

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19236

研究課題名(和文) シングルセル解析手法を用いた骨髄間質細胞の機能の解明と骨再生療法への応用

研究課題名(英文) Elucidation of bone marrow stromal cell function using single cell analysis

研究代表者

松下 祐樹 (Matsushita, Yuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：00713827

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)：成体における骨髄間質細胞は、間葉系幹細胞としての機能を有しており、骨芽細胞をはじめとする間葉系細胞に分化することで、骨折などの損傷時の組織再生に寄与する。骨髄間質細胞は胎生期の間葉系凝集やその周囲の軟骨膜の細胞に由来すると言われていたが、これらの異なる起源の細胞がどのように多様な骨髄間質細胞群の構築に寄与しているかはこれまでに明らかにされていなかった。本研究では胎生期の軟骨原基を構成する細胞と周囲の軟骨膜細胞が骨格系細胞を形成する過程を細胞系譜追跡によって明らかにした。さらに最終的に構成された骨髄間質細胞の多様性をその発生起源とともに解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のシングルセル解析の発展により、骨髄間質細胞を含む骨格系細胞の多様性の解析が進んでいる。しかしながら、骨髄間葉系幹細胞の候補と言われている骨髄間質細胞についてはその起源は正確には分かっていなかった。本研究により、骨髄間質細胞の二つの起源となる細胞が明らかになった。このことにより、骨格の発生、成長過程における、細胞の系譜が明らかとなり、発生生物学研究や幹細胞研究の発展に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow stromal cells in the adult body function as mesenchymal stem cells and contribute to tissue regeneration at the time of fracture or other injury by differentiating into osteoblasts and other mesenchymal cells. Bone marrow stromal cells are said to originate from embryonic mesenchymal condensations and cells of the surrounding perichondrium, but it has not been clarified how cells of these different origins contribute to the diversity of bone marrow stromal cell populations. In this study, we used cell lineage tracing to elucidate the process by which cells constituting the embryonic cartilage template and surrounding perichondrial cells form the skeletal system. The diversity of the bone marrow stromal cells ultimately constituted was also elucidated, as well as their developmental origins.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：軟骨原基 傍軟骨膜 骨髄間質細胞 細胞系譜追跡

1. 研究開始当初の背景

口腔癌や薬剤関連顎骨壊死、歯周病などにより失われた顎骨、歯槽骨の再建は歯科領域における重要課題で、骨移植や骨再生療法など様々な臨床的なアプローチがなされている。その中で、生体の間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させて骨再生を促進する手法が注目されているが、この手法を用いた再生療法の開発では間葉系幹細胞の性状を深く理解することが成功させる上での重要な鍵となる。間葉系幹細胞は主に骨髄に存在し、その多くは CXCL12 を高発現する骨髄間質細胞、すなわち CAR (CXCL12-abundant reticular) 細胞に含まれ、造血幹細胞の維持に必須な細胞として造血幹細胞とともにニッチを形成する(1,2)。近年、一細胞レベルでのオミクス解析技術、とりわけシングルセル RNA-seq は急速に発展し、骨格系細胞、特に骨髄間質細胞の多様性が明らかになりつつある(3,4)。成体骨髄間質細胞は胎生期の骨の発生時に出現する間葉系凝集を起源としており(5,6)、その後生後早期の静止軟骨層などを経て形成されることを我々の研究グループは明らかにした(7)。また、間葉系凝集周囲に形成される軟骨膜も骨髄間質細胞に分化することが近年報告されるなど(8)、成体骨髄間質細胞について複数の起源があることが示唆されている。

一方、異なる発生起源を持つ間質細胞が、生体骨髄においてどのような機能的な違いを持つかについての詳細は明らかにされていない。また骨髄間質細胞は多様な細胞集団であると考えられるが、不均質性の詳細に踏み込んだ報告はない。我々は、骨髄間質細胞が特定の機能を果たす固有の細胞集団群により構成されている点に注目し、間葉系凝集由来または軟骨膜由来の間質細胞が生体骨髄において異なる機能を果たすという仮説を立て、それを検証するために本研究を立案した。

