

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09625

研究課題名(和文)破骨細胞に特異的な「骨の鮮度」を識別する新規受容体の探索と同定

研究課題名(英文)The role of pattern recognition receptors in osteoclast differentiation and function

研究代表者

藤田 洋史(Fujita, Hirofumi)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：20423288

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)：骨リモデリングにおいて骨吸収を担う破骨細胞が、古い骨をどうやって認識するのか、未だ解明されていない。私たちはパターン認識受容体に着目し、破骨細胞に複数のパターン認識受容体の特異的に発現していることを発見していた。本研究では、古い骨の認識分子を、これらパターン認識受容体の中から、同定することを目指した。そして、ゲノム編集により複数の候補分子ノックアウトマウスの作製に成功した。予想に反して、パターン認識受容体A遺伝子の破壊は、破骨細胞の分化を強く促進した。本研究成果は、破骨細胞の骨認識を標的とした、骨粗鬆症治療薬の開発につながるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、遺伝子Aが新しい骨を認識して破骨細胞の形成を抑え、骨吸収を避ける分子である可能性を、世界に先駆けて発見した。このような分子の報告はほとんどなく、この分子を活性化させるような新たな骨粗鬆症治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：How osteoclasts recognize old bone remains to be elucidated. We focused on pattern recognition receptors and found that some pattern recognition receptors are specifically expressed on osteoclasts. In this study, we aimed to identify old bone recognition molecules from these pattern recognition receptors. We then generated some knockout mice of candidate molecules in mice by genome editing. Contrary to expectations, disruption of the pattern recognition receptor A gene strongly promoted osteoclast differentiation. This result showed that gene A might contribute to the recognition of new bone.

研究分野：骨代謝、ゲノム編集

キーワード：破骨細胞 ゲノム編集 マウス 発生工学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会の到来により、骨粗鬆症の患者が急速に増加している。これは大きな社会問題となっており、骨リモデリングの異常が原因であることが明らかである。骨リモデリングは、破骨細胞と骨芽細胞が協調して、古くなった骨を新しい骨に置き換える現象である。しかし、古い骨をどうやって認識し、骨吸収をしているか、その分子メカニズムは十分に解明されていない。古い骨の認識すなわち骨の鮮度を判別する分子の発見が待たれている。

パターン認識受容体は、外来の生物の侵入や、ダメージを受けた組織の認識を行なっている。私たちは、古くなっている骨にはダメージを受けた印があり、それを破骨細胞が発現するパターン認識受容体により認識して、破骨細胞が分化する部位や骨吸収部位の決定を行なっている可能性を考えた。

### 2. 研究の目的

以上の背景より、本課題では、古い骨の認識を担う分子を、パターン認識受容体から探索し、破骨細胞の分化と機能への寄与を明らかにすることを目的とした。そのために、CRISPR-Cas9 システムを用いて、候補遺伝子の変異マウスの樹立と解析をおこなった。

### 3. 研究の方法

候補分子の3遺伝子に対するターゲット配列を CRISPRdirect software を用いて決定した。ターゲット配列を含む crRNA と tracrRNA をアニーリングして、gRNA を作製した。これと Cas9 protein と室温で 15 分反応させ、Cas9/gRNA 複合体を作製した。

C57BL6 マウスより、in vitro fertilization にて受精卵を作製した。Cas9/gRNA 複合体を含む Opti-MEM を電極液とし、受精卵を電極中に並べ、エレクトロポレーター NEPA21 により導入した。電気条件は 30 V (3 msec ON + 97 msec OFF) x 5 であった。洗浄後、2 細胞期まで発生させ、これを偽妊娠マウスに移植して、仔マウスを得た。

仔マウス尾のゲノム DNA よりジェノタイプングし、変異マウス個体を同定した。WT マウスと変異マウスから骨髄マクロファージを取得し、RANKL と M-CSF により破骨細胞の分化誘導を行なった。酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性による酵素化学的な細胞染色法により破骨細胞の検出を行なった。また、多核の細胞を破骨細胞と定義して、破骨細胞数を定量化した。

