

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11019

研究課題名(和文)骨代謝を制御する骨細胞が分泌する膜微小胞による破骨細胞分化誘導機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of osteoclast differentiation by exosome isolated from mechanical stress-stimulated osteocyte.

研究代表者

伊藤 智広 (ITO, Tomohiro)

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：30435854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞や破骨細胞に指令を出す骨細胞はメカニカルストレス(以下MS)を感知すると、隣接する骨芽細胞や破骨細胞に効率的に情報を伝達し、骨代謝を制御する。本研究では、この情報伝達に細胞自身が分泌する膜小胞が深く関与しているのではないかと作業仮説を立てた。MSを負荷した骨細胞から分泌した膜小胞を未分化の前駆破骨細胞に添加したところ、破骨細胞の分化が誘導された。この分化誘導機構を検討したところ、MS負荷骨細胞分泌膜小胞にしか含まれない破骨細胞分化誘導関連タンパク質の存在を確認した。今後これらタンパク質による分化誘導機構についてさらに詳細に検討することで、骨のホメオスタシス機構について明らかにしたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちが日常生活活動する中で起きる骨代謝の基本機構である「まず骨が壊され、新しい骨が作られる」というホメオスタシス機構について様々な知見が報告されているが、未解明なところが多い。本研究では、成長期の体重増によるメカニカルストレスを受けた際の骨代謝時に骨細胞から分泌される膜小胞が深く関与していることを示すことができ、骨のホメオスタシス機構の一機構を明らかにできた点で学術的意義があった。また、骨代謝における膜小胞の役割(機能)を見出すことで、超高齢化社会の中で増える骨粗鬆症患者への治療薬への応用利用など発展性が期待できた点では社会的意義ある研究成果を導くことができたと考える。

研究成果の概要(英文)：Osteocyte, which is the most abundant cell in bone tissues, is well known as a mechanical stress (MS) receiving cell. During bone remodelling, bone resorption by osteoclasts precedes bone formation by osteoblasts. However, its mechanism is still unknown. In this study, we examined whether exosome released from osteocyte by MS stimulation are involved in osteoclast differentiation.

Though the vesicles isolated from mechanical stress-loaded MLO-Y4 cells had no effect against osteoblast differentiation, these vesicles significantly induced osteoclast differentiation. To characterize the mechanisms by which mechanical stress-loaded MLO-Y4 cell vesicles induces osteoclast differentiation in murine macrophage RAW264.7 cells, we analysed vesicle membrane and vesicle internal proteins by nano-LC-MS/MS-based shotgun proteomics. As a result, Protein X, CD9 and CD63 were only detected in mechanical stress-loaded MLO-Y4 cell vesicles.

研究分野：健康科学

キーワード：メカニカルストレス 骨細胞 破骨細胞分化 膜小胞 骨代謝 マイクロRNA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は超高齢化社会を迎え、ロコモティブシンドロームや長期臥床による廃用性骨粗鬆症患者が増加しており、高齢者が認知機能だけでなく身体機能の低下に至らない取り組みが求められている。その取り組みの一つとして、毎日の運動が推奨されている。これは、生体の組織が外界のメカニカルストレス感受後にその環境変化に適応するべく細胞内で相応の情報伝達を活性化し、自らの体を構築するためである。ヒトの生体基軸である骨は、動的平衡を保ちながらその年代に適した骨代謝を行っている。骨を壊す役割の破骨細胞と骨を作る骨芽細胞に指令を出す骨細胞はメカニカルストレスを感知すると、ギャップ結合によって連結した樹状突起により情報伝達するシステムと骨小腔と、骨細管の傍骨細胞間隙を用いた細胞外情報伝達システムを介して隣接する骨芽細胞や破骨細胞に効率的に情報を伝達するシステムによって、骨代謝を制御することが知られている。しかし、前述のようなメカニカルストレス感受後の骨代謝メカニズムは徐々に機構解明されつつあるものの、「細胞が如何にメカニカルストレスを感受し、どのような細胞情報伝達系が作動するのか」の問いに対する十分な理解には至っておらず、引き続き追究する必要がある。