2. 研究の目的

骨の発生初期の間葉系凝集および軟骨膜の細胞をそれぞれ時期特異的に標識し、それらの細胞を従後に追跡できる genetic lineage tracing (遺伝的な細胞系譜の追跡) のマウスモデルを用い、骨髄間質細胞の起源を明らかにする。さらに起源の異なる骨髄間質細胞の特徴を一細胞レベルで網羅的に解析し、生体内においてその機能を解明し、最終的には骨再生過程におけるこれらの骨髄間質細胞の役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) 胎生期の軟骨原基と軟骨膜を tdTomato で標識する *Col2a1-cre; R26R^{tdTomato}* マウスを作出し、組織解析するとともに、セルソーティングにより採取した間葉系細胞からシングルセル解析を行うことで多様性を解析し、骨格形成の起源となる細胞集団を推定した。
- (2) 上記の結果から明らかとなった、軟骨原基、軟骨膜に特異的に発現する遺伝子をドライバーとする *creER; R26R^{tdTomato}* マウスを作出し、細胞系譜追跡を行い、成体骨髄間質細胞への寄与の違いを明らかにした (図 1)。

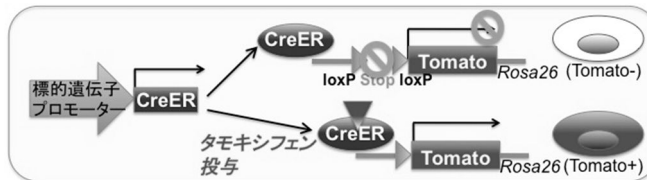


図1 CreER システム。タモキシフェン投与により CreER が核移行することで Stop シークエンスが除去され、tdTomato レポーターが発現する

4. 研究成果

Col2a1-cre; R26R^{tdTomato} マウスを E12.5 で屠殺し、将来の大腿骨の軟骨原基を SOX9 による免疫染色で解析した。Col2a1cre-E12.5 細胞は SOX9 陽性の軟骨原基とともに周囲の軟骨膜を標識した。さらにセルソーティングにより Col2a1cre-E12.5 細胞を選択的に採取し、シングルセル RNA-seq を行ったところ、11 の細胞集団に分けられた。遺伝子発現パターンから軟骨原基と軟骨膜の細胞を同定し、それぞれの細胞集団に特異的に発現する遺伝子として、*Fgfr3* と *Hes1* をそれぞれ見出した (図2)。

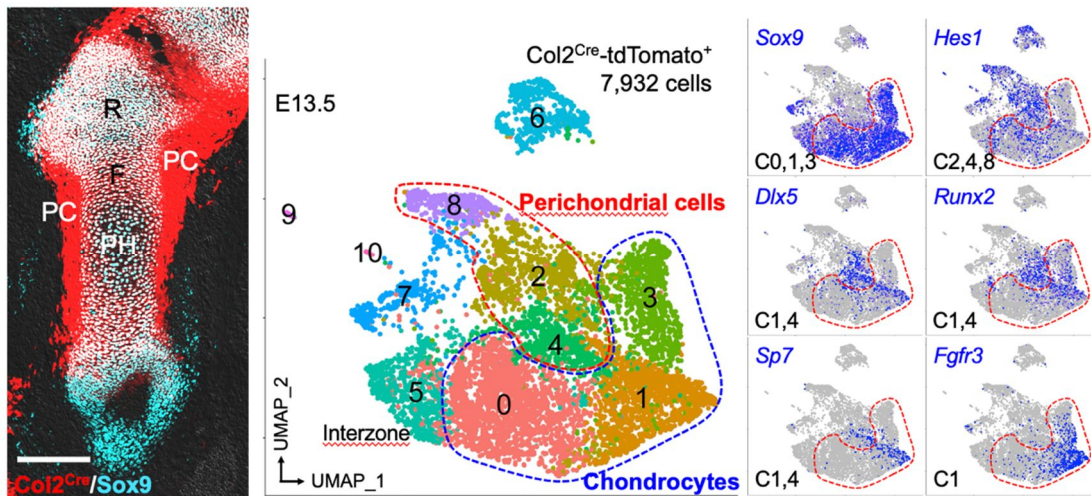


図2 *Col2a1-cre; R26R^{tdTomato}* マウスを E12.5 の発現パターンとシングルセル解析。Sox9 の発現パターンを基に軟骨原基、軟骨膜のクラスターを予測する。軟骨原基を標識するマーカー遺伝子として *Fgfr3* を、軟骨膜を標識するマーカー遺伝子として *Hes1* を同定した。

タモキシフェン誘導性の *Fgfr3-creER; R26R^{tdTomato}* マウスと *Hes1-creER; R26R^{tdTomato}* マウスを作成し、E12.5 でタモキシフェンを投与し、tdTomato で標識される細胞を 8 週間まで長期間経時的 (E13.5、E15.5、E17.5、生後 0 日、7 日、21 日、8 週)

