

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03991

研究課題名(和文)メカニカルストレスによる破骨細胞抑制機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism for suppression of osteoclastic bone resorption by mechanical stress in bone

研究代表者

篠原 正浩 (Masahiro, Shinonara)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・研究室長

研究者番号：60345733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：不動性骨粗しょう症では、骨組織におけるメカニカルセンサー細胞である骨細胞における破骨細胞分化因子RANKLの発現亢進に大きく依存すると考えられていた。しかし、不動性骨粗しょう症を発症させたモデルマウスにメカニカルストレス負荷を行うと骨組織のRANKL発現の変動に先立って破骨細胞数が減少することを見出し、破骨細胞に対するメカニカルストレスの直接的な影響を示唆する個体レベルでのデータを得た。そのメカニズムとして、身体活動に伴って発生する骨内の間質液の動き(間質流)に由来する破骨細胞やその前駆細胞への剪断応力(シアストレス)負荷がアポトーシスを誘導することを細胞レベル、分子レベルで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨組織の恒常性維持には様々な組織・臓器による制御に加え、骨組織に対する力学的荷重刺激による制御が非常に重要である。骨組織では常に古い骨は破骨細胞によって吸収され、新しい骨が骨芽細胞によって形成されている。この吸収と形成のバランスが保たれることにより正常な骨組織が維持されるが、寝たきりや車椅子使用など障害者の身体不活動時のような骨組織に力学的荷重刺激がかからない環境ではバランスが吸収に傾き、骨量が低下して骨粗しょう症を発症する。本研究成果は力学的荷重による骨吸収のメカニズム解明に貢献し、将来的な破骨細胞を標的とする骨粗しょう症の新たな治療法の確立につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Disuse osteoporosis is a disease with bone loss due to skeletal unloading or systemic immobilization. It has been reported that the bone loss is induced by an enhanced bone resorption by bone-resorbing osteoclasts, which is triggered by osteoclast differentiation factor RANKL production in osteocytes, mechano-sensing cells in bone. Previously we found that mechanical reloading to the disuse osteoporosis model mice suppressed osteoclastic bone resorption independently of RANKL production in osteocytes, suggesting unknown regulatory mechanism(s) of osteoclasts by the mechanical loading of the bone. Therefore, we explored this mechanism at cellular and molecular levels, and revealed that fluid shear stress (FSS) of interstitial fluid in the bone induces apoptosis and also identified a key molecule of FSS-mediated apoptosis of osteoclasts.

研究分野：細胞生物学、骨代謝学

キーワード：不動性骨粗しょう症 骨代謝 破骨細胞 GPCR シアストレス

1. 研究開始当初の背景

骨組織の恒常性維持には様々な組織・臓器による制御に加え、骨組織に対する力学的荷重刺激による制御が非常に重要である。骨組織では常に古い骨は破骨細胞によって吸収され、新しい骨が骨芽細胞によって形成されている。この吸収と形成のバランスが保たれることにより正常な骨組織が維持されるが、寝たきりや車椅子使用など障害者の身体不活動時のような骨組織に力学的荷重刺激がかからない環境ではバランスが吸収に傾き、骨量が低下して骨粗しょう症を発症する。この骨量低下では破骨細胞による骨吸収の亢進が主な原因と考えられており (Smith, *Annu Rev Nutr*, 2014)、破骨細胞を標的とした治療法が有効である (Lacey, *Nat Rev Drug Discov*, 2012)。しかし、従来の治療法は全身の破骨細胞の機能を非特異的に抑制するため、本来の機能である古い骨の吸収が正常に行われず、骨量は増加するが古い骨が蓄積するという諸刃の剣となっている。従って、身体不活動時における骨量減少、特に破骨細胞による骨吸収の亢進の分子メカニズムを明らかにし、メカニズムに立脚した身体不活動に特異的な治療戦略の確立は、身体不活動を伴う寝たきり患者や障害者の骨保護を目指す上で必要である。

