

機関番号：15401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791787

研究課題名 (和文) 性ホルモンとその標的因子による骨代謝調節と幹細胞ニッチの制御機構の解明

研究課題名 (英文) The study of regulation of bone metabolism and hematopoietic stem cell niche by steroid hormone and these target factors

研究代表者

樋山 伸二 (HIYAMA SHINJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60314754

研究成果の概要 (和文) : エストロゲンによる骨代謝と幹細胞ニッチの制御機構を明らかにするために、エストロゲン単回投与したウズラの骨髄骨形成モデルを用いて実験を行なった。骨髄骨における骨リモデリングには、OPG/RANKL/RANK システムが働いていた。骨髄骨形成過程では、骨髄中の細胞集団が変動し、急速に破骨細胞の前駆細胞が増加した。さらに、ニッチ細胞として、骨髄骨表面の骨芽細胞が機能していた。以上の結果から、エストロゲンは造血系幹細胞ニッチの制御に関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : To clarify the regulation of mechanism of bone metabolism and hematopoietic stem cell niche by estrogen, we used the medullary bone formation model of estrogen-treated male Japanese quails. Medullary bone remodeling was under the control of OPG/RANKL/RANK system. During medullary bone formation period, the population of bone marrow cells shifts from undifferentiated cells to osteoclast precursor cells and osteoblasts on the medullary bone act as a niche cells. These results suggest that estrogen may be related to regulate of hematopoietic stem cell niche.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：骨代謝・エストロゲン・幹細胞ニッチ

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、骨代謝不全、特に骨粗鬆症の増大が大きな問題となっている。骨粗鬆症は脊椎や下肢だけではなく、歯科領域における顎骨、さらには頭頸部の骨の非薄化を招き、咀嚼機能の低下および骨折を誘発している。従って、骨量の維持および増加は QOL 向上のため、可及的速やかに解決されなければならない。特に、女性においては閉経後のエストロゲン欠乏が骨吸収を亢進させ、急激な骨量減少に見舞われる。男性においても老人性骨粗鬆症以外に、エストロゲン受容体異常などによる骨量減少が報告されている。また、性ホルモン、特にエストロゲンは骨粗鬆症だけでなく、骨代謝全般における重要な調節因子であることから、その役割について哺乳動物を用いた研究が数多くなされ、新しい知見も得られているが、未だ不明な点が多く、一致した見解が得られていない。

さらに、近年、骨代謝の制御機構について、骨芽細胞および破骨細胞の分化とその相互関係に関するシグナル伝達といった新しい発見が相次いで発表されている。また、骨髄に「幹細胞ニッチ」と呼ばれる幹細胞が未分化状態で維持される微細環境が存在することが発見され、骨芽細胞が造血系幹細胞のニッチ細胞として機能していることが報告されている。しかしながら、骨代謝の関係は不明な点が多く、性ホルモンとの関係は前人未到の領域である。その原因として、骨代謝に関わる因子が多種多様で相互に複雑な関係を持っていること、さらには、リモデリングに要する時間が長いことが考えられる。

鳥類雌の特異組織である骨髄骨は、卵殻成分であるカルシウムの貯蔵庫および供給源として骨髄中に形成され、産卵周期における血中エストロゲン値の増減に応じて迅速なリモデリングを行なっている。また、実験的エストロゲン投与により、骨髄骨は骨髄中に容易に形成され、その後速やかに吸収されることが知られている。骨髄骨の骨芽細胞および破骨細胞にはエストロゲン受容体が存在しており、骨髄骨のリモデリングはエストロゲンの支配を強く受けていることが示唆されている。しかしながら、骨髄骨は形態学的ならびに生理学的研究は数多くなされたが、そのメカニズムに対する分子生物学的および生化学的アプローチはほとんどなされていない。そのため、骨髄骨の骨代謝の詳細は、哺乳動物を用いて得られた知見とは、ほど遠く、不明な点が多い。しかしながら、近年、骨髄骨の骨芽細胞の分化過程において、エストロゲン受容体 β は発現しておらず、エストロゲン受容体 α のみが発現していることが認められ