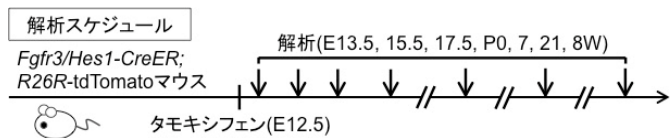


図3 解析スケジュール。*Fgfr3/Hes1-CreER; R26R-tdTomato* マウス E12.5 の親マウスにタモキシフェンを腹腔内投与し、各タイムポイントでマウスを屠殺し、解析する。

に追跡し、骨髄間質細胞および骨芽細胞への分布、分化動態を解析した (図3)。

Fgfr3creER-E12.5 細胞は短期的には軟骨原基を特異的に標識し、生後、成長に伴って、骨幹端部の骨、骨髄の骨格系細胞に分化した。一方で *Hes1 creER-E12.5* 細胞は骨幹部の骨格系細胞に分化することが明らかとなった。

以上の結果から、骨髄間質細胞の多様性は胎生期の発生起源にまで遡り、規定されているということが明らかとなった。

1. *Nature* 382:635-638, 1996,
2. *Immunity* 25:977-988, 2006
3. *Nature* 569:222-228 2019
4. *Cell* 177:1915-1932 2019
5. *PNAS* 102:14665-14670, 2005
6. *Nat Cell Biol.* 16:1157-1167, 2014
7. *Nature* 563:254-258, 2018
8. *Dev Cell.* 29:340-349, 2014

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Matsushita Yuki, Nagata Mizuki, Kozloff Kenneth M., Welch Joshua D., Mizuhashi Koji, Tokavanich Nicha, Hallett Shawn A., Link Daniel C., Nagasawa Takashi, Ono Wanida, Ono Noriaki	4. 巻 11
2. 論文標題 A Wnt-mediated transformation of the bone marrow stromal cell identity orchestrates skeletal regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-14029-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 該当する

1. 著者名 Matsushita Yuki, Ono Wanida, Ono Noriaki	4. 巻 136
2. 論文標題 Growth plate skeletal stem cells and their transition from cartilage to bone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115359 ~ 115359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115359	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 Matsushita Yuki, Ono Wanida, Ono Noriaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Skeletal Stem Cells for Bone Development and Repair: Diversity Matters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Osteoporosis Reports	6. 最初と最後の頁 189 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11914-020-00572-9	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 Iwanaga Joe, Anand Mahindra Kumar, Jain Mitesh N., Nagata Mizuki, Matsushita Yuki, Ibaragi Soichiro, Kusakawa Jingo, Tubbs R. Shane	4. 巻 33
2. 論文標題 Microsurgical Anatomy of the Superior Wall of the Mandibular Canal and Surrounding Structures: Suggestion for New Classifications for Dental Implantology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Anatomy	6. 最初と最後の頁 223 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ca.23456	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 Tokavanich Nicha, Gupta Aditi, Nagata Mizuki, Takahashi Akira, Matsushita Yuki, Yatabe Marilia, Ruellas Antonio, Cevidanes Lucia, Maki Koutaro, Yamaguchi Tetsutaro, Ono Noriaki, Ono Wanida	4. 巻 26
2. 論文標題 A three dimensional analysis of primary failure of eruption in humans and mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 391 ~ 400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13249	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 Pepe-Mooney Brian J., Dill Michael T., Alemany Anna, Ordovas-Montanes Jose, Matsushita Yuki, Rao Anuradha, Sen Anushna, Miyazaki Makoto, Anakk Sayeepriyadarshini, Dawson Paul A., Ono Noriaki, Shalek Alex K., van Oudenaarden Alexander, Camargo Fernando D.	4. 巻 25
2. 論文標題 Single-Cell Analysis of the Liver Epithelium Reveals Dynamic Heterogeneity and an Essential Role for YAP in Homeostasis and Regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 23 ~ 38.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2019.04.004	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 Mizuhashi Koji, Nagata Mizuki, Matsushita Yuki, Ono Wanida, Ono Noriaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Growth Plate Borderline Chondrocytes Behave as Transient Mesenchymal Precursor Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1387 ~ 1392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.3719	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

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Matsushita Yuki, Ono Noriaki
2. 発表標題 Notch effector Hes1 marks early perichondrial progenitor cells in endochondral bone development
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsushita Yuki、Ono Noriaki
2. 発表標題 Notch effector Hes1 marks early perichondrial progenitor cells in endochondral bone development
3. 学会等名 Gordon Research Seminar (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Matsushita Yuki、Ono Noriaki
2. 発表標題 Single-cell analysis unveils unique cell plasticity of native bone marrow stromal cells in bone regeneration
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research, 41st Annual Meeting (国際学会)
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

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		
米国	University of Michigan		