### 2. 研究の目的

近年、生体基軸である骨の骨量維持を司る骨細胞や骨芽細胞、破骨細胞が分泌する膜小胞に内包されるマイクロRNA (以下 miRNA) の骨代謝制御機構が注目されている。申請者らは、これまでの研究にて、骨細胞にメカニカルストレスを与えることで分泌された膜小胞が破骨細胞の分化を誘導する現象を確認した。この結果から、申請者らは骨細胞が放出する膜小胞が破骨細胞の分化を優先させる一つの要因となり、「まず骨が壊され、新しい骨が作られる」というホメオスタシス機構を成り立たせているのではないかと考えた。そこで、本課題では、このメカニカルストレス負荷骨細胞分泌膜小胞の骨代謝における役割を明らかにするために、膜小胞の構造の解析と内包される破骨細胞分化関連因子を同定し、骨細胞分泌膜小胞が破骨細胞の分化に積極的に関与することによる骨代謝調節機構の新たな知見を示すとともに膜小胞構成成分の骨粗鬆症等の骨疾患への応用利用の可能性を探ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

マウス長骨由来骨細胞様株 MLO-Y4 細胞 (米国インディアナ大学 Lynda F. Bonewald 博士より分与提供) およびマウスマクロファージ細胞 RAW264.7 細胞 (国立研究開発法人国立長寿医療研究センター池田恭治博士より分与提供) 株はそれぞれ 10% エクソソームフリー牛胎児血清, 50 U/mL ペニシリン, 50 µg/mL ストレプトマイシンを含んだ MEM または DMEM 培地 (いずれも Invitrogen) にて培養した。

#### (2) メカニカルストレス負荷

骨細胞株 MLO-Y4 細胞を 3D スキャフォールド (GC 研究所) に  $1 \times 10^5$  cells/mL の密度で播種し、72 時間前培養を行った。その後、静水圧刺激装置 (ストレックス株式会社製 SPB-100) を用いて MLO-Y4 細胞を播種した 3D スキャフォールドに 1.5 MPa, 1 時間のメカニカルストレスを負荷した。

#### (3) メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞の調製

メカニカルストレスを負荷した培養細胞培地を回収し、 $15,000 \times g$ ,  $4^\circ C$ , 30 分間の遠心処理により細胞デブリスを除去した。得られた上清をさらに超遠心機 (ベックマンコウルター (株), Optima™ TLX) により  $100,000 \times g$ ,  $4^\circ C$ , 60 分間処理し、膜小胞を回収した。沈澱させた膜小胞をさらに PBS(-) を用いて懸濁回収し、qEV10 (35 nm, メイワフォーシス株式会社) カラムを用いたサイズ排除カラムクロマトグラフィーにより膜小胞を調製した。膜小胞の濃度および平均粒子径は、ナノ粒子解析システム NanoSight (日本カンタム・デザイン (株)) により測定した。

#### (4) メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞による破骨細胞分化誘導能

マウスマクロファージ RAW264.7 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL の密度で播種した 24 ウェルマルチプレートに終濃度が  $5 \times 10^6$  particles/mL となるようにメカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜を添加し、7 日間培養した。陽性対照として receptor activator of the NF-κB ligand (RANKL, 50 ng/mL), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF 10 ng/mL) を用いて破骨細胞へ分化誘導した。分化誘導の検証は、分化指標である酒石酸耐性産生ホスファターゼ (Tartrate-resistant Acid Phosphatase, TRACP) 活性の比色定量と Western Blot 法および定量的リアルタイム PCR 法による Nuclear factor of activated T cells 1 (NFATc1) および Dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) のタンパク質, mRNA の発現量をそれぞれ解析した。

#### (5) メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞の RAW264.7 細胞への取り込み

PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich) に含まれる PKH67 cell linker 溶液と Diluent C 溶液を混合し、PKH67 染色液 ( $4 \times 10^{-6}$  M) とした。膜小胞に PKH67 染色液を加え  $25^\circ C$ , 10 分間染色後、1% 牛血清アルブミン溶液により染色を停止させた。この染色膜小胞を予めマ

