

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09503

研究課題名(和文) 骨形成転換機構に関する破骨細胞由来因子の同定および個体での役割解明

研究課題名(英文) Identification of MSC migration factor secreted by osteoclasts in vitro and in vivo

研究代表者

中浜 健一 (Nakahama, Ken-ichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60281515

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)：骨は常に新しい細胞で置き換わっている。しかし、骨吸収から骨形成の転換が起こるきっかけについては分かっていない。我々は軟組織中に破骨細胞様細胞を分化させることに成功し、その領域に骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ陽性細胞を認めた。そのため骨吸収が終わり骨形成に移行する際に骨形成を担う細胞を吸収窩に遊走させるのは破骨細胞由来液性因子であると考えた。in vitroで分化させた破骨細胞は間葉系幹細胞の遊走を促進した。破骨細胞が産生するスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)にもその遊走活性を見出した。現在S1P産生分泌に関わるSphk2ノックアウト細胞樹立を試みており、さらに研究を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症は超高齢化社会の日本においては重要な問題である。治療薬として、破骨細胞分化阻害薬は開発されているが、骨形成を促進させる効果を示したものはまだない。そこで、骨吸収から骨形成に転換する因子について研究を行い、破骨細胞が産生分泌するS1Pに骨形成細胞の遊走因子であることが示唆され、今後の骨粗鬆症の治療に役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bone is always renewed by new bone forming cells after bone resorption. It is not known the mechanism by which the bone forming cells migrate to bone resorption site after the resorption. We found that alkaline phosphatase-positive bone forming cells exist around osteoclast-like cell differentiated in soft tissues. Therefore, we hypothesized that osteoclast-derived fluid factor will attract bone forming cells. In our experiment, osteoclast but not macrophage secreted migration factor for mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro. Furthermore, MSCs migration was evoked by sphingosine-1-phosphate (S1P) gradient. We are trying to establish knockout cell line of Sphk2, sphingosine kinase 2. Sphk2 KO cell will be an essential tool to investigate precise mechanism by which osteoblast forming cell migrate in bone resorption area.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：破骨細胞 間葉系幹細胞 遊走因子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨は1年に約25%が新しい細胞で置き換わっていると言われている。その代謝を担っているのが骨芽細胞と破骨細胞であることは良く知られており、破骨細胞が古い骨を溶解した後、その場所に骨芽細胞が遊走し骨基質を分泌して新しい骨を作る。その際に骨芽細胞は何を目印に遊走してくるのであろうか？現在、破骨細胞による骨吸収後、吸収窩の補填をおこなう骨芽細胞は吸収窩周囲の骨芽細胞または骨髄由来間葉系幹細胞が遊走してくると考えられている。骨吸収がおこなわれている局所には必ず破骨細胞が存在することから、我々は破骨細胞が骨芽細胞遊走因子を分泌する可能性考えた。

### 2. 研究の目的

我々は破骨細胞が骨芽細胞系細胞に対する遊走因子を分泌する可能性を調べることにした。本研究はその因子を同定し、*in vitro* および *in vivo* でその重要性を証明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) マウスの軟組織中で破骨細胞を分化させることによる異所性石灰化の誘導

RANKL と M-CSF を発現させた HeLa 細胞や MIH3T3 細胞またはマウス皮膚線維芽細胞を Rag1<sup>-/-</sup>マウスの背部に移植し、軟組織中で破骨細胞様細胞を分化させて異所性石灰化が起こるか否かについて実験を行った。

(2) 破骨細胞が分泌する骨芽細胞系遊走因子が間葉系幹細胞を遊走させる可能性を確かめるために、マウス由来間葉系幹細胞の培養を開始した。

(3) S1P が間葉系幹細胞遊走促進作用を有するかについて検討した。

(4) 破骨細胞から分泌される間葉系幹細胞遊走因子の候補が S1P (sphingosine 1-phosphate) 可能性を考え、データベース (BioGPS, <http://biogps.org/#goto=welcome>) より *Spns2* および *Sphk2* が S1P 合成分泌経路に関わることから、破骨細胞の前駆細胞として用いられる RAW264.7 細胞の *Sphk2* をノックアウトする試みを行なった。

