

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22938

研究課題名(和文) 生体内破骨細胞のシングルセル解析による骨カップリング機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of bone coupling mechanism through single cell analysis of bone cells

研究代表者

森本 彬人 (Morimoto, Akito)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10881740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体骨イメージング技術を駆使し、破骨細胞と骨芽細胞が相互作用を行う様子を観察した。さらに次世代シーケンサーやロックアウトマウスを用いた遺伝学的解析を用いて、破骨細胞と骨芽細胞のコミュニケーションに関わる分子を同定し、骨形成や骨再生を促進する新規骨再生医薬の開発につなげることを目指した。生体骨組織の網羅的遺伝子発現解析を行うことで、セリンプロテアーゼ阻害作用をもつ低分子タンパク質SLPIが生体内の骨芽細胞で発現していることを同定し、骨芽細胞に直接的に作用して分化を促進し、骨芽細胞と破骨細胞の細胞間相互作用を増加することで、破骨細胞と骨芽細胞の両方の機能を制御し、骨量を維持することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗しょう症をはじめとした骨量現象を伴う疾患の治療において、骨吸収を抑える薬剤に比べて骨形成を促進させる薬剤は限られており、骨を再生させる治療薬の開発が望まれている。本研究成果は、既存の骨形成促進薬の作用機序解析を行うことでその臨床的意義をさらに高めるとともに、骨粗しょう症など骨疾患の治療により効果的な骨疾患治療薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Bony tissue undergoes repetitive remodeling process throughout life. Osteoblasts and osteoclasts differentiate in spatially and temporally discrete units on the bone surface, and bone resorption is always followed by bone formation. The mechanisms by which osteoblasts locate to the bone space eroded by osteoclasts are unknown. To understand this, we analyzed bone tissue, using intravital imaging technique and genetic analysis. Here we revealed that secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a serine protease inhibitor, directly promotes osteoblast differentiation, while it regulates interaction between osteoclasts and osteoblasts to promote bone formation and suppress bone resorption. Collectively, these results demonstrate that SLPI regulates the communication between osteoblasts and osteoclasts to promote bone anabolism.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨カップリング 破骨細胞 骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨には自動的な新陳代謝を行う骨リモデリングと呼ばれる特異な機構が働いており、この機構の破綻は骨粗しょう症をはじめとした骨疾患の原因となる。正常な骨組織では、破骨細胞が古くなった骨を吸収し、骨吸収が行われた欠失部分に骨芽細胞が現れて骨を補填する、という順序立てられたプロセスが整然と繰り返されている。このように骨代謝の「順序」が成り立つのは、破骨細胞が骨吸収を終えた後に細胞間シグナル伝達(骨カップリング)を介して骨形成を誘導しているためと考えられ、これまでに骨カップリングに関わる因子が複数報告されてきた。しかし、骨芽細胞と破骨細胞が実際にどのような様式で互いにシグナルを伝達しあっているのか、細胞同士が直接コンタクトしてシグナルのやりとりをしているのかどうかについては議論の余地があった。当研究室では独自に確立した生体骨イメージング技術を駆使し、破骨細胞や骨芽細胞がリモデリングを行う様子を観察してきた。骨芽細胞と破骨細胞はそれぞれ数十細胞単位で小集団を形成しており、両者は近接していても多くは離れていること、ただ、いくつかの場所では骨芽細胞と破骨細胞が直接接触を行っていることが明らかとなった。また、この細胞間接触の多くは、破骨細胞がシナプス様の細胞突起を骨芽細胞に伸ばすことで形成されており、時間経過とともに細胞間接触が変化の様子が観察された。一方、骨形成促進薬 PTH を間欠的に投与したマウスでは、骨芽細胞と破骨細胞の細胞間接触が有意に増加し、破骨細胞の骨吸収が抑制されていることが明らかとなった。しかし、破骨細胞と骨芽細胞がどのような分子メカニズムでお互いの位置関係を維持しているのか明らかではなかった。さらに、骨芽細胞に隣接して細胞突起を伸ばしている破骨細胞は骨吸収を終えて骨形成への切り換え(骨カップリング)を行っている細胞であると考えられるが、骨吸収を活発に行っている破骨細胞と移行期の破骨細胞がどのように違うのか、その遺伝学的特徴については明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨代謝を行う中心的な細胞である骨芽細胞ならびに破骨細胞を選択的に分取することにより、各細胞の遺伝学的プロファイルを解析する系を確立することを目的とする。さらに、申請者らが確立してきた骨イメージング技術を応用することにより骨カップリングを行う細胞の遺伝学的プロファイルを解析し、破骨細胞と骨芽細胞のコミュニケーションを制御する分子メカニズムを統合的に解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨組織からの選択的細胞分離と網羅的遺伝子発現解析

成熟骨芽細胞および成熟破骨細胞を選択的に蛍光標識したマウス(Co12.3-ECFP/TRAP-tdTomato ダブルトランスジェニックマウス)の長管骨の凍結切片標本を作製し、各細胞の位置関係および細胞間コミュニケーションを観察した。さらに長管骨骨髓腔を開放しコラゲナーゼ処理、EDTA 処理を行うことで single cell suspension とし、セルソーターを用いて細胞を回収した。PTH 製剤を 3 週間間欠的に投与したマウスとコントロールのマウスからそれぞれ細胞を回収し、RNA-seq を用いて各細胞の遺伝子プロファイルを取得した。これにより、破骨細胞と骨芽細胞のコミュニケーションが亢進した状態と定常状態での細胞の遺伝子発現を網羅的に比較した。