ウスマクロファージ RAW264.7 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL の密度で播種した LAB-TEK®II Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific) に添加後、24 時間 37°C で培養した。24 時間後、Hoechst33342 を終濃度が 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となりように加え、15 分間染色した。その後、ProLong™ Glass Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) をスライドに滴下し、カバーガラスを被せ、CoverGrip™ Sealant (コスモバイオ株式会社) を用いて固定した。膜小胞の取り込みは、蛍光顕微鏡 BZ-800 (キーエンス株式会社) により観察した。

#### (6) メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞の膜および内包タンパク質プロファイル解析

メカニカルストレスを負荷した骨細胞から分泌された膜小胞を回収し、M-PER Mammalian Protein Extract Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて小胞膜成分と内包物と分画した。小胞膜成分に分けた。タンパク質量として 10  $\mu\text{g}$  をタンパク質低吸着チューブに分取し、UltraPure™ water (Invitrogen) を用いて 100  $\mu\text{L}$  とした後、クロロホルム-メタノール沈殿法によりタンパク質を回収した。沈殿物の再溶解は膜タンパク質可溶性試薬 MPEX PTS 試薬 (GL サイエンス) をした。沈殿に MPEX 試薬 B 20  $\mu\text{L}$  を添加して十分にボルテックス後、95°C、5 分間加熱し、超音波浴槽にて 10 分間処理することで沈殿を完全に溶解した。100 mM ジチオスレイトール 1  $\mu\text{L}$  を添加し、37°C にて 1 時間静置後、550 mM ヨードアセトアミド溶液 1  $\mu\text{L}$  を添加し、遮光下でさらに 45 分間攪拌した。その後、MPEX 試薬 A 77  $\mu\text{L}$  を添加混合し、200 ng/ $\mu\text{L}$  トリプシン溶液 1  $\mu\text{L}$  を添加して 37°C にて一晚酵素消化を行なった。

酵素消化後、室温に戻し、酢酸エチル 100  $\mu\text{L}$  とトリフルオロ酢酸 (TFA) 1  $\mu\text{L}$  を添加した。1 分間ボルテックスした後、15,600 $\times\text{g}$ 、室温、2 分間遠心処理し、上層を除去した。下層を減圧濃縮機にて 50  $\mu\text{L}$  以下に濃縮し、0.1% TFA 含有 5% アセトニトリル溶液 50  $\mu\text{L}$  を添加した。この金剛駒を MonoSpin C18 (GL サイエンス) にて脱塩精製後、0.1% TFA 含有 80% アセトニトリル溶液 200  $\mu\text{L}$  で溶出した。溶出液を減圧乾固し、0.1% ギ酸含有 2% アセトニトリル溶液 30  $\mu\text{L}$  に再溶解した。溶解後、20,000 $\times\text{g}$ 、室温、10 分間遠心処理し、上澄みを LC/MS/MS を用いたショットガン解析に供した。

## 4. 研究成果

(1) メカニカルストレス負荷マウス長骨由来骨細胞様株 MLO-Y4 細胞から調製した膜小胞の形態学的特徴

メカニカルストレスを負荷した MLO-Y4 細胞から調製した膜小胞とストレス未負荷の MLO-Y4 細胞から調製した膜小胞をそれぞれ回収し、粒子径及び走査型電子顕微鏡観察を行なった。その結果、メカニカルストレス未負荷の膜小胞は 60, 78, 104 nm にピークを示す比較的細かな粒子径分布を示したが、メカニカルストレス負荷の骨細胞では 119 nm にピークを示す若干サイズアップした粒子径分布を示した。粒子濃度は、メカニカルストレス負荷により 10 倍ほど高くなっていた。また、走査型電子顕微鏡像からも NanoSight により得られた結果と同様な粒子像を確認した (図 1)。