### 4. 研究成果

(1) マウスの軟組織中で破骨細胞を分化させることによる異所性石灰化の誘導

RANKL, M-CSF 発現線維芽細胞の樹立

マウス皮膚よりマウス皮膚線維芽細胞(MDF)の培養をおこない、レトロウイルスによる遺伝子導入法を用いてRANKLとM-CSFを発現させた(MDF-RANKL+M-CSF)。MDF-RANKL+M-CSFが破骨細胞支持能を有するか否かをin vitroにおける骨髄細胞(BMC)と共培養することにより確かめた(未発表、図1)。図1に見られる様にMDF-RANKL+M-CSF + BMCでは多数の多核破骨細胞様細胞が認められた。

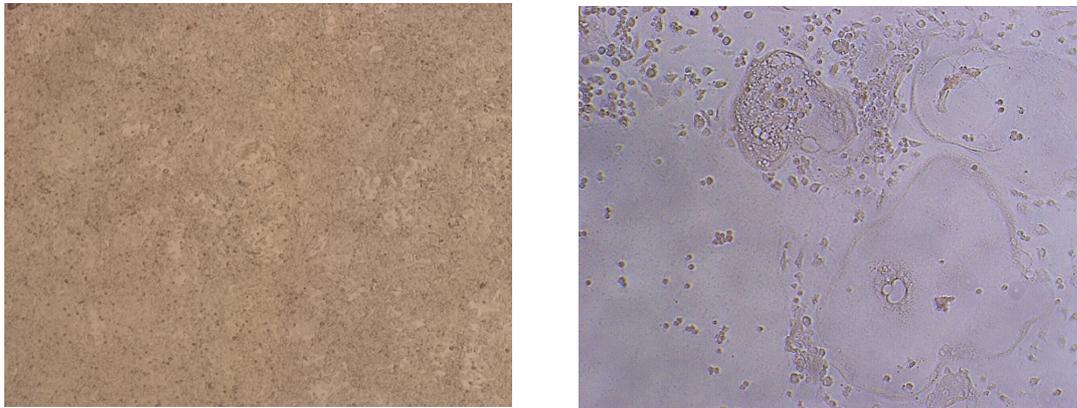


図1)

左、Control MDF + BMC

右、MDF-RANKL+M-CSF + BMC (多核破骨細胞様細胞が観察される)

#### RANKL, M-CSF 発現線維芽細胞の樹立

Control MDF およびMDF-RANKL+M-CSF を各  $5 \times 10^5$  個、コラーゲンスポンジ(Aterocollagen Sponge MIGHTY)に培養したのち、Ragl<sup>-/-</sup>マウスの背部皮下に移植し、経時的に観察した(未発表、図2)。

