.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71896-w	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 -

1. 著者名 Atsushi Irie, Kei Yamamoto, Yoshimi Miki, Makoto Murakami	4. 巻 7
2. 論文標題 Phosphatidylethanolamine dynamics are required for osteoclast fusion.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 46715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/sprep46715	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 入江 敦、佐藤一樹、原倫太郎、和田 猛、芝崎 太
2. 発表標題 カチオン性人工オリゴ糖とホスホロチオエート修飾の組み合わせによる新しいsiRNA安定化方法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 入江 敦、佐藤一樹、原倫太郎、和田 猛、芝崎 太
2. 発表標題 カチオン性人工オリゴ糖とホスホロチオエート修飾型核酸の組み合わせによるsiRNAの安定化
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 入江 敦、佐藤一樹、原倫太郎、和田 猛、芝崎 太
2. 発表標題 カチオン性人工オリゴ糖と修飾型核酸の組み合わせによるsiRNAの安定化
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入江 敦、山本 圭、三木寿美、武富芳隆、村上 誠
2. 発表標題 破骨細胞における膜リン脂質の代謝動態
3. 学会等名 第59回日本脂質生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江 敦
2. 発表標題 リン脂質動態による破骨細胞融合機構の解明
3. 学会等名 第17回 Conference for BioSignal and Medicine
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 入江 敦
2. 発表標題 リン脂質動態に基づく破骨細胞融合機構の解明
3. 学会等名 首都大学東京バイオコンファレンス 2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 カチオン性人工オリゴ糖による二重鎖RNAの安定化	発明者 芝崎 太、入江 敦、和田 猛、原倫 太郎、佐藤一樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/034105	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 カチオン性人工オリゴ糖による二重鎖RNAの安定化	発明者 芝崎 太、入江 敦、和田 猛、原倫 太郎、佐藤一樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-204172	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

(公財) 東京都医学総合研究所ホームページ Topics2020 <a href="https://www.igakuken.or.jp/topics/2020/0909.html">https://www.igakuken.or.jp/topics/2020/0909.html</a>  EurekaAlert! Science News Releases "A new strategy for siRNA stabilization by an artificial cationic oligosaccharide" <a href="https://www.eurekaalert.org/pub_releases/2020-10/tmio-ans101620.php">https://www.eurekaalert.org/pub_releases/2020-10/tmio-ans101620.php</a>  (公財) 東京都医学総合研究所ホームページ Topics2017 <a href="http://www.igakuken.or.jp/topics/2017/0424.html">http://www.igakuken.or.jp/topics/2017/0424.html</a>  日本骨代謝学会ホームページ 「1st Autor」 <a href="http://www.jsbmr.jp/1st_author/271_airie.html">http://www.jsbmr.jp/1st_author/271_airie.html</a>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------