

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09050

研究課題名(和文) OSTNが仲介する骨膜依存的な海綿骨形成機構の解明

研究課題名(英文) Periosteum-dependent trabecular bone formation mediated by Osteocrin

研究代表者

高野 晴子 (Haruko, Takano)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員

研究者番号：40532891

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)：骨膜分泌性因子Osteocrin(OSTN)のKOマウスでは皮質骨だけでなく海綿骨量の減少も認められたが、この表現型は骨膜の異常のみで説明できない。本研究では、細胞性経路と血行性経路の二つの可能性について検証した。本研究からOSTNは血行性経路により骨細胞分化を促進している可能性が高いことがわかった。OSTNは全てのナトリウム利尿ペプチドのクリアランス受容体NPR3にのみ結合し、NPR3によるCNPの分解を抑制すると考えられる。骨膜初代培養細胞を用いてCNPシグナルが骨分化を促進することを本研究で明らかにした。また、血行性経路を裏付ける骨膜血管についてwhole-mount染色により明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CNP経路は軟骨マトリックス合成を促進するために、軟骨の増殖肥大化を促進するが、骨組織そのものに対するCNPの作用を解析した論文は数報しかない。またCNPトランスジェニックマウスの骨代謝が促進しているという報告があるが、その機序は分かっていない。合成CNPの軟骨無形成症への応用に向けた臨床試験も想定されることから、CNPの骨に対する生理作用の解明は喫緊の課題である。以上のことから、本研究で明らかになったCNPの骨細胞分化促進効果は学術的にも臨床医学的にも有用である。

研究成果の概要(英文)：Osteocrin is a secretory factor released from periosteal cell. OSTN-KO mice showed a decrease in cancellous bone mass as well as cortical bone, but the trabecular bone loss cannot be simply explained by periosteal abnormalities. In this study, we examined two possibilities, the cellular pathway and the blood stream pathway. As a result, it is likely that OSTN promotes osteogenic differentiation through blood stream. OSTN is thought to bind only to NPR3, which is the clearance receptor for all natriuretic peptides, and suppress the NPR3-induced degradation of CNP. In the present study, CNP signal promoted osteogenic differentiation in primary periosteal cultured cells. In addition, we have shown that the periosteal blood vessels that support the blood stream pathway by whole-mount imaging.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨膜 骨形成 骨芽細胞 ナトリウム利尿ペプチド Osteocrin CNP 海綿骨 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

OSTN は分泌性のタンパク質で発生期から成体に至るまで骨膜にほぼ特異的に発現する。OSTN 欠損マウスは、骨膜によって作られる皮質骨のみならず、骨髄側の海綿骨にも骨量減少を示した。さらに、OSTN 欠損マウスの骨量減少の原因を明らかにするために、骨前駆細胞が発現する転写因子 Osterix の免疫染色を行うと、成長板近傍の染色が減少していることを見出した。この結果から、OSTN 欠損マウスの海綿骨量の減少は、骨髄の骨前駆細胞の減少が原因であることがわかった。しかし、「骨の外に発現する OSTN が、如何に骨髄の骨前駆細胞の形成を制御するか」は単純には説明できない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、上記の発現部位と表現型の乖離を説明する機構として 細胞性経路と 血行性経路の二つの可能性について検証し、いずれの経路においても鍵となる 骨血管の解剖学的詳細を明らかにした。

3. 研究の方法 下記に示す研究計画に基づき解析した。

研究計画 1) 骨膜が海綿骨の形成に必要であるかを明らかにする

骨膜に特異的に発現する Periostin (POSTN) プロモーターを用いてジフテリアトキシン(DT)を POSTN プロモーター下で誘導性に発現させ、骨膜細胞の海綿骨形成への寄与を明らかにする。

研究計画 2) 細胞性経路の検証

骨膜初代培養細胞を用いて、CNP シグナルが骨系譜への運命決定を促進するか、CNP シグナルの減弱が OSTN 欠損マウスの骨量減少を説明するかを *in vivo* にて明らかにする。さらに骨髄の骨前駆細胞が骨膜由来であることを明らかにする。