身体活動時では、骨組織に対して負荷される力が骨内部に間質流を発生させることにより骨基質に存在する骨細胞や骨表面に存在する骨芽細胞や破骨細胞といった骨代謝を担う細胞に対してシヤストレスとして伝わる。その結果、遺伝子発現変動を伴った骨代謝細胞の生存や分化、機能が変化する (Bonewald, *J Bone Miner Res*, 2011)。身体不活動時の骨量低下では骨吸収を担う破骨細胞の増加および骨吸収能の活性化が起こるが、破骨細胞分化因子である TNF ファミリーのサイトカイン RANKL の骨組織における発現の亢進による (Tatsumi, *Cell Metab*, 2007 など) ことに加えて、RANKL を受容する破骨細胞の前駆細胞そのものの分化能亢進 (Monici, *J Cell Biochem*, 2006 など) や破骨細胞のアポトーシス抑制 (Li, *Exp Ther Med*, 2015) など破骨細胞側における変容も一つの要因と考えられている。前者については骨細胞を中心とした研究が世界で展開され、分子メカニズムの一端が解き明かされつつある。しかし、破骨細胞に対する直接的なシヤストレス刺激の生体における意義や重要性を追求する研究は行われておらず、科学的根拠に基づいた身体不活動時における骨量低下の新規予防法や治療法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

これまでの研究において身体活動を制限したのちに活動制限を解除したマウスでは、骨組織における RANKL 発現が変化しないにも関わらず破骨細胞の減少が起こることを見出した。また興味深いことに、この時の破骨細胞の減少はアポトーシスによるものであることも判明している。この結果は、身体活動時のメカニカルストレスが骨細胞に伝わることで破骨細胞分化因子の発現を抑制し、その結果として破骨細胞による骨吸収を抑制するというこれまでに知られた分子メカニズムとは異なり、メカニカルストレスが破骨細胞に直接的に作用して生体内で破骨細胞のアポトーシスを誘導する効果を持つことを示唆する、これまでに報告のない知見である。

世界に先駆けて見出した上記知見に基づき、メカニカルストレスが破骨細胞にアポトーシスを誘導する分子メカニズムを追求し、生体における意義や重要性について遺伝子改変マウスを用いて解明することを本研究の目的とした。

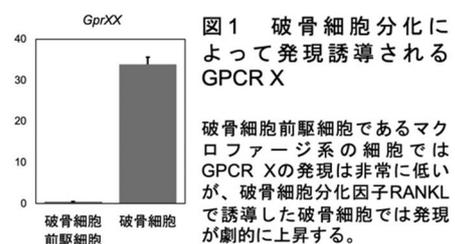
3. 研究の方法

本研究では分子レベルの解析では、マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞が破骨細胞へと分化する過程で発現が上昇する分子であり、リガンドが未同定の G タンパク質共役 7 回膜貫通型受容体 GPCR に注目し、さらに申請者が作成した新規破骨細胞特異的 Cre マウスを利用し、破骨細胞特異的なノックアウトマウスを作成、生理的条件に加え、身体不活動モデルや運動モデルを適用させた際の骨組織ならびに破骨細胞の解析を行うことで、分子レベルから個体レベルまで包括的に解析する研究を行った。

具体的には、身体活動時のメカニカルストレスが破骨細胞で発現する GPCR を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させ、そのシグナルにより破骨細胞がアポトーシスを起こすことで、破骨細胞数の減少および骨量低下を防ぐという仮説を検証するため、破骨細胞特異的な GPCR ノックアウトマウスの作成と解析、ノックアウトマウス由来の破骨細胞を用いたシアストレス負荷実験、シアストレスによる GPCR 活性化メカニズムの解明に関する解析を実施した。

4. 研究成果

まず、in vitro 破骨細胞培養系を利用した剪断応力(シアストレス)負荷の実験系構築ならびにこれに応答して破骨細胞の分化や機能、生存を制御する分子メカニズムについて破骨細胞で発現が認められる G タンパク質共役 7 回膜貫通型受容体(GPCR)に注目した解析を行った。今回注目した GPCR (GPCR X)はマクロファージ系の破骨細胞前駆細胞が破骨細胞へと分化する過程で発現が上昇する分子であることを見出しており(図1)、破骨細胞の骨吸収において何らかの役割を果たすことが想定されるが、これまで生体の破骨細胞における GPCR X の重要性やメカニカルストレスによる破骨細胞のアポトーシスへの GPCR X の関与等の報告は存在しない。



これまで使用していたシアストレスを負荷する培養用チャンバーでは解析できる細胞数が少なく生化学的・分子生物学的解析が難しいことに加えて、無菌状態での長時間培養が不可能であったため、これらの問題点を解決する 35mm 細胞培養ディッシュ上でシアストレスを付加する培養系の確立を行った(図2)。一方、破骨細胞にお