た。破骨細胞においてもエストロゲン受容体 α が発現していることから（未発表データ）、骨髄骨のリモデリングはエストロゲン受容体 α が関与していることが非常に強く示唆された。また、雄鳥へのエストロゲン投与による骨髄骨形成過程において、骨髄中の細胞群が大きく変動し、破骨細胞前駆細胞が増加していることを見出した。このことから、骨形成が進行するとともに、造血系幹細胞は破骨細胞の前駆細胞に分化し、成熟破骨細胞に分化すると伺える。それゆえ、骨髄骨は哺乳動物に比べ、迅速なリモデリングが可能となっていると推察される。さらに、骨髄内で骨リモデリングが行なわれることから、骨髄中の間葉系および造血系幹細胞の分化・増殖に関わる幹細胞ニッチが多数存在すると考えられる。以上のことから、鳥類の骨髄骨は、哺乳動物の性ホルモンと骨代謝、さらには幹細胞ニッチとの関係を明らかにするために非常に有効なモデルであると同える。

2. 研究の目的

性ホルモン、特にエストロゲンが骨代謝調節および骨髄幹細胞ニッチに果たす役割を明らかにするために、まず、エストロゲンに高い応答性を示す鳥類の骨髄骨を用いて、幹細胞ニッチにおけるエストロゲンに特異的に応答する遺伝子（エストロゲン応答遺伝子）とそのタンパク質（エストロゲン応答タンパク質）を検出する。次に、それらの遺伝子およびタンパク質が骨代謝および幹細胞ニッチに果たす役割を明らかにする。さらに、骨髄骨から得られた結果を基にして、哺乳動物の骨代謝調節および骨髄幹細胞ニッチにおけるエストロゲン応答遺伝子およびタンパク質の役割を明らかにし、エストロゲンによる骨代謝調節および骨髄幹細胞ニッチの制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

エストロゲンによる骨代謝と骨髄幹細胞ニッチの制御機構を明らかにするために、最初に、哺乳動物の骨組織に比べて、エストロゲンの応答性の高い鳥類の骨髄骨を用いて、*in vitro* および *in vivo* の実験を行なう。この実験の中でエストロゲン応答遺伝子およびタンパク質を明らかにし、骨代謝および幹細胞ニッチにおける役割を検討する。さらに、骨髄骨から得られた結果を元に、哺乳動物の骨代謝および幹細胞ニッチにおけるエストロゲンおよびエストロゲン応答遺伝子（タンパク質）の役割を明らかにする。

(1) 成熟雄ウズラにエストロゲンを単回投与すると、一過性に骨髄骨が形成され、直ちに吸収される。この骨髄骨形成期において、その形態的变化および骨髄細胞の動態

を観察しつつ、ニッチ細胞としての骨芽細胞および造血系幹細胞の局在を免疫組織化学的手法などにより検出する。また、この過程における骨髄中の間葉系幹細胞および造血系幹細胞の増減をFACS解析により明らかにする。

(2) 形成期および吸収期の骨髄骨、あるいはエストロゲン存在下で培養した雄ウズラの骨髄細胞におけるエストロゲンに特異的に反応する遺伝子をマイクロアレイなどにより同定する。また、その塩基配列から、発現しているタンパク質を明らかにする。

(3) 骨髄骨リモデリングにおけるエストロゲン応答遺伝子およびタンパク質の発現を *in situ* Hybridization 法、免疫組織化学などにより検出し、(1)で明らかになった幹細胞ニッチの局在との関係を検討する。また、骨芽細胞および破骨細胞の局在、さらにエストロゲン受容体を持つ細胞との関係についても検討し、骨髄骨リモデリングにおけるエストロゲン応答遺伝子およびタンパク質の役割を明らかにする。

(4) 雄ウズラの骨髄間葉系幹細胞および造血系幹細胞をエストロゲン存在下で単培養あるいは共培養を行い、それぞれの分化過程において、エストロゲン応答遺伝子およびタンパク質の発現を阻害あるいは抑制する。この分化過程におけるエストロゲン受容体の発現および幹細胞ニッチに関する分子の発現に及ぼす影響を検討する。

