

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03051

研究課題名（和文）骨細胞の機能別サブポピュレーションの特定

研究課題名（英文）Analysis of functional subpopulations of osteocytes

研究代表者

林 幹人（HAYASHI, MIKIHITO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：50581914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：近年、骨細胞は骨の恒常性だけでなく、多臓器に作用する可能性が明らかにされてきた。しかしながら、これまで骨細胞は単一の集団とみなされ、機能的な細分化が行われてこなかったのが現状である。本研究では、我々が新たに作製した骨細胞特異的Cre発現マウスとAi9レポーターマウスを交配し、骨細胞のみが特異的に標識されていることを確認し、純度の高い骨細胞を単離することに成功した。これらの細胞をシングルセルRNA-Seqにより解析した結果、複数のサブポピュレーションに分かれ、それぞれ機能的に異なる可能性が示唆された。また、若齢と老齢の比較を行い、各クラスターや遺伝子発現の変化を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨細胞は多種多様な機能を有することが明らかである一方、同じ細胞が同時に多岐にわたる機能を発揮しているとは考えにくいにもかかわらず、骨細胞のサブポピュレーションに関する研究は行われておらず、未だ機能的に細分化されない単一のポピュレーションとして認識されているのが現状であった。本研究の成果により、機能的に異なる骨細胞のサブポピュレーションが存在し、それぞれ特化した機能を有する可能性が示唆された。このことにより、さらなる骨細胞による他臓器制御メカニズムに迫ることが可能となった。

研究成果の概要（英文）：It has become clear that osteocytes not only maintain bone homeostasis but also have the potential to act on multiple organs. However, osteocytes have been considered as a single population and functional specialization has not been investigated. In this study, we used mice obtained by crossing newly generated mice expressing Cre specifically in osteocytes with Ai9 reporter mice, and confirmed that only osteocytes are specifically labeled with tdTomato, and succeeded in isolating highly pure osteocytes. Analysis of these cells using single-cell RNA-Seq revealed that they were divided into multiple subpopulations, suggesting that they may be functionally distinct. We also compared young and old mice and analyzed changes in each cluster and gene expression.

研究分野：骨生物学

キーワード：骨細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年の研究において、骨細胞が骨の恒常性に必要不可欠な役割を担っているだけでなく、全身の様々な臓器に作用して生体恒常性を司る非常に重要な細胞であることが明らかにされてきた。具体的には、骨吸収、骨形成、骨細管周囲・骨小腔リモデリング、骨細胞性骨溶解、リン代謝などの骨・ミネラル代謝にとどまらず、力学的刺激の感知、血管新生、炎症、造血、筋・骨連関、エネルギー代謝、がん骨転移など、多様な生物学的過程に骨細胞が関連することが報告されてきた。

このように骨細胞は多種多様な機能を有することが明らかである一方、同じ細胞が同時に多岐にわたる機能を発揮しているとは考えにくい。にもかかわらず、骨細胞のサブポピュレーションに関する研究は行われておらず、未だ機能的細分化が行われていない単一のポピュレーションとして認識されているのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では骨細胞による生体恒常性調節システムを解明するため、我々が新たに作製した真に骨細胞特異的な Cre 発現マウスとレポーターマウスを用いて *in vivo* で骨細胞を特異的に標識することで骨細胞の単離を行った。これらの単離細胞のシングルセル RNA-Seq 解析を行い、ライブラリを作製して各細胞の遺伝子発現プロファイリング、発現パターンに基づいた細胞の分類・特徴づけを行うことで、これまで単一の集団としてみなされてきた骨細胞を機能的に細分化・定義づけし、骨細胞サブポピュレーションを特定してそれぞれの単一細胞の発現プロファイリングによって分化メカニズムを同定し、骨細胞の更なる新機能を発見することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、新規骨細胞特異的 Cre 発現マウスを用いた骨細胞の標識による骨細胞の特異的単離とシングルセル RNA-Seq とその詳細な解析による骨細胞サブポピュレーションの特定、およびその *in vivo* での検証、新たな骨細胞産生性因子の同定を行った。また、これらの結果において想定される結果が得られなかった場合、すでに解析が進行している骨細胞特異的欠失モデルマウスの骨・全身の解析による新たな骨細胞機能の探索を行い、確実な成果に結びつけることとした。

①新規骨細胞特異的 Cre 発現マウスを用いた骨細胞標識による骨細胞の特異的単離とシングルセル RNA-Seq

近年、骨細胞特異的 Cre マウスとして世界的に広く用いられてきた 8 kb および 9.6 kb *Dmp1* プロモーターの活性は骨細胞特異的ではなく、*Dmp1*-Cre マウスでは成熟骨芽細胞などの骨の細胞のみならず、筋細胞や消化管、脳などの一部細胞でも loxP 組み換えが起きてしまうことが明らかにされており、これまでの骨細胞特異的遺伝子欠損マウスとして報告された内容・解釈を再評価する必要性が生じている。