研究計画 3) 血行性経路の検証

骨髄の骨前駆細胞が CNP や OSTN の標的となり得るかを明らかにする。

研究計画 4) 骨血管の解剖学的詳細を明らかにする

骨血管を可視化して OSTN 分泌細胞と皮質骨血管との位置的な関係性等を明らかにする。

4. 研究成果

研究計画 1) 骨膜が海綿骨の形成に必要であるかを明らかにする。

当初、骨膜に特異的に発現する POSTN プロモーターを用いて Diphtheria toxin (DT)を誘導性に発現させ、骨膜細胞の海綿骨形成への寄与を明らかにしようとしていた。しかし、他グループの報告から骨膜の骨系幹細胞すなわち Skeletal stem cell (SSC)の一部が *Cathepsin K (Ctsk)*系譜に由来することが明らかになった[Nature, 562(7225), 133-139 (2018)]。従って *Ctsk* 系譜細胞(*Ctsk-Cre* マウス)にて OSTN の転写抑制因子である FoxO1 の恒常的活性変異体 (*FoxO1^{AAA}*) を発現させて (*Ctsk-Cre X Lox-STOP-Lox-FoxO1^{AAA}*)、骨膜特異的に OSTN の発現抑制を行なった。しかし、このマウスは極めて重篤な大理石病となることが明らかになった。生後 3 週には脛骨や大腿骨の短縮、骨髄の縮小、歯の欠損が認められ、一ヶ月程度で全個体が致死となった(図 1)。*Ctsk* プロモーターは破骨細胞系譜でも活性化されていることから、FoxO1 が破骨細胞形成に極めて重要な働きをすることが明らかになった。一方、骨膜での OSTN の発現は顕著に抑制されており FoxO1 による OSTN の発現抑制が *in vivo* でも証明された。しかし、海綿骨の指標となる Bone volume/Total volume (BV/TV)は上記変異体発現マウスでは 80%程度と、非常に高いことから、海綿骨形成に関する解析は極めて困難となった。したがって、骨膜に由来する OSTN の海綿骨形成への関与を結論づけるには至らなかった。近年骨膜研究は日進月歩であり、今後更なる発展を基にして新たな *Cre* 系統マウスの創出が期待される。

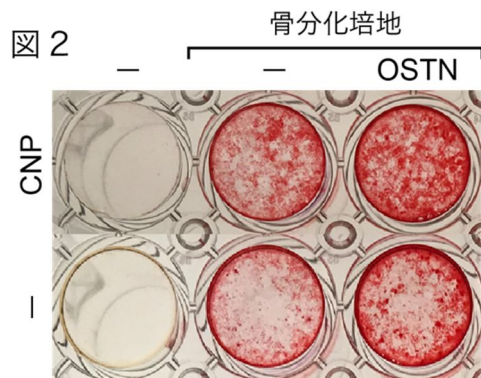


図 1 *Ctsk-Cre; CAG-FoxO1^{AAA}* マウスでは脛骨の短縮、歯および骨髄の欠損が認められ大理石病を呈する。

研究計画 2) 細胞性経路の検証

骨膜初代培養細胞を用いて CNP および OSTN シグナルが骨系譜への運命決定を促進するかを明らかにした。骨膜初代培養細胞を骨分化培地中で培養すると 24 時間後から Alkaline phosphatase

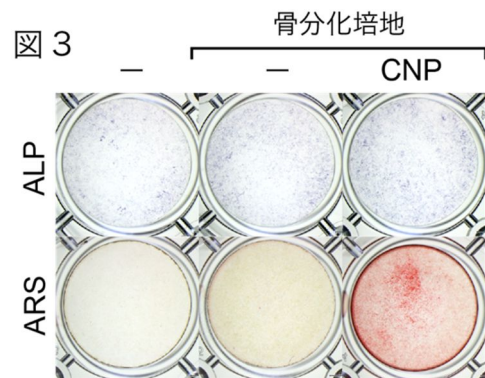
(ALP)陽性細胞が出現し始め、6日からアリザリンレッドSによるカルシウムの沈着 (ARS)が認められる。上記の分化過程において CNP や CNP 受容体の GC-B/NPR2 の発現は増強するが、一方で NPR3 の発現は一定であった。従って、CNP-GC-B シグナルが骨系譜分化を促進的に制御することが示唆された。さらに、分化培地中に合成ペプチド CNP-22 を添加すると骨系譜への分化が促進され、ALP やカルシウムの沈着、骨分化マーカーの発現が増強された。加えて、OSTN を CNP と同時に作用させると OSTN 単独での骨分化促進効果は低いものの、OSTN と CNP の両方を作用させると顕著に骨分化が促進された(図 2)。従って、OSTN は CNP を増強することによって骨分化を促進している可能性が示唆される。さらに上記作用が CNP のクリアランス受容体である NPR3 の抑制に起因するかを明らかにするために、骨膜細胞にて NPR3 をノックダウンしたところ、ALP やカルシウムの沈着は促進され、OSTN に依存する分化促進効果はキャンセルされた。CNP のセカンドメッセンジャーとして cGMP が想定されるので、OSTN と CNP の協調的作用を cGMP 産生量から検討すると、OSTN 単独刺激では cGMP が産生されなかったのに対して、CNP を共刺激すると顕著な cGMP 増加を認めた。以上のことから、骨膜細胞にて OSTN が NPR3 を抑制して、CNP-cGMP シグナル経路が骨細胞分化を促進することがわかった。上記シグナルの低下が OSTN 欠損マウスの骨量減少を説明するかを明らかにするために CNP-Tg マウスと交配させて骨量を検証したが、CNP-Tg マウスは異常な骨伸長を伴った関節炎を発症しており、正常な骨状態ではなかったために逆に骨量が減少した。今後、CNP の効果を正確に明らかにするためには組織特異的な欠損マウス等を用いた詳細な解析が必要となる。