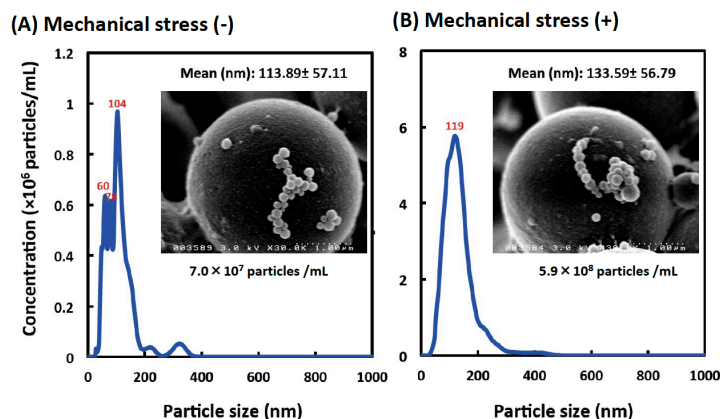


図 1. メカニカルストレス負荷により MLO-Y4 細胞が分泌した膜小胞の粒子径分布と粒子濃度 (A) メカニカルストレス未負荷, (B) メカニカルストレス負荷

次に、メカニカルストレスを負荷した MLO-Y4 細胞から調製した膜小胞とストレス未負荷の MLO-Y4 細胞から調製した膜小胞のエクソソームマーカーについてウエスタンブロット法により解析した。その結果、興味深いことにテトラスパニン類である CD9 および CD63 についてはメカニカルストレスを負荷した MLO-Y4 細胞から調製した膜小胞にのみ検出された。一方、エンドソーム関連タンパク質の Flotillin-1 はメカニカルストレス未負荷の MLO-Y4 細胞から調製した膜小胞のみ検出された。これら結果から、メカニカルストレス負荷により MLO-Y4 細胞から分泌される膜小胞の質的変化があることが推察された (図 2)。

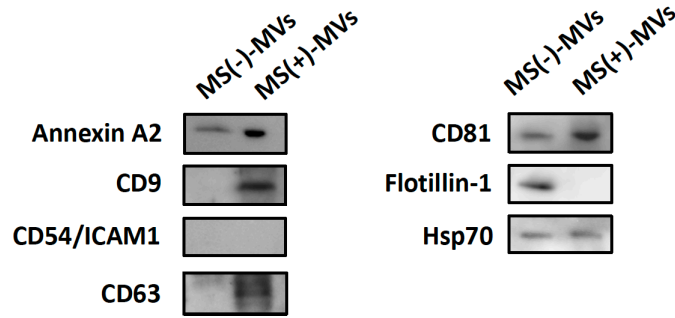


図 2. メカニカルストレス負荷による MLO-Y4 細胞が分泌した膜小胞におけるエクソソームマーカーの発現変化

MS(-)-MV:メカニカルストレス未負荷 MLO-Y4 細胞が分泌した膜小胞, MS(+)-MV:メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞が分泌した膜小胞

(2) メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞による破骨細胞分化誘導能

メカニカルストレスを負荷した MLO-Y4 細胞から調製した膜小胞が破骨細胞の分化に関与しているか前駆破骨細胞様細胞のマウスマクロファージ RAW264.7 細胞を用いて検討したところ、破骨細胞分化誘導因子である RANKL/M-CSF 共刺激した陽性対照よりも分化誘導能は低いものの、TRACP 活性陽性細胞や破骨前駆細胞が融合した巨核細胞の形成を確認した。また、比色定量による TRACP 活性や破骨細胞分化誘導分子の NFATc1 および DC-STAMP のタンパク質および mRNA の発現量もメカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞処理により上昇したが、メカニカルストレス未負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞処理ではその上昇は確認できなかった (図 3)。これら結果から、メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞には破骨細胞の分化誘導能を有することが示唆された。

