

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17258

研究課題名（和文）成熟骨芽細胞の活性化と骨再生能力の検討

研究課題名（英文）Capability of relatively mature osteoblasts to shift bone forming osteoblasts

研究代表者

沖田 紗季 (Okita, Saki)

広島大学・医系科学研究科（歯）・研究員

研究者番号：20806674

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨芽細胞のシングルセルRNA-Seqより成熟骨芽細胞にはCd34などの骨原生細胞マーカーを特異的に発現するクラスターが存在した。Cd34+クラスターとその他のクラスターのGO解析よりCd34+クラスターは未分化な形質を維持していることが示唆されたため、擬似時系列解析を行った。その結果、Cd34+クラスターを除くクラスターの細胞は骨芽細胞の分化系列に分布するのに対し、Cd34+クラスターの細胞はこれらの系列上に分布せず、異なる擬似時系列を形成した。このことから、Cd34+クラスターは未分化な細胞集団と異なる可能性が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨芽細胞の多様性のメカニズムは、ほとんど解明されていない。これまでに我々は成熟骨芽細胞の一部に骨原生マーカー（Cd34）を発現する細胞集団を確認し、今回はこの細胞集団に着目して解析を進めた。その結果、Cd34+骨芽細胞は未分化な細胞ではなく、特殊な細胞集団であることが推察された。また、これまでに骨芽細胞において機能が明らかにされていない遺伝子が複数リストアップされた。これらはCd34+骨芽細胞の性質を理解する上で重要であると考えられる。本課題の期間内にそれらの機能解析には至らなかったものの、骨芽細胞の多様性のメカニズムを解明する足掛かりになったと考える。

研究成果の概要（英文）：Single-cell RNA-sequencing analysis was carried out in Venus-positive (Venus+) osteoblasts isolated from mice expressing the fluorescent protein Venus under the control of the 2.3kb Col1a1 promoter. Two hundred seventy-two Venus+ osteoblasts can be categorized into four clusters. Of these, one cluster uniquely expressed stem cell markers such as Cd34 (Cd34+ cluster) was focused, because cells in this cluster also expressed some of mature osteoblast marker genes relatively abundantly. Pseudotime ordering analyses showed that cells in the Cd34+ cluster were not distributed in the osteoblast differentiation lineage. These results suggest that a part of osteoblasts may have additional traits involved in bone metabolism.

研究分野：成長および発育系歯学関連

キーワード：骨芽細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口唇裂・口蓋裂は、胎生期における顔面突起の癒合不全に起因する顎裂を特徴とする顎顔面領域に最も多い先天的形成異常であり、黄色人種では発症率が高く、日本人の発症率は約0.18%と報告されている。顎裂閉鎖のために、骨欠損部への腸骨移植が広く用いられてきたが、腸骨からの骨採取は入院や歩行の制限など低年齢の患者には大きな負担となる。また、矯正歯科治療時に歯槽骨の唇舌幅が狭い症例においては歯槽骨内での歯の移動が制限されるだけでなく、歯根露出を合併するリスクが高まる。このように、矯正歯科の分野において、低侵襲に骨量を効率よく増加させることの重要度は高い。しかし、現段階で骨芽細胞の多様性を制御することは困難である。

骨芽細胞は未分化間葉系細胞に由来し、RUNX2をマスター転写因子として様々なシグナルを介して分化・成熟することが知られているが、この分化過程は必ずしも一様でなく、骨芽細胞のその後の運命の制御機構は大部分が不明である。骨芽細胞は骨形成の後、大半がアポトーシスにより死滅し、残りの大部分は骨基質に埋もれて骨細胞に最終分化する。また、一部は骨表面にとどまりbone lining cellsとなる。このような骨芽細胞の多様性のメカニズムは、ほとんど解明されていない。私たちは、マウス頭頂骨由来骨芽細胞の遺伝子発現プロファイルをシングルセルレベルで解析し、骨芽細胞を複数の細胞集団に分離することに成功した。この細胞集団より骨芽細胞中の増殖能を維持した細胞集団を特定、分離し、その性質を把握することでより効率的に骨形成を行うことができるのではないかと考えた。そこで、シングルセル解析により特定遺伝子を抽出するとともに、これをノックアウトした骨芽細胞の機能をマウス骨欠損モデルを用いて解析することを最終ゴールとして検討を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、効率的な骨形成再生の方法論を確立することを最終ゴールとし、シングルセル解析により得られた特定の骨芽細胞集団について様々な手法により細胞の性質を解析するとともに得られた情報から特定の候補遺伝子をノックアウトした骨芽細胞をモデル動物に移植して、ノックアウト細胞の機能を評価することを目指した。