(1)～(4)の骨髄骨を用いた実験で得られたデータを基に、マウスを用いて、哺乳動物の骨代謝および骨髄幹細胞ニッチにおけるエストロゲンの役割を解明する。

(5) 骨髄骨で発現していたエストロゲン応答遺伝子の塩基配列を参考にし、マウスのエストロゲン応答遺伝子およびタンパク質を同定する。次に、マウスの骨髄間葉系幹細胞あるいは造血系幹細胞をエストロゲン存在下で培養し、それぞれ骨芽細胞あるいは破骨細胞の分化過程におけるエストロゲン応答遺伝子およびタンパク質の発現を検出する。また、それらの阻害あるいは抑制を行い、間葉系幹細胞または造血系幹細胞の分化に及ぼす影響を明らかにする。

(6) 卵巣切除による骨粗鬆症モデル動物を作製し、大腿骨や下顎骨の形態変化およびエストロゲン受容体を持つ細胞の動態や局在を観察しつつ、幹細胞ニッチの局在の変化を明らかにする。また、FACS解析などにより、骨髄細胞における間葉系幹細胞および造血系幹細胞の増減を検討する。さらに、エストロゲンあるいは抗エストロゲン薬を投与し、幹細胞ニッチの局在の変化を調べる。

(7) 骨粗鬆症マウスにおいて、エストロゲ

ン応答遺伝子およびタンパク質、ならびにエストロゲン受容体を持つ細胞を検出し、幹細胞ニッチの局在との関係を明確にする。また、エストロゲンあるいは抗エストロゲン薬の投与によるエストロゲン応答遺伝子およびタンパク質の発現の変化ならびに、エストロゲン受容体を持つ細胞を、幹細胞ニッチの局在とともに検討する。さらに、間葉系幹細胞および造血系幹細胞の増減を検討する。

以上の実験から、骨リモデリングと幹細胞ニッチにおけるエストロゲンの役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) エストロゲン投与による骨髄骨形成モデルを用いて、骨リモデリングにおけるOPG/RANKL/RANKシステムについて検討した。骨内膜細胞と骨髄骨表面に存在する骨芽細胞のRANKLの発現量に差は認められなかったが、OPGはエストロゲン投与後2日に高い発現量を示した。骨髄細胞のRANKLおよびOPGの発現量に顕著な差はなかったが、大腿骨ではOPGは投与後1日、RANKLは3日、RANKは0日と2日で高い発現を示した。免疫組織学的に検討した結果、RANKLとOPG陽性細胞はいずれも骨髄細胞と骨芽細胞に認められ、これらの細胞は破骨細胞周辺に存在した。RANK陽性細胞はエストロゲン投与後、骨髄中で減少したが、TRAP陽性細胞の出現とともに骨髄骨周辺に認められ、破骨細胞も陽性反応を示した。以上のことから、骨髄骨リモデリングは、哺乳動物と同様に、骨芽細胞および骨髄細胞におけるOPG/RANKL/RANKシステムにより破骨細胞の分化が制御されていることが示唆された。

(2) 同実験モデルにおいて、ニッチ細胞のマーカーとなるN-カドヘリンについて検討した。骨内膜細胞と骨芽細胞のN-カドヘリンの発現量に顕著な差はなかったが、投与後1日の骨髄細胞で高い発現を示した。また、免疫組織学的に検討した結果、骨内膜細胞と骨髄骨表面に存在する骨芽細胞は陽性を示し、その周辺に存在する骨髄細胞に陽性反応が認められた。この結果から、これらの細胞はニッチ細胞としての機能を持ち合わせ、骨髄骨形成にともない増加することが伺えた。

(3) エストロゲン投与後の骨髄内における造血系幹細胞の変動を検討するために、大腿骨から骨髄細胞を採取し、CFU-assayを行なった。その結果、CFU-macrophageあるいはCFU-granulocyte/macrophageが投与後0、1、2日の骨髄細胞に比べて、投与後3日の骨髄細胞で非常に多く形成された。この結果から、エストロゲン刺激により骨髄に存在する造血系幹細胞がmacrophage系