そこで、本研究ではこれまでの問題点、すなわち *Dmp1* プロモーターを用いた研究や *in vitro* での遺伝子発現プロファイリングによるスクリーニングとは異なり、我々が新たに作製した真に骨細胞特異的な Cre 発現マウスと Ai9 レポーターマウスを用いて *in vivo* で骨細胞を特異的に標識し骨細胞の単離を行った。シングルセル RNA-Seq 解析は独自に行うことが困難であることから、すでに多数の解析経験を有する企業に委託して解析を行った。

②シングルセル RNA-Seq 解析による骨細胞サブポピュレーションの特定とその *in vivo* での検証

本研究では 10X Genomics 社の Chromium を用いたバーコーディングとシングルセル RNA-Seq ライブラリ調整を行う企業に委託し、シングルセル解析解析を行った。illumina 社 HiSeq による次世代シーケンスの結果を次元圧縮法 t-SNE や UMAP、Development trajectory 解析などを行うことで詳細に解析し、骨細胞サブポピュレーションのクラスタリングを行った。さらに、これらの結果から各サブポピュレーションにおける特異的発現分子を同定した。

③新たな骨細胞産生性因子の同定とそのコンディショナル欠損マウス作製・解析による骨細胞新機能の同定

以上の解析で、新たな骨細胞機能に関わる分子を同定し、当該遺伝子領域に loxP を挿入し、真に骨細胞特異的な Cre マウスを用いることでコンディショナル欠損マウスを作製し、個体機能維持機構における骨細胞の役割を解析した。我々はすでに *i*-GONAD 法を導入しており、gRNA の効率次第では非常に安価にかつ迅速に loxP マウスの作製が可能である。また、必要に応じて、トランスジェニックマウスの作製や、受容体が想定されれば当該ノックアウトマウスを作製し、候補分子の生体における機能欠損および亢進状態を解析することで個体機能維持機構での詳細

な分子機構を解明する。

#### 4. 研究成果

Ai9 レポーターマウスと新規骨細胞特異的 Cre 発現マウスを交配することで、骨細胞のみを特異的に tdTomato で標識し単離する方法を確立した。骨から連続酵素消化法により骨細胞を含むフラクションを取り出し、FACS にてソーティングを行った。これらの細胞の RT-qPCR 解析から、既知の骨細胞特異的遺伝子の発現を確認した。さらに、Chromium を用いたバーコーディングとライブラリ調整を行い、HiSeq による次世代シーケンスの結果を Monocle、Seurat などにより次元削減やクラスタリング、疑似系譜解析などを行うことで解析した。その結果、複数の骨細胞サブポピュレーションを特定することに成功した。これまでに我々が集積した骨細胞遺伝子発現データベースや、既報の骨細胞シングルセル解析結果との比較を行い、特定された各クラスターが骨細胞であることを確認し、それぞれのクラスターは機能的に異なる可能性が示唆された。また、若齢と老齢の比較を行い、各クラスターや遺伝子発現の変化を解析した。他の解析も含め、骨細胞の新たな機能に関わっていると考えられる遺伝子 X に着目し、X の骨細胞特異的コンディショナル欠損マウスを作製した。これらの骨細胞特異的 X 欠損マウスでは加齢に伴う代謝表現型を示すことが明らかとなった。また、その受容体 Y は骨以外の臓器での発現が重要であることが様々な臓器特異的 Y 欠損マウスの解析から明らかとなり、骨細胞による他臓器制御の一員を担っている可能性が示唆された。本研究の成果により、機能的に異なる骨細胞のサブポピュレーションが存在し、それぞれ特化した機能を有する可能性が示唆された。このことにより、さらなる骨細胞による他臓器制御メカニズムに迫ることが可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yamashita Yu, Hayashi Mikihiro, Saito Mitsuru, Nakashima Tomoki	4. 巻 163
2. 論文標題 Osteoblast Lineage Cell-derived Sema3A Regulates Bone Homeostasis Independently of Androgens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqac126	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 Liu Anhao, Hayashi Mikihiro, Ohsugi Yujin, Katagiri Sayaka, Akira Shizuo, Iwata Takanori, Nakashima Tomoki	4. 巻 15
2. 論文標題 The IL-33/ST2 axis is protective against acute inflammation during the course of periodontitis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-024-46746-2	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林幹人、土谷洋輔、永松剛、中島友紀
2. 発表標題 ロイヤルゼリー構成成分10-ヒドロキシ-2-デセン酸はFFAR4を介したNF-κB抑制により骨量減少を抑制する
3. 学会等名 第6回日本骨免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林幹人、土谷洋輔、中島友紀
2. 発表標題 ロイヤルゼリーに含まれる10-ヒドロキシ-2-デセン酸はFFAR4を介してNF-κB活性化および破骨細胞分化を抑制することで閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける骨量を維持する
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
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
---------	---------