3. 研究の方法

- (1) Lyn-Venus を Col1a1 プロモーターでドライブしたトランスジェニックマウス(Lyn-Venus マウス)を作製し、同マウス新生仔から骨芽細胞フラクションを採取し、FACSにてVenus陽性(Venus⁺)細胞のみを回収し、単一細胞レベルのRNA-Seq解析を行う：データの追加によるバリデーション。
- (2) 同マウスの分離Venus⁺細胞から分離した特定細胞集団の増殖能・分化能を評価する。
- (3) 同マウスの骨組織切片を作製し、特定細胞集団の局在、分布を明らかにする。
- (4) 骨芽細胞株から特定細胞集団と同じ性質を有する細胞を単離し、ゲノム編集によるノックアウト細胞株を得る：特定遺伝子の選定が完了しなかったため中止。
- (5) 同ノックアウト細胞株のマウス骨欠損モデルにおける骨再生能の評価を行う：特定遺伝子の選定が完了しなかったため中止。

4. 研究成果

Lyn-Venus⁺骨芽細胞のシングルセル RNA-Seq を行い、解析細胞数を初回の3倍に拡大し、各種機械学習による再解析を行った。シーケンスデータを定量化し、発現変動の大きい上位遺伝子を抽出し、ヒートマップを作製した。得られた結果は初回の解析結果を概ね反映しており、データの信頼性が担保できた。ヒートマップにより得られたクラスタリングの特徴を再検討したところ、骨芽細胞のマーカーについて図1の結果を得た。Col1a1 は全てのクラスターに均等に発現するものの、骨芽細胞のマスター転写因子である Runx2 をはじめとする骨芽細胞の分化マーカーには一定の傾向があり、Cd34 や Cxcl12 の骨原形細胞マーカーを特異的に発現するクラスター(図2A)は骨芽細胞マーカーの発現が低い傾向にあった。しかし、これらの細胞は Col1a1/2 や Sparc など、初期から成熟骨芽細胞のマーカーの一部も比較的高いレベルで発現することから、未分化な細胞と結論するには至らず、むしろ、特殊な骨芽細胞集団と解釈して解析を進めた。