の細胞に分化が促されたことが推察された。

(4) Ficoll/Paque により、エストロゲン投与後の各日の骨髓細胞から単核細胞/リンパ球のみを分離し、RANKL/M-CSF 存在下で培養したところ、投与後3日の骨髓細胞において、TRAP 陽性の巨大多核細胞が多数形成された。この結果から、エストロゲン刺激により骨髓中の造血系幹細胞は破骨細胞の前駆細胞に分化が促されたことが示唆された。

(5) エストロゲン投与後の骨髓中の細胞集団の変動を明らかにするため、Flow cytometry により T 細胞、B 細胞、単球/macrophage および RANK 陽性の細胞の割合を検討した。その結果、T 細胞および B 細胞はエストロゲン投与後1日で増加し、2日以降、減少を示した。一方、単球/macrophage は投与後、増加傾向を示したが、3日で激減した。また、RANK 陽性細胞は、投与後1日でわずかに増加し、2日で減少したが、3日で再び増加する傾向が見られた。これらのことから、エストロゲン刺激は骨髓の細胞集団を変動させ、破骨細胞の前駆細胞を増加させることが推察された。

以上の結果から、骨髓骨形成過程で骨髓の細胞集団が変動するとともに、造血系幹細胞がニッチ環境から離れ、破骨細胞前駆細胞に分化することが示唆された。これらの前駆細胞は OPG/RANKL/RANK システムにより破骨細胞に分化することが推察された。また、骨芽細胞は破骨細胞の分化に関与するだけでなく、ニッチ細胞として機能することが伺えた。それゆえ、エストロゲンは、骨髓における造血系幹細胞ニッチの制御に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Shinji Hiyama, Toshie Sugiyama, Seiji Kusuvara, Takashi Uchida. Evidence for the expression of estrogen receptors in osteogenic cells isolated from hen medullary bone. *Acta Histochemica*. Vol. 111, 501-507, 2009. 査読有り

[学会発表] (計6件)

1. S. Hiyama, Y. Akagi, M. Yokoi, M. Nakahama, M. Watanabe, T. Uchida, The Alteration of Bone Marrow Cells for Osteoclastogenesis during Medullary Bone Formation in Estrogen-Treated Japanese Male Quails. 第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・

全国学術集会 合同大会, 2011. 3. 29. パシフィコ横浜 (横浜)

2. S. Hiyama, Y. Akagi, M. Watanabe, T. Uchida, The Osteoclastogenesis in the Alteration of Bone Marrow Cells during Medullary Bone Formation in Estrogen-Treated Male Japanese Quails. American Society for Bone and Mineral Research 32st Annual Meeting, 2010. 10. 17. Toronto (Canada)
3. 横井美有希・樋山伸二・内田隆、エストロゲン誘導による雄ウズラの骨髓骨形成過程における破骨細胞前駆細胞の形成、日本解剖学会 第65回中国・四国支部学術集会、2010. 10. 10. 広島国際大学 (広島)
4. 樋山伸二・赤城裕一・渡邊峰朗・内田隆、エストロゲン誘導による雄ウズラの骨髓骨形成過程における破骨細胞前駆細胞の形成、第28回日本骨代謝学会学術集会、2010. 7. 23. 京王プラザホテル (東京)
5. S. Hiyama, M. Watanabe, T. Uchida, The Regulation of Osteoclast Differentiation from Bone Marrow Cells During Medullary Bone Formation in Estrogen-Treated Male Japanese Quails. American Society for Bone and Mineral Research 31st Annual Meeting, 2009. 9. 14. Denver (U. S. A)
6. 樋山伸二・渡邊峰朗・内田隆、エストロゲン誘導による雄ウズラの骨髓骨形成期における骨髓細胞の破骨細胞分化の調節、第27回日本骨代謝学会、2009. 7. 25. 大阪国際会議場 (大阪府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋山伸二 (HIYAMA SHINJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60314754

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：