

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18023

研究課題名(和文)骨修復能の「若返り」を目指した骨傷に対する新規治療戦略の創出

研究課題名(英文)Generating novel therapeutic strategies to rejuvenate bone repair capacity

研究代表者

箭原 康人(Yahara, Yasuhito)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：60456390

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)：老化に伴って骨修復能や骨リモデリング力は低下する。しかし、その機序は不明であった。本研究の成果として、骨修復に寄与する胎児卵黄嚢由来破骨細胞の存在を新たに発見した。胎児卵黄嚢に発生したマクロファージは胎生期に骨へと移行し骨吸収を担当する破骨細胞へ分化した。胎児マクロファージに由来する破骨細胞は長期に渡って生後の骨に在住し、骨の恒常性維持に関与していた。さらに一旦、骨損傷が起こると、その修復過程の亜急性期から慢性期にかけて局所へと遊走し、損傷後の骨リモデリングに関与することが明らかとなった。胎児由来破骨細胞の存在は、経時的な骨リモデリング力の変化に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、マクロファージおよび破骨細胞には、造血幹細胞と胎児卵黄嚢を起源とする二種類の細胞集団が存在することを世界に先駆けて発見し報告した。起源の異なる二つの破骨細胞は複雑に細胞融合を繰り返しながら、相互に影響しあうことで、骨の再構築を駆動し、その恒常性維持に関わっていた。新しい破骨細胞分画が発見されたことで、破骨細胞の活性化や機能障害によって発症する疾患の病態解明につながる重要な成果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bone repair capacity declines with aging, but the mechanism of this phenomenon is unknown. As a result of this study, we newly discovered the existence of fetal yolk sac-derived osteoclasts that contribute to bone repair. Macrophages generated in the fetal yolk sac migrate to bone during the embryonic period and differentiate into osteoclasts that are responsible for bone resorption. Osteoclasts derived from fetal macrophages resided in postnatal bone for a long-term and were involved in bone homeostasis. Furthermore, once bone injury occurs, they migrate to the local area during the subacute and chronic phases of the repair process and participate in bone remodeling after injury. Fetal-derived osteoclasts may be a factor influencing the transition of bone remodeling capacity throughout life.

研究分野：骨代謝、骨免疫学

キーワード：破骨細胞 造血幹細胞 卵黄嚢 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

老化に伴って骨修復能は低下する。骨修復能の低下は、骨折後の骨癒合不全の原因となるだけでなく、身体機能の低下を引き起こし問題となる。しかし、老化によって骨修復能が低下する機序は分かっていない。我々は、若年マウスのマクロファージが分泌する Lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) が老年マウスの骨修復能を「若返らせる」ことを見出し報告した。この結果から、経年的な骨修復能の低下は、マクロファージの構成や機能の違いに起因するのではないかという仮説を立てるに至った。

マクロファージは貪食・分解・消化作用を有し、炎症関連物質を産生・分泌するとともに、抗原提示により T 細胞を活性化することで免疫応答を誘導するといった多彩な機能を有する細胞集団である。1968 年に van Furth や Cohn らは、すべてのマクロファージは骨髄内の前駆細胞に起源し、前単球から成熟分化した血液単球に由来すると結論づけ、Mononuclear phagocyte system (MPS) という概念を提唱した。しかし、近年一部のマクロファージは、胎児卵黄嚢に生じる Erythromyeloid progenitors (EMPs) から発生し、生後も生体内で維持されることが証明された (Mass et al. Science 2016)。