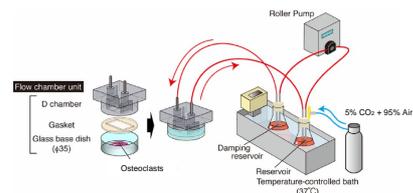


図2 長期培養が可能なシアストレス負荷装置

ける GPCR の機能を解析するための GPCR 欠損破骨細胞前駆細胞株の作成を行った。CRISPR/Cas9 システムを利用し、今回注目している GPCR X の遺伝子 (*GprXX*) を欠損させた細胞株の樹立に成功した。この GPCR X 欠損細胞を用いて in vitro における破骨細胞分化培養系で培養したところ、野生型細胞と同様に破骨細胞を形成し、破骨細胞分化には関与していないことが判明した。この結果を受け、確立した長期培養可能なシアストレス負荷装置を用いて GPCR 欠損破骨細胞前駆細胞株に対してメカニカルストレスの一つである剪断応力(シアストレス)負荷を行った際の破骨細胞分化ならびに破骨細胞の生存能に対する影響について解析を行った。野生型細胞の破骨細胞分化過程でシアストレス負荷させると破骨細胞の形成は抑制された一方、GPCR X 欠損破骨細胞前駆細胞株ではシアストレス負荷による破骨細胞分化の抑制が起こらないことを見出し、この結果は GPCR はシアストレス負荷時の破骨細胞形成抑制に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

シアストレス負荷後の破骨細胞特異的遺伝子の発現について qPCR により確認を行ったところ、野生型細胞では破骨細胞のマーカー遺伝子である *Acp5* や *Ctsk*、*Mmp13* や破骨細胞分化の

マスター転写因子である *Nfatc1* の発現がなどの発現が有意に抑えられることが判明した。また、これらの遺伝子発現の低下はシアストレス負荷した GPCR X 欠損細胞では認められなかった。並行して、シアストレスを負荷させた際のアポトーシスに関する解析も行ったものの、AnnexinV の検出やアポトーシス関連遺伝子 (Fas/FasL、Caspase など) の発現や活性には影響が認められなかった。この結果から、シアストレス負荷は破骨細胞に対してアポトーシスを誘導するのではなく、細胞分化を抑制する可能性が高いと考えられる。

これまでの予備データから細胞レベルにおいてシアストレス負荷により、破骨細胞内のカルシウム濃度が上昇することを見出していることから、NFATc1 の上流シグナル、すなわち NFATc1 を活性化するカルシウムシグナルに異常をきたす可能性が想定されたため、シアストレス負荷時の細胞内カルシウム濃度の測定を実施した。破骨細胞分化誘導後 24~48 時間の野生型細胞では NFATc1 の活性化に必須な細胞内カルシウムオシレーションが観察されるため、シアストレス負荷がこのカルシウムオシレーションに及ぼす影響について解析を行った。上述のシアストレス負荷装置内で分化誘導を 24 時間行い、その後シアストレス負荷をかけたところ、コントロールの細胞ではカルシウムオシレーションが正常に起こるのに対して、シアストレス負荷した細胞では負荷直後に一過的なカルシウム上昇が起こるとともに、カルシウムオシレーションは消失することが明らかとなった。また、GPCR X 欠損細胞に対してシアストレス負荷をかけても細胞内カルシウム濃度の劇的な上昇は認められず、細胞内カルシウムオシレーションは保たれていた。これらの結果は、シアストレスが GPCR を介して細胞内カルシウム濃度を一過的に上昇させることで、カルシウムオシレーションを消失させ、最終的に NFATc1 の活性化および破骨細胞分化を抑制させるメカニズムの存在を示している。現在、シアストレスが GPCR を活性化するメカニズムの解明を図っている。