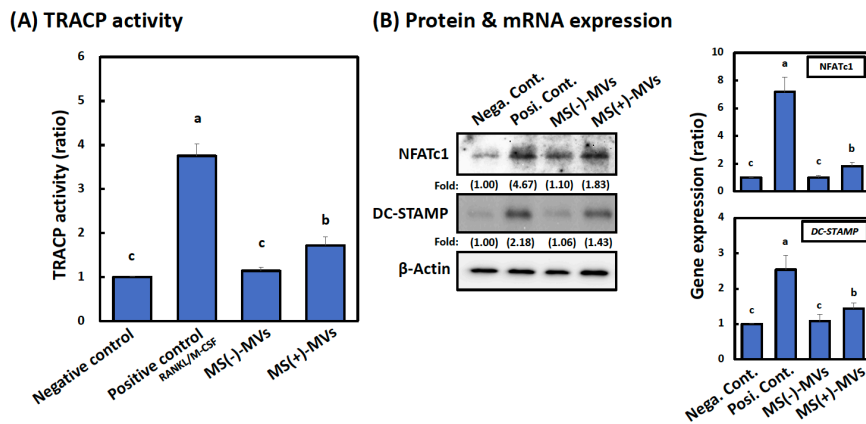


図 3. メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞による破骨細胞分化誘導

(A) TRACP 活性, (B) 破骨細胞分化誘導因子の発現変化

(3) メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞の RAW264.7 細胞への取り込み

メカニカルストレスを負荷した MLO-Y4 細胞から調製した膜小胞が破骨細胞の分化に関与することを確認したが、その分化誘導能は破骨前駆細胞の一部にとどまった。その結果から、これら膜小胞の取り込みまたは細胞膜表面の受容体分子への結合能が一部の細胞にしか可能ではなかったのではないかと推察した。そこで、細胞膜成分の脂質成分に親和性の高い PKH67 により膜小胞を蛍光標識し、前駆破骨細胞への取り込みについて観察した。その結果、蛍光標識した膜小胞を取り込んだ RAW264.7 細胞は細胞全体の一部であった。この膜小胞を取り込んだ細胞のみが分化したということを考えれば、TRACP 染色陽性細胞の観察像と一致することが推察された (図 4)。

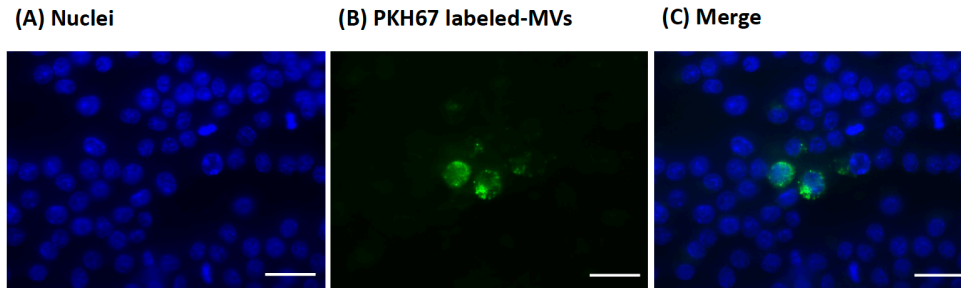


図 4. 前駆破骨細胞様細胞 RAW264.7 細胞におけるメカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜の取り込み

(A) 核 (Hoechst33342), (B) 膜小胞, (C) (A) + (B) 合成像、スケールバー : 10  $\mu\text{m}$   
膜小胞投与後 24 時間後の取り込み状況を示す。

(4) メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞の膜および内包タンパク質プロフィール解析

メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞に含まれるどのような分子が破骨細胞分化誘導に関わっているのか推察するために、膜小胞に含まれるタンパク質を網羅的に LC-MS/MS を用いたショットガン解析を行なった (メカニカルストレス未負荷処理の MLO-Y4 細胞分泌膜小胞と内包タンパク質および膜タンパク質の比較解析を行なった)。その結果、メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞由来膜小胞にのみ破骨細胞分化に関連するタンパク質の存在を確認した (図 5, 特許申請の関係上, 非表示)。また、エクソソームマーカーの検出の際にメカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞にのみしか観察できなかったテトラスパニン類の CD9 および CD63 は、本ショットガン解析においてもメカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞にのみしか検出できなかった。この結果からも CD9 および CD63 はメカニカルストレス受容により膜小胞にソーティングされる分子であることが示唆された。