骨膜細胞は適切な条件下で培養すると骨芽細胞へと分化する。CNP-OSTN は協調的に上記分化を促進する。

研究計画 3) 血行性経路の検証

骨髄の骨前駆細胞が骨膜由来であるか Nestin 系譜細胞を用いて解明する予定であったが、緊急事態宣言に伴ったマウス管理室の閉鎖があったため *in vivo* の計画を断念した。代わりとして、骨髄前駆細胞のモデルとして用いられているマウス C3H10T1/2 細胞を使用して解析を行なった(図 3)。その結果、CNP は上記細胞を用いた場合でも骨分化促進効果を発揮した。従って、OSTN が骨髄内でも骨分化を直接的に促進する血行性経路が有力である可能性が考えられた。実際に、OSTN 欠損マウスにて形態計測による解析を行うと、骨芽細胞量に有意差を認めなかったが、海綿骨での骨形成速度、石灰化速度が減少しており、このことは OSTN が骨芽細胞の活性を直接的に制御している可能性を示唆している。

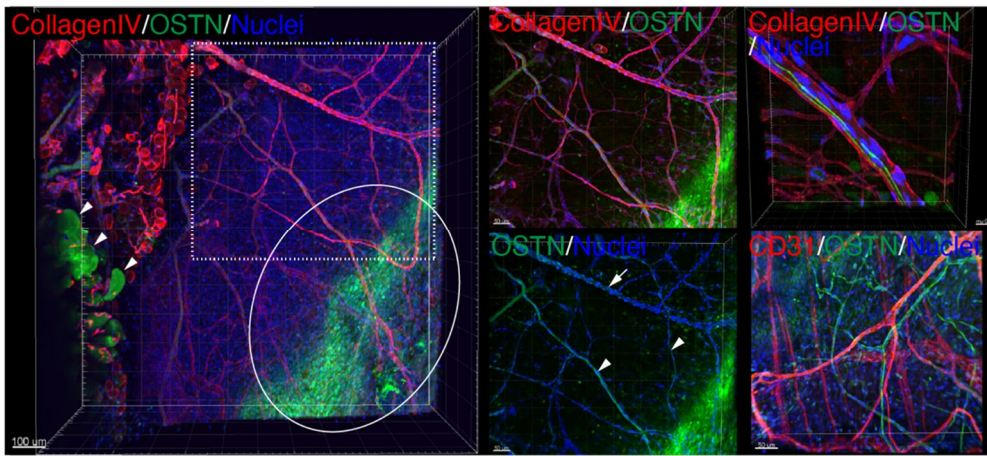


CNP は C3H10T1/2 細胞の骨芽細胞分化も促進する。

研究計画 4) 骨血管の解剖学的詳細を明らかにする。

研究計画 1-3 までの成果から OSTN による海綿骨形成への寄与は血行性経路が指示される。すなわち、OSTN 発現細胞は骨膜血管から骨の内部へと OSTN を分泌しているのではないかと考えられる。そこで、OSTN 発現細胞と骨膜血管とを免疫染色により可視化し、3D イメージングを行なった。OSTN 陽性細胞は血管とは異なる CollagenIV 陽性のローブ状構造と OSTN を強く発現する島状に存在する細胞群とに認められた(図 4)。OSTN 強発現細胞群の直下には血管構造が認められ、非常に近接した状態にあることがわかった。一方、CollagenIV 陽性ローブ状構造の詳細は現在全く不明であり、今後さらに研究を進展させていく必要がある。

図 4



OSTN の発現は島状の強発現細胞群 (白円) と血管 (矢印) とは異なるロープ状の構造 (矢頭) に認められる。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ayano Chiba , Haruko Watanabe-Takano, Takahiro Miyazaki, Naoki Mochizuki	4. 巻 75
2. 論文標題 Cardiomyokines from the heart	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Mol Life Sci .	6. 最初と最後の頁 1349-1362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-017-2723-6.	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 Ogasawara T, Kohashi Y, Ikari J, Taniguchi T, Tsuruoka N, Watanabe-Takano H, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Hirata H, Fukushima Y, Fukuda T, Kurasawa K, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Allergic TH2 Response Governed by B-Cell Lymphoma 6 Function in Naturally Occurring Memory Phenotype CD4+ T Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 750
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.00750.	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 Takahashi K, Takahashi H, Furuichi T, Toyota M, Furutani-Seiki M, Kobayashi T, Watanabe-Takano H, Shinohara M, Numaga-Tomita T, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Naruse K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Gravity sensing in plant and animal cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Microgravity.	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41526-020-00130-8.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Haruko Takano
2. 発表標題 Mechanical load-regulated expression of periosteal Osteocrin promotes bone growth
3. 学会等名 The 16th Bone Biology Forum
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野晴子
2. 発表標題 荷重が調節する Osteocrin は骨成長を促進する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野晴子
2. 発表標題 Osteocrinは長管骨形成を制御する骨膜ホルモンである
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
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

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