HSCs 由来と胎児 EMPs に由来するマクロファージは、骨損傷が起こると局所に遊走し活性型に変化することで、複雑なマクロファージ・ニッチを形成し、相互に影響しあうことで組織の再構築を誘導するものと考えられる。しかし、HSCs と胎児 EMPs 由来マクロファージが骨修復過程において、どのような機序で遊走・活性化し炎症の惹起や組織修復に関与するか、さらに「老化」の過程において両者の集団がどのように継時的な変化を来し、骨修復能に影響を及ぼすのかは未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄 HSCs 由来と胎児卵黄嚢 EMPs 由来マクロファージが時間的（発生、成長および老化）、空間的（個々の臓器において）に変化しながら、組織特有の微小環境に適応する過程を解明する。さらに、骨恒常性維持とその破綻（老化や骨折）によって作り出されるマクロファージの多様性とその変遷を明らかにする。これらの成果を踏まえ、骨修復能を促進することが可能な新規マクロファージ集団を同定することで、骨傷治療に対する新規治療戦略の創出を目指す。

3. 研究の方法

1. 骨髄 HSCs 由来と胎児卵黄嚢 EMPs 由来マクロファージのリニエージトレーシング実験

E7 に卵黄嚢に生じた EMPs は、E8.5 から 9.5 にかけて CX3C chemokine receptor 1 (Cx3cr1) 陽性の卵黄嚢マクロファージへ分化する。その一方で、AGM で発生した HSCs は E12.5 に胎児肝臓に移行し、二次造血を開始する。EMPs 由来マクロファージを追跡するため *Cx3cr1CreER; Rosa26tdTomato* 胎児を有する妊娠雌マウスに対して 4OH-tamoxifen (4OHT) を E9.5 に単回投与することで、EMPs 由来マクロファージとその子孫細胞を tdTomato で標識した。生後のマウスから骨組織を回収し、その分布を観察した。さらに *Flt3* 陽性 HSCs 由来細胞を追跡するため *Flt3-Cre; Rosa26tdTomato* マウスを作成し、生後マウスの骨組織の組織解析を行った。

2. 骨修復過程における骨髄 HSCs 由来と胎児卵黄嚢 EMPs 由来マクロファージの遊走を検証

4OHT を E9.5 日齢に投与した *Cx3cr1CreER; Rosa26tdTomato* マウスおよび *Flt3-Cre; Rosa26tdTomato* マウスの大腿骨に直径約 0.8 mm の骨孔を作成し、その修復過程を観察した。損傷部に遊走する EMPs および HSCs 由来マクロファージの遊走と継時的な変化を組織学的に解析した。

3. 若年マウスと老年マウスを用いた骨傷修復能の比較検討

若年(2 か月齢)および老年マウス(20 か月齢)の大腿骨に骨孔を作成し、骨修復能の組織学的解析およびマイクロ CT 解析を行った。

4. 若年と老年マウスの骨修復過程におけるマクロファージ亜集団の解析

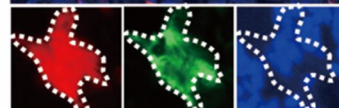
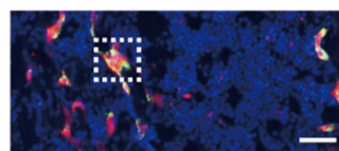
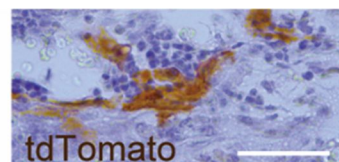
若年(2 か月齢)および老年マウス(20 か月齢)の大腿骨に骨孔を作成し、骨折部周囲から骨髄細胞を採取した。骨傷なし、受傷後 3、7、21 日の 4 群から回収した細胞を用いて一細胞 RNA 発現解析 (scRNA-seq) を行った。若年および老年マウスの骨髄細胞において、骨修復に伴って変動する遺伝子群を解析した。特に今回の実験では、若年および老年マウスのマクロファージに着目し、若年マウスのマクロファージにおいて特異的に変動している遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