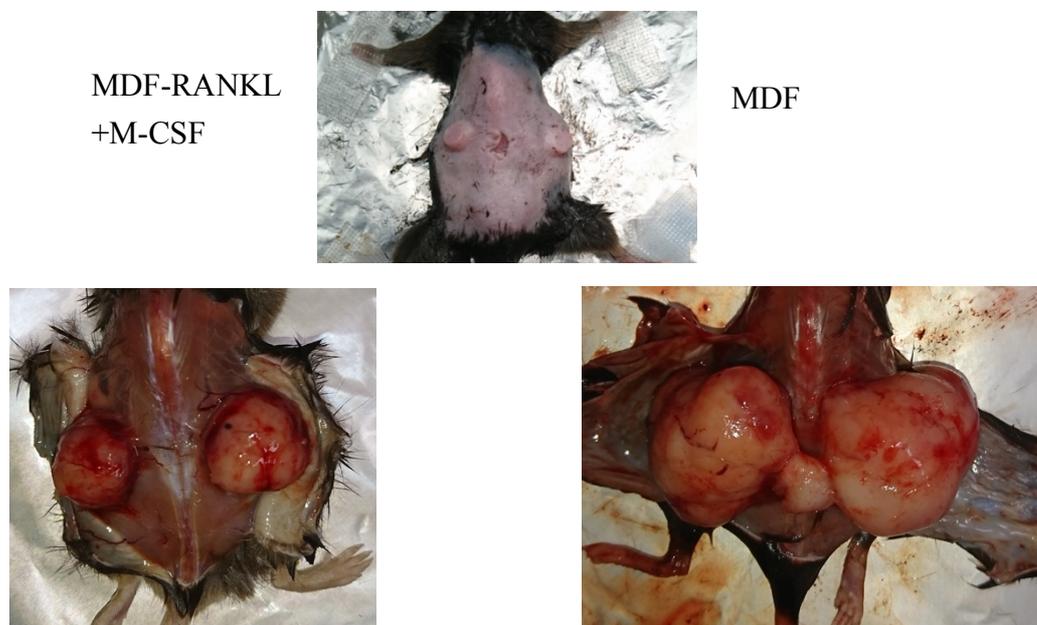


図2) 上、移植直後 ; 下左、2週後 ; 下右7週後

癌細胞ではなく、正常線維芽細胞を使用したにもかかわらず、移植組織の肥大化、脱落が認められた。そこで、移植する前にマイトマイシン処理を行ってみたが、in vivoでの長期の生存は難しく、現在もまだこの課題については検討中である。

(2) 破骨細胞が分泌する骨芽細胞系遊走因子が間葉系幹細胞を遊走させる可能性を確かめる。間葉系幹細胞は R26R-H2B-EGFP (理研、CDB0203K、cre recombinase 活性により細胞核で EGFP が発現する) と *osx-cre-GFP* (osterix promoter 依存的に cre recombinase を発現する) を交配し、得られた *osx-cre-GFP* 陽性の仔の骨髄から培養することにより得た。8 μm 穴の膜を有したカルチャーインサートを隔てて下層に骨髄由来マクロファージ(BMM)インサート内に間葉系幹細胞(MSC)を入れて、経時的に膜の下に遊走してくる MSC を観察した (未発表、図3)

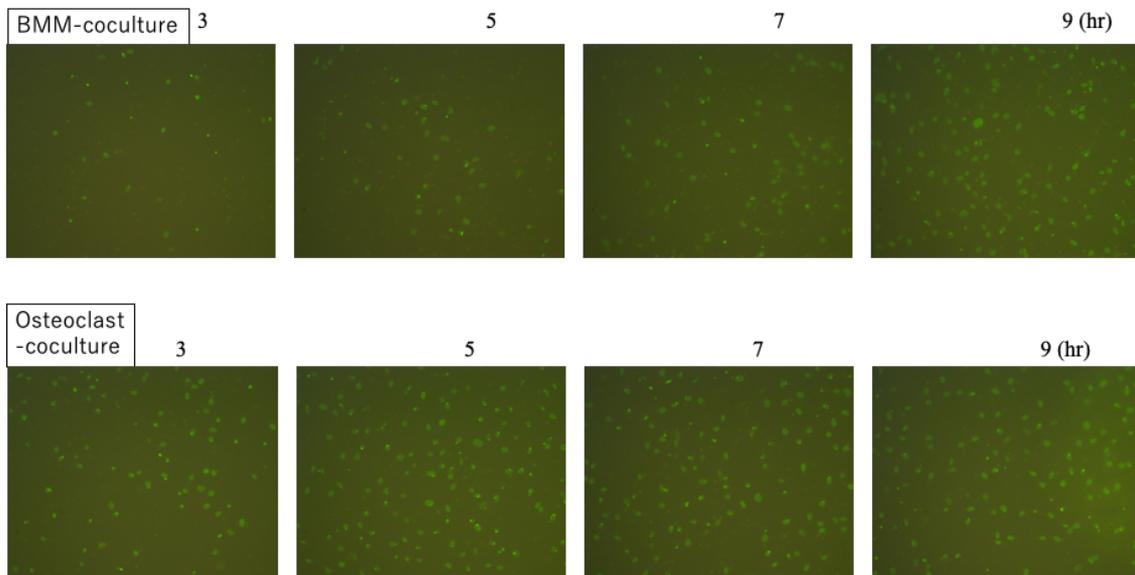


図3) 破骨細胞との共培養により遊走してくる MSC の数は多くなっている。

(3) 破骨細胞から分泌される間葉系幹細胞遊走因子の候補としての S1P の遊走能。カルチャーインサートを用いて、(2) 同様に S1P に対する MSC の遊走能を調べた (未発表、図4)。