上記の in vitro 培養細胞を用いた分子レベル、細胞レベルでの解析に加え、in vivo での解析を可能にする GPCR X 欠損マウスの作成も実施した。公共の遺伝子発現データベースを活用して GPCR X の様々な組織、細胞における遺伝子発現を解析したところ、GPCR X は破骨細胞以外にも T 細胞や血管内皮に発現しているため、破骨細胞解析を行うためには破骨細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスの作成が必要であった。そこで GPCR X の flox マウス及び破骨細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスの作成を行った。GPCR X の flox マウスは GPCR の三量体 G タンパク質の結合部位を含む exon を loxP で挟むデザインとした。一方、破骨細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスとして破骨細胞特異的遺伝子である Oscar (Osteoclast associated receptor) 遺伝子の Exon1 に Cre リコンビナーゼ遺伝子をノックインした Oscar Cre tg マウスの作成を行った。いずれのマウスも相同組換えのためのドナーベクターを作成し、CRISPR/Cas9 システムを利用した受精卵へのインジェクション後、正しく相同組換えが起こったマウス個体を得ることに成功した。それぞれのマウスを交配し、得られた破骨細胞特異的 GPCR X 欠損マウス (*GprXX^{flox/flox};Oscar Cre^{+/WT}* マウス) の骨組織について 8 週齢時点で microCT 解析を行ったところ、海綿骨や皮質骨に特に異常は認められなかった。また、組織学的解析や血中骨代謝マーカーの解析も実施したが、コントロールと比較して異常な点は認められなかった。現在、*GprXX^{flox/flox};Oscar Cre^{+/WT}* マウスの身体活動を制限したのちに活動制限を解除した際の破骨細胞減少への影響について解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyazaki T., Zhao Z., Ichihara Y., Yoshino D., Imamura T., Sawada K., Hayano S., Kamioka H., Mori S., Hirata H., Araki K., Kawauchi K., Shigemoto K., Tanaka S., Bonewald L. F., Honda H., Shinohara M., Nagao M., Ogata T., Harada I., Sawada Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 Mechanical regulation of bone homeostasis through p130Cas-mediated alleviation of NF- B activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaau7802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aau7802	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 該当する
1. 著者名 Nagira Keita, Ikuta Yasunari, Shinohara Masahiro, Sanada Yohei, Omoto Takenori, Kanaya Haruhisa, Nakasa Tomoyuki, Ishikawa Masakazu, Adachi Nobuo, Miyaki Shigeru, Lotz Martin	4. 巻 10
2. 論文標題 Histological scoring system for subchondral bone changes in murine models of joint aging and osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66979-7	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
1. 著者名 Ito Yoshiaki, Matsuzaki Tokio, Ayabe Fumiaki, Mokuda Sho, Kurimoto Ryota, Matsushima Takahide, Tabata Yusuke, Inotsume Maiko, Tsutsumi Hiroki, Liu Lin, Shinohara Masahiro, Tanaka Yoko, Nakamichi Ryo, Nishida Keiichiro, Lotz Martin K., Asahara Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Both microRNA-455-5p and -3p repress hypoxia-inducible factor-2 expression and coordinately regulate cartilage homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24460-7	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
1. 著者名 Takahashi Ken, Takahashi Hideyuki, Furuichi Takuya, Toyota Masatsugu, Furutani-Seiki Makoto, Kobayashi Takeshi, Watanabe-Takano Haruko, Shinohara Masahiro, Numaga-Tomita Takuro, Sakaue-Sawano Asako, Miyawaki Atsushi, Naruse Keiji	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 Furukawa Satoshi, Chatani Masahiro, Higashitani Atsushi, Higashibata Akira, Kawano Fuminori, Nikawa Takeshi, Numaga-Tomita Takuro, Ogura Toshihiko, Sato Fuminori, Sebara-Fujisawa Atsuko, Shinohara Masahiro, Shimazu Toru, Takahashi Satoru, Watanabe-Takano Haruko	4. 巻 7
2. 論文標題 Findings from recent studies by the Japan Aerospace Exploration Agency examining musculoskeletal atrophy in space and on Earth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Microgravity	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41526-021-00145-9	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 篠原正浩
2. 発表標題 障害者の骨をどう守る?
3. 学会等名 第4回理論免疫学ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 綱川祐貴、篠原正浩、濱田理人、全孝静、水野聖哉、Andreas Zankl、臼井俊明、布施谷清香、金井真帆、森戸直記、高橋智
2. 発表標題 多中心性手根骨足根骨融解症の病態理解のための分子的基盤-遺伝子欠損から疾患変異へ-
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綱川祐貴、篠原正浩、濱田理人、松永友里菜、布施谷清香、全孝静、脇本悠史、臼井俊明、金井真帆、水野聖哉、森戸直記、高橋智
2. 発表標題 MCT0モデルマウスは患者と同様の腎症を示す
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 篠原正浩	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 実験医学	

〔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 分担者	中浜 健一 (Nakahama Ken-ichi) (60281515)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	

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