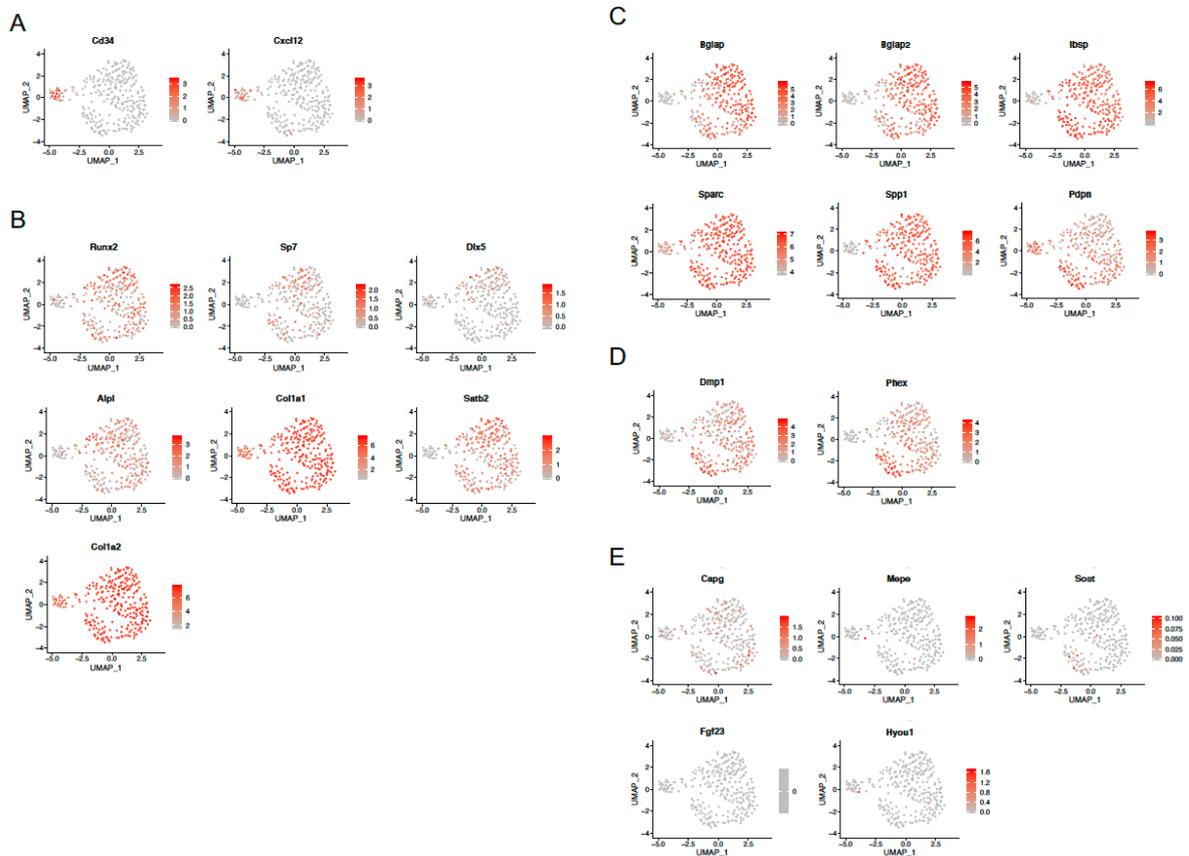


図1. UMAP plot による骨芽細胞マーカー遺伝子の Feature plot

A 骨原形細胞, B 骨芽細胞初期, C 成熟骨芽細胞, D 骨細胞マーカー

Cd34⁺クラスターとその他のクラスター(代表的クラスターとして成熟骨芽細胞の遺伝子発現プロファイルが有意なクラスター:成熟骨芽細胞クラスター)のGO解析を行った。Cd34⁺クラスターと比較して発現が増加する遺伝子(A)または低下する遺伝子(B)に関するGOターム上位20を図2に示す。これらの結果から、Cd34⁺クラスターは予想通り未分化な形質を維持していることが示唆されたため、擬似時系列解析を行った。その結果、Cd34⁺クラスターを除くクラスターの細胞は骨芽細胞の分化系列に分布するのに対し、Cd34⁺クラスターの細胞はこれらの系列上に分布せず、異なる擬似時系列を形成した。このことから、Cd34⁺クラスターは未分化な細胞集団と異なる可能性が推測された。

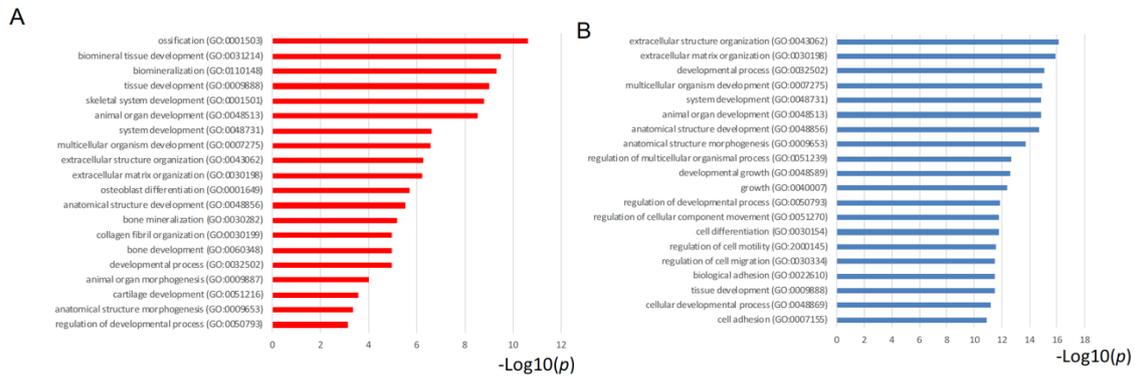


図 2. Cd34⁺クラスターと成熟骨芽細胞クラスターの GO 解析

新生仔 Lyn-Venus マウス頭頂骨から FACS により CD34⁺/Venus⁺細胞を回収した。この細胞を通常の骨分化誘導培地で培養したものの、細胞の生存率が悪く解析不能であった。ソーティングの影響を軽減し、CD34⁺/Venus⁺細胞を単離しても同細胞の生存率の改善は認められず、また増殖能力についても特筆すべき所見は得られず、ex vivo での解析はペンディングとした。

Cd34⁺クラスターに特徴的な遺伝子は上述の Cxcl12 のみならず、これまでに骨芽細胞において機能が明らかにされていない遺伝子が複数リストアップされた。これらは Cd34⁺骨芽細胞の性質を理解する上で重要であると考えられたが、本課題の期間内にそれらの機能解析には至らなかった。マウス骨髄ストローマ細胞株 ST2 は CD34 陽性との報告があり、現在この細胞株のクローンを採取し、CD34⁺/−選択による機能解析を進めており、今後は同細胞株により、CD34⁺骨芽細胞の機能解析を進め、その結果を動物実験、臨床に反映させたいと考えている。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshioka Hirotaka, Okita Saki, Nakano Masashi, Minamizaki Tomoko, Nubukiyo Asako, Sotomaru Yusuke, Bonnelye Edith, Kozai Katsuyuki, Tanimoto Kotaro, Aubin Jane E., Yoshiko Yuji	4. 巻 -
2. 論文標題 Single cell RNA sequencing reveals the breadth of osteoblast heterogeneity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm4.10496	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0件

〔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
---------	---------