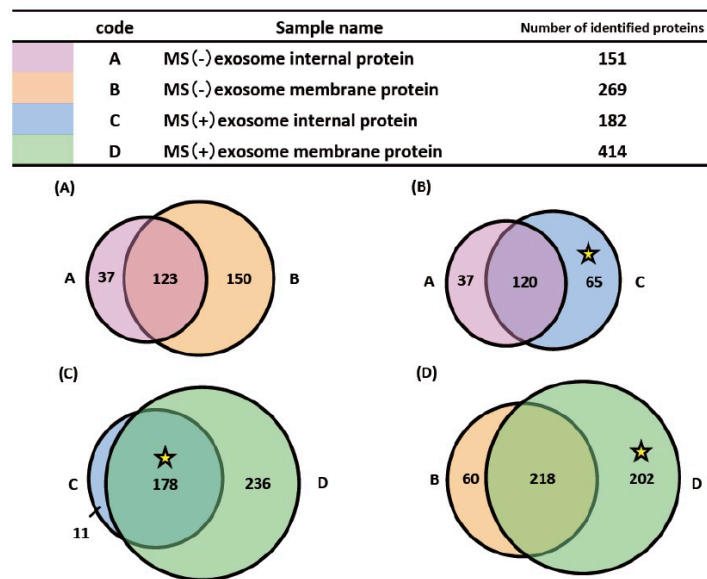


図 5. メカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜に含まれるタンパク質のショットガンプロテオーム解析

(A) A vs B, (B) A vs C, (C) C vs D, (D) B vs D, 星印はメカニカルストレス負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜にのみ含まれる破骨細胞分化関連誘導タンパク質を示す。

(総括)

本研究課題から、メカニカルストレスを負荷した骨細胞から分泌される膜小胞には破骨細胞の分化誘導能を有することが示唆された。その機構については、メカニカルストレス受容によりソーティングされるタンパク質が関与している可能性が考えられた。今後さらにメカニカルストレス受容により細胞の識別や受容体の機能制御に関わる糖鎖や膜小胞の脂質成分に変化が生じているのか詳細な解析を進め、私たちが日常の生活活動する中で起きる骨代謝の基本機構である「まず骨が壊され、新しい骨が作られる」というホメオスタシス機構を明らかにするとともに、膜小胞を利用した骨粗鬆症治療薬への応用展開を進めたい。

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 1件）

1. 著者名 Nagumo M, Ninomiya M, Oshima N, Itoh T, Tanaka K, Nishina A, Koketsu M.	4. 巻 29
2. 論文標題 Comparative analysis of stilbene and benzofuran neolignan derivatives as acetylcholinesterase inhibitors with neuroprotective and anti-inflammatory activities.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 2475-2479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2019.07.026	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 Ando M, Yamada T, Okinaga Y, Taguchi E, Sugimoto Y, Takeuchi A, Itoh T, Fukuda T, Tsukamasa Y.	4. 巻 303
2. 論文標題 Evaluation of the inhibition of mercury absorption by vegetable juices using a red sea bream intestine model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Chem.	6. 最初と最後の頁 125351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2019.125351.	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 Itoh T, Fukatani K, Nakashima A, Suzuki K.	4. 巻 10
2. 論文標題 MicroRNA-141-3p and microRNA-200a-3p regulate -melanocyte stimulating hormone-stimulated melanogenesis by directly targeting microphthalmia-associated transcription factor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 2149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58911-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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomohiro ITOH
2. 発表標題 The exosome that are released from mechanical stress-loaded osteocyte induces osteoclastogenesis.
3. 学会等名 International society for extracellular vesicles annual meeting ISEV2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤智広, 赤尾幸博
2. 発表標題 miRNA-294によるマウス骨芽細胞株MC3T3-E1細胞の分化制御機構
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤智広, 赤尾幸博
2. 発表標題 メカニカルストレス負荷骨細胞から分泌されたexosomeは破骨細胞の分化を誘導する
3. 学会等名 2018年度日本分子生物学会 (横浜市, パシフィコ横浜)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

三重大学大学院生物資源学研究所 水圏材料分子化学研究分野ホームページ <a href="https://tomo-ito.h.wixsite.com/mie-uni-mcam">https://tomo-ito.h.wixsite.com/mie-uni-mcam</a> 2020年度 第7回日本細胞外小胞学会 奨励賞 (2020.10.26 日本細胞外小胞学会 理事長: 落谷孝広) 「メカニカルストレス負荷骨細胞が分泌する膜小胞による破骨細胞分化誘導」
---

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