1. 胎児卵黄嚢 EMPs 由来マクロファージは破骨細胞へと分化した

EMPs 由来マクロファージを追跡するため *Cx3cr1CreER; Rosa26tdTomato* 胎児を有する妊

妊娠マウスに対して 4OHT を投与し、生後のマウスの骨組織を解析した。その結果、生後 0 日から 6 か月齢のマウス骨組織において tdTomato 陽性の細胞を多数確認した。tdTomato 陽性の細胞の多くは、破骨細胞マーカーである TRAP や VPP3 蛋白質を共発現しており、多核の細胞であった。以上の結果から、EMPs 由来マクロファージは生後の破骨細胞の供給源になり得ることを証明した。さらに HSCs に由来するマクロファージの分布を解明するため、*Flt3-Cre; Rosa26tdTomato* マウスの大腿骨を採取しフローサイトメトリーによる評価を行った。*Flt3-Cre; Rosa26tdTomato* マウスの CD45 陽性骨髄細胞では、約 83% が tdTomato 陽性の細胞集団であったのに対し、胎生 9.5 日齢で 4 OHT の投与を受けた *Cx3cr1CreER; Rosa26tdTomato* マウスの骨髄細胞では、tdtomato 陽性細胞の割合が 0.02% 程度と皆無であった。以上の研究結果から、EMPs 由来マクロファージの多くは胎生期に骨へと流入した後、破骨細胞へと分化し骨に常在して骨吸収を担うが、骨髄マクロファージへの関与は乏しく、その多くが HSCs に由来する可能性が示唆された。



tdTomato / Vpp3 / Nuclei

図1. 卵黄嚢マクロファージに由来する多核破骨細胞

2. 骨修復過程における骨髄 HSCs 由来と胎児卵黄嚢 EMPs 由来マクロファージの遊走を検証

骨修復過程に遊走するマクロファージ集団の由来を解明するため、胎生 9.5 日齢で 4 OHT の投与を受けた *Cx3cr1CreER; Rosa26tdTomato* マウスと *Flt3-Cre; Rosa26tdTomato* マウスの大腿骨に骨孔を作成しその修復過程を組織学的に解析した。骨傷後 3 日目の急性期には、多数の F4/80 陽性のマクロファージが組織損傷部位に遊走していた (図 2)。*Flt3-Cre; Rosa26tdTomato* マウスでは骨傷早期 (3~7 日目) から多数の tdTomato 陽性の HSCs 由来細胞が損傷部に集積したのに対して、*Cx3cr1CreER; Rosa26tdTomato* マウスの損傷部を確認すると、亜急性期から慢性期 (14 日から 21 日後) にかけて tdTomato 陽性細胞の遊走が確認された。以上の結果から、骨修復急性期には HSCs に由来するマクロファージが局所に遊走するのに対して、EMPs 由来のマクロファージは亜急性期から慢性期の骨修復に関与することが示された。また EMPs 由来マクロファージは骨修復部において TRAP 陽性、VPP3 陽性の多核破骨細胞へと分化することが明らかとなった。

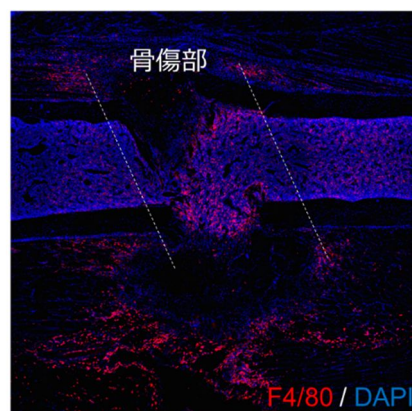


図2. 受傷後3日目に損傷部へ遊走したF4/80陽性マクロファージ

3. 老年マウスでは骨傷修復能が著明に低下する

若年 (2 か月齢) および老年マウス (20 か月齢) の大腿骨に骨孔を作成し、骨傷後 7 日目に大腿骨を採取し、マイクロCT による解析を行った。その結果、高齢マウスでは骨孔内部の新規骨面積が若年マウスに比べて有意に低下しており、骨修復能が著しく阻害されていることが明らかとなった。