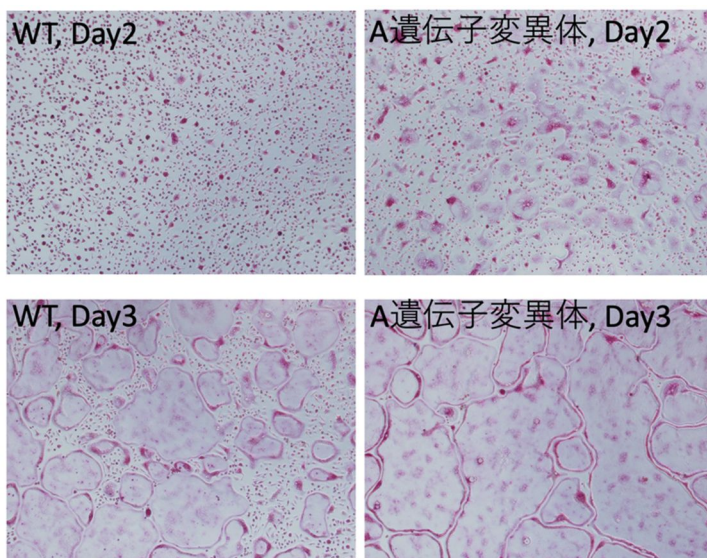
### 4. 研究成果

In silico 解析により、破骨細胞特異的に発現しているパターン認識受容体 A、B、C 遺伝子を、古い骨を認識する受容体候補分子とした。これら 3 遺伝子を同時に CRISPR-Cas9 システムによりノックアウトすることを試みた。残念ながら、3 遺伝子同時に破壊された仔マウスを得ることはできなかった。しかし、A 遺伝子と B 遺伝子の 2 遺伝子が同時に破壊された仔マウスや A、B 遺伝子をそれぞれ単独に破壊された仔マウスを得ることに成功した。現在、系統樹立を進めている。

また、A 遺伝子が破壊された F0 マウスより骨髄を採取し、骨髄マクロファージを誘導後、破骨細胞の分化を誘導した結果、下の図に示すように、予想に反して分化が強く促進された。加えて、A 遺伝子と B 遺伝子を同時に破壊した骨髄マクロファージからの破骨細胞も、A 遺伝子破壊骨髄マクロファージからの分化とおよそ同じ結果であった。このことから遺伝子 A は破骨細胞の分化を抑制している分子であることが示唆された。現在、系統樹立後のマウスを用いて解析を進めている。

本研究成果は、古くない骨を認識する分子、すなわち新しい骨を認識して破骨細胞の形成を抑え、骨吸収を避ける分子を、世界に先駆けて発見した可能性を示す。このような分子の報告は