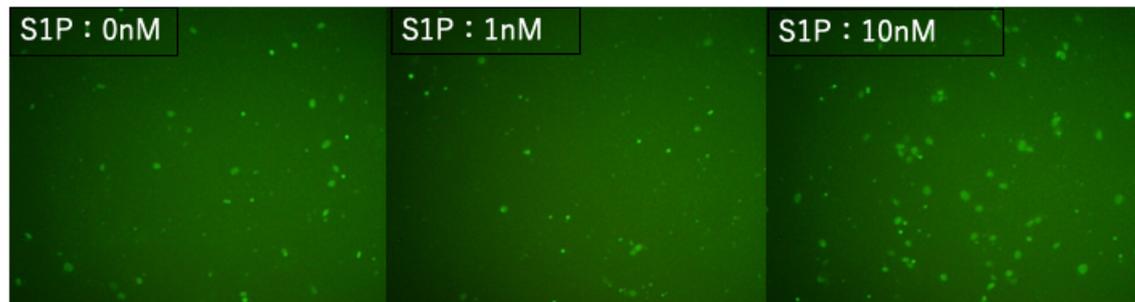


図4) S1P の濃度に依存して MSC の遊走が認められた。

(4) データーベース(BioGPS)より破骨細胞では *Spns2* および *Sphk2* が S1P 合成分泌経路に関わることから、破骨細胞の前駆細胞として用いられる RAW264.7 細胞の *Sphk2* を Crispr/Cas9 法を用いてノックアウトする試みを行なった。*Sphk2* に対するガイド RNA のターゲットを図5に示

Results: 0

Sequence name: NM\_203280.3 Mus musculus sphingosine kinase 2 (Sphk2), transcript variant 1, mRNA  
 PAM sequence: NGG  
 Specificity check: Mouse (Mus musculus) genome, GRCm38/mm10 (Dec, 2011)  
 Time: 2019-08-29 09:30:33

- Highlighted target positions (e.g., 45 - 67) indicate sequences that are highly specific and have fewer off-target hits.
- Target sequences with '0' in '20mer+PAM' (in number of target sites column) are shown in gray.
- Such sequences may possibly span over exon-exon junctions, so avoid using these.
- Target sequences with TTTTs are also shown in gray. Avoid TTTTs in gRNA vectors with pol III promoter.

show highly specific target only

position	target sequence	sequence information			restriction sites	number of target sites		
		GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer		20mer+PAM	12mer+PAM	8mer+PAM
5-27	+ GAGTCACATGAGCGGACGCGGCGGAGTTCGG (gRNA)	65.00 %	76.32 °C	-	AatII BsaHI	1 (detail)	1 (detail)	143 (detail)
476-496	+ CCAATCCTGCAGGGGAGGTTTCGG (gRNA)	60.00 %	77.57 °C	-		1 (detail)	1 (detail)	870 (detail)
481-503	- CCTGCACGGCGAGTTGGTTCCCT (gRNA)	60.00 %	77.81 °C	-		1 (detail)	1 (detail)	313 (detail)
494-516	+ TTTGGTTCCTACCGGCCAACGGG (gRNA)	55.00 %	77.57 °C	-	EaeI	1 (detail)	1 (detail)	565 (detail)
510-532	- CCAACGGCCCGGTTGGCCCTC (gRNA)	70.00 %	83.72 °C	-	BtgI	1 (detail)	1 (detail)	811 (detail)

される様に設計した (<http://crispr.dbcls.jp>)。Guide-it CRISPR/Cas9 system のマニュアルに従い、ガイド RNA、Cas9、tdTomato を発現するベクターを構築し、RAW264.7 細胞にリポフェクトアミン 2000 を用いてプラスミドを導

入した。翌日、tdTomato 陽性の細胞を 96 穴プレートに（1 細胞/1 穴）ソーティングした。目的の変異が入ったものを選択するために得られた単一細胞由来細胞株の DNA をシーケンスを実施しているが、今のところまだ得られていない。今後さらにクローンをスクリーニングする必要がある。

図 5) ガイド RNA target の検索

## 5. 主な発表論文等

なし

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miki Hirohito, Okito Asuka, Akiyama Masako, Ono Takashi, Tachikawa Noriko, Nakahama Ken-ichi	4. 巻 763
2. 論文標題 Genetic and epigenetic regulation of osteopontin by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in osteoblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145059 ~ 145059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2020.145059	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 劉 鴻鼎, 穠山 雅子, 中浜 健一
2. 発表標題 破骨細胞内cAMP上昇におけるGPR68の関与
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019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
研究協力者	三木 裕仁  (Miki Hirohito)		
研究協力者	劉 鴻鼎  (Hongding Liu)		

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