4. 若年マウスの骨修復関連マクロファージの同定

骨傷の修復過程において損傷部周囲の骨髄細胞を継時的に回収し scRNA-seq 解析を行った。若年マウスと老年マウスの遺伝子発現の推移を比較検討することにより、若年マウスのマクロファージにおいて有意に発現する遺伝子群を同定した。このマクロファージの亜集団が、若年マウスの旺盛な骨修復能に関与しているという仮説の元、関連遺伝子の機能解析を進めている。本研究は、米国 Duke 大学整形外科との共同研究として進められており、ターゲット遺伝子の欠損マウス、ジフテリアトキシンを用いた亜集団の除去実験を行うことで、骨修復能に及ぼす影響の検証を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yahara Yasuhito, Ma Xinyi, Gracia Liam, Alman Benjamin A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Monocyte/Macrophage Lineage Cells From Fetal Erythromyeloid Progenitors Orchestrate Bone Remodeling and Repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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） 10.3389/fcell.2021.622035	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 Ide Shintaro, Yahara Yasuhito, Kobayashi Yoshihiko, Strausser Sarah A, Ide Kana, Watwe Anisha, Xu-Vanpala Shengjie, Privratsky Jamie R, Crowley Steven D, Shinohara Mari L, Alman Benjamin A, Souma Tomokazu	4. 巻 9
2. 論文標題 Yolk-sac-derived macrophages progressively expand in the mouse kidney with age	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	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） 10.7554/eLife.51756	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 Yahara Yasuhito, Barrientos Tomasa, Tang Yuning J., Puviindran Vijitha, Nadesan Puviindran, Zhang Hongyuan, Gibson Jason R., Gregory Simon G., Diao Yarui, Xiang Yu, Qadri Yawar J., Souma Tomokazu, Shinohara Mari L., Alman Benjamin A.	4. 巻 22
2. 論文標題 Erythromyeloid progenitors give rise to a population of osteoclasts that contribute to bone homeostasis and repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 49 ~ 59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-019-0437-8	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 該当する
1. 著者名 箭原康人, 川口善治	4. 巻 71
2. 論文標題 胎児卵黄囊erythromyeloid progenitorsに由来する破骨細胞の発見	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床雑誌整形外科	6. 最初と最後の頁 996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yahara Yasuhito, Nguyen Tuyet, Ishikawa Koji, Kamei Katsuhiko, Alman Benjamin A.	4. 巻 149
2. 論文標題 The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	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) 10.1242/dev.199908	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7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 箭原 康人, 川口 善治
2. 発表標題 破骨細胞の起源多様性に基づく骨恒常性維持機構の解明
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 箭原 康人, 川口 善治
2. 発表標題 骨軟骨領域における修復・再生研究の進歩 Single-cell RNA sequencingが解き明かす骨修能関連マクロファージの多様性とその変遷
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 箭原 康人, 亀井 克彦, 牧野 紘士, 渡邊 健太, 野上 真紀子, 関 庄二, 川口 善治
2. 発表標題 Single-cell RNA sequencingによる経年的な骨修復能低下メカニズムの解明
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 箭原 康人, 亀井 克彦, 牧野 紘士, 渡邊 健太, 野上 真紀子, 関 庄二, 川口 善治
2. 発表標題 Single-cell RNA sequencingを用いた,胎児卵黄囊および造血幹細胞由来破骨細胞前駆細胞の遺伝子プロファイルの比較検討
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 箭原 康人, 川口 善治, Alman Benjamin
2. 発表標題 scRNA-seqとRNA velocityによる細胞の分化過程シミュレーション 卵黄囊由来破骨細胞は造血幹細胞非依存的に発生する
3. 学会等名 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 箭原康人
2. 発表標題 炎症性骨代謝に関する新しい潮流 胎児卵黄囊造血に由来する破骨細胞の同定
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 箭原康人
2. 発表標題 骨恒常性維持と病態に関する破骨細胞の起源多様性
3. 学会等名 第17回Bone Biology Forum (招待講演)
4. 発表年 2021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	Duke大学医学部整形外科			