### (2) レトロウイルスベクター、ノックアウトマウスを用いた遺伝子機能解析

上記解析により、PTH を投与したマウスの骨芽細胞ではセリンプロテアーゼ阻害作用を示す遺伝子の一群に変化が認められた。その中でもっとも発現変動が大きかった SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor) と呼ばれる遺伝子に着目した。SLPI 遺伝子欠損マウスを用いて、マイクロ CT や骨形態計測を用いて大腿骨遠位端の海綿骨量や骨形成能を解析した。また、二光子励起顕微鏡を用いて、SLPI 欠損マウスにおける骨芽細胞、破骨細胞のコミュニケーションを比較した。さらに、レトロウイルスベクターを用いて SLPI 遺伝子を過剰に発現した骨芽細胞を作成し、骨芽細胞の分化能や破骨細胞とのコミュニケーションへの寄与を解析した。

### (3) レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによる成熟破骨細胞の分離と解析

TRAP-tdTomato マウス大腿骨を凍結包埋し、クライオジェンテープトランスファースystem を用いて凍結切片スライドを作成した。レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを用

いて成熟破骨細胞を選択的に溶解し、tRNA を回収し、成熟破骨細胞の一細胞レベルでの網羅的な遺伝子定量解析を試みた。

#### 4 . 研究成果

##### (1) 骨組織からの選択的細胞分離と網羅的遺伝子発現解析

PTH を 3 週間間欠的に投与したマウスと定常状態のマウスの大腿骨凍結切片を作成しその遠位端を観察したところ、PTH 投与後のマウスでは破骨細胞と骨芽細胞の細胞間コンタクト数の増加が認められた。次に、マウス長管骨細胞懸濁液から Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> Col2.3-ECFP<sup>+</sup>細胞集団を単離し、遺伝子発現解析の結果骨芽細胞特異的な細胞集団であることが確認された。TRAP-ttdTomato<sup>+</sup>細胞集団を単離することも可能であったが、ソーティングしたところサイズの小さな細胞で占められており、成熟破骨細胞ではなく単核の細胞集団であると考えられた。次に、RNA-Seq による Lin<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> Col2.3-ECFP<sup>+</sup>成熟骨芽細胞集団の網羅的遺伝子発現解析を行った。結果、PTH 投与群と非投与群の間で 1043 遺伝子に有意な発現変動が認められた。Gene Ontology Enrichment 解析により、PTH 投与後の骨芽細胞ではプロテアーゼの機能を制御する遺伝子群に有意な発現上昇が認められた。その中で、創傷治癒効果や抗炎症作用を持つ分子 SLPI に最も大きな発現変動が認められた。

##### (2) レトロウイルスベクター、ノックアウトマウスを用いた遺伝子機能解析

SLPI 欠損マウスの大腿骨遠位端海綿骨量をマイクロ CT で計測した結果、SLPI 欠損マウスでは野生型マウスと比較して PTH の骨量増加作用が有意に減少することが分かった。SLPI 欠損マウスでは PTH 投与後の破骨細胞と骨芽細胞の細胞間コンタクトの頻度が、野生型マウスと比較して有意に減少していた。骨芽細胞における SLPI の役割を明らかにするために、レトロウイルスベクターを用いて SLPI を過剰発現する骨芽細胞株を作成した。これらの細胞株は、分化誘導時に骨芽細胞マーカー遺伝子発現が高く SLPI は骨形成を促進する因子であることが分かった。さらに、SLPI 強制発現株は破骨細胞と共培養したときの細胞間接着時間が有意に増加しており、以上の結果より、PTH は骨芽細胞の SLPI 遺伝子発現上昇を介して、破骨細胞と骨芽細胞の位置関係を制御し、骨量を増加させる可能性が示唆された。

##### (3) レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによる成熟破骨細胞の分離と解析

4%パラホルムアルデヒドにて固定した検体、および未固定の検体をそれぞれ SCEM ( Super Cryoembedding Medium ) 中に凍結包埋し、クライオジェンテープトランスファーシステムを用いて凍結切片スライドを作成した。レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを用いて ttdTomato 陽性領域として認識される成熟破骨細胞を選択的に溶解し、RNAeasy-micro kit を用いて tRNA を回収した。Agilent bioanalyzer 2100 および RNA6000 Pico kit を用いて tRNA の品質チェックを行ったところ、RNA の分解が起こっており、解析には不相当であると考えられた。当実験に関しては現在実験方法を改善中であり、今後のさらなる実験系の確立が必要と考えられる。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morimoto Akito, Kikuta Junichi, Nishikawa Keizo, Sudo Takao, Uenaka Maki, Furuya Masayuki, Hasegawa Tetsuo, Hashimoto Kunihiko, Tsukazaki Hiroyuki, Seno Shigeto, Nakamura Akira, Okuzaki Daisuke, Sugihara Fuminori, Ninomiya Akinori, Yoshimura Takeshi, Takao-Kawabata Ryoko, Matsuda Hideo, Ishii Masaru	4. 巻 12
2. 論文標題 SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22402-x	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本 彬人
2. 発表標題 SLPIはPTH誘導性骨形成に重要なメディエーターである
3. 学会等名 日本骨代謝学会
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
---------	---------