ほとんどなく、この分子を活性化させることをコンセプトとした、新たな骨粗鬆症治療薬の



開発につながる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kanzaki Yuki, Fujita Hirofumi, Sato Keita, Hosokawa Mio, Matsumae Hiroshi, Shiraga Fumio, Morizane Yuki, Ohuchi Hideyo	4. 巻 61
2. 論文標題 KCNJ13 Gene Deletion Impairs Cell Alignment and Phagocytosis in Retinal Pigment Epithelium Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 38 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.61.5.38	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 Fujita H, Bando T, Oyadomari S, Ochiai K, Watanabe M, Kumon H, Ohuchi H.	4. 巻 74
2. 論文標題 Dkk3/REIC, an N-glycosylated Protein, Is a Physiological Endoplasmic Reticulum Stress Inducer in the Mouse Adrenal Gland.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama.	6. 最初と最後の頁 199-208.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18926/AMO/59950	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 Habuta Munenori, Yasue Akihiro, Suzuki Ken-ichi T., Fujita Hirofumi, Sato Keita, Kono Hitomi, Takayama Ayuko, Bando Tetsuya, Miyaishi Satoru, Oyadomari Seiichi, Tanaka Eiji, Ohuchi Hideyo	4. 巻 15
2. 論文標題 Fgf10-CRISPR mosaic mutants demonstrate the gene dose-related loss of the accessory lobe and decrease in the number of alveolar type 2 epithelial cells in mouse lung	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0240333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0240333	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 Kato Mutsuko, Sato Keita, Habuta Munenori, Fujita Hirofumi, Bando Tetsuya, Morizane Yuki, Shiraga Fumio, Miyaishi Satoru, Ohuchi Hideyo	4. 巻 19
2. 論文標題 Localization of the ultraviolet-sensor Opn5m and its effect on myopia-related gene expression in the late-embryonic chick eye	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100665-100665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2019.100665	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 Habuta M, Fujita H, Sato K, Bando T, Inoue J, Kondo Y, Miyaishi S, Kumon H, Ohuchi H.	4. 巻 379
2. 論文標題 Dickkopf3 (Dkk3) is required for maintaining the integrity of secretory vesicles in the mouse adrenal medulla.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res	6. 最初と最後の頁 157-167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-019-03113-8	査読の有無 無
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 Fujita Hirofumi, Habuta Munenori, Hattori Takako, Kubota Satoshi, Kumon Hiromi, Ohuchi Hideyo	4. 巻 566
2. 論文標題 UCP1 expression in the mouse adrenal gland is not upregulated by thermogenic conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 184 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.013	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 Xue Ruizhi, Lin Wenfeng, Fujita Hirofumi, Sun Jingkai, Kinoshita Rie, Ochiai Kazuhiko, Futami Junichiro, Watanabe Masami, Ohuchi Hideyo, Sakaguchi Masakiyo, Tang Zhengyan, Huang Peng, Nasu Yasutomo, Kumon Hiromi	4. 巻 13
2. 論文標題 Dkk3/REIC Deficiency Impairs Spermiation, Sperm Fibrous Sheath Integrity and the Sperm Motility of Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 285 ~ 285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13020285	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 神崎勇希, 藤田洋史, 佐藤恵太, 細川海音, 松前洋, 白神史雄, 森實祐基, 大内淑代
2. 発表標題 KCNJ13遺伝子欠損がヒト多能性幹細胞由来網膜色素上皮細胞の貪食能に及ぼす影響
3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirofumi Fujita, Munenori Habuta, Takako Hattori, Satoshi Kubota, Hiromi Kumon, Hideyo Ohuchi
2. 発表標題 副腎髄質におけるUCP1タンパク質発現のUCP1レポーターマウスを用いた検証
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土生田宗憲、泰江章博、鈴木賢一、藤田洋史、佐藤恵太、高山鮎子、板東哲哉、親泊政一、田中栄二、大内淑代
2. 発表標題 Fgf10 モザイク変異体における四肢骨格と肺胞細胞の解析
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田 洋史, 越智正彦, 大野 充昭, 青山 絵理子, 荻野哲也, 大内 淑代
2. 発表標題 グルタチオンは破骨細胞形成と炎症性骨破壊を促進する
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田洋史、安藤碧、土生田宗憲、服部高子、久保田聡、大内淑代
2. 発表標題 ゲノム編集によるシステイニルロイコトリエン受容体遺伝子 <i>cys1tr1</i> ノックアウトマウスの作製 -骨疾患における機能解明-
3. 学会等名 日本解剖学会 第74回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田洋史、安藤碧、土生田宗憲、服部高子、久保田聡、大内淑代
2. 発表標題 Cysl1tr1ノックアウトマウスを用いたシステイニルロイコトリエン受容体1の骨粗鬆症モデルにおける機能解明
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土生田 宗憲, 泰江 章博, 鈴木 賢一, 藤田 洋史, 高山 鮎子, 佐藤 恵太, 板東 哲哉, 親泊 政一, 田中 栄二, 大内 淑代
2. 発表標題 ゲノム編集Fgf10モザイク変異体の遺伝子型と表現型解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Munenori Habuta, Akihiro Yasue, Ken-ichi T Suzuki, Hirofumi Fujita, Tetsuya Bando, Keita Sato, Seiichi Oyadomari, Eiji Tanaka, Hideyo Ohuchi
2. 発表標題 Higher amount of the Fgf10 gene product is required for the accessory lobe formation and type 2 alveolar cell differentiation in the mouse lung as revealed by Fgf10-mosaic mutants generated by genome-editing
3. 学会等名 第59回 先天異常学会
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 分担者	小淵 浩嗣  (Kobuchi Hirotsugu)  (10304297)	岡山大学・医歯薬学域・講師    (15301)	

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