

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08417

研究課題名(和文) 骨と骨髄の発生における未分化間葉系細胞の分化運命決定機序の解析

研究課題名(英文) Analysis on cellular fate decision of mesenchymal cells during bone and bone marrow development

研究代表者

住谷 瑛理子 (Sumiya, Eriko)

東京大学・医学部附属病院・特別研究員

研究者番号：50724754

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)：骨髄は哺乳類の主要な造血組織である。骨髄の形成は胎児期に骨の発生と並行して進むことが知られるが、骨髄を構成する細胞の由来や分化系譜には未解明な点が残る。本研究ではマウス胎仔における骨と骨髄の間葉系細胞の分化系譜の解析に取り組んだ。その結果、最初期の骨髄を構成する一部の幼若間葉系細胞群がすでに骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞などに分化が方向づけされており、発生の進行に伴って成熟していくことが明らかになった。併せて、成長する骨髄と軟骨層の境界領域に胎仔期のセプトクラストが出現することを見出した。本研究によって造血組織の発生に寄与する細胞群の性状の一部が新たに明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤による化学療法に伴う骨髄抑制や、加齢による造血機能の低下に起因する貧血などに対して骨髄機能を賦活化する治療法の開発が必要とされている。機能的な骨髄の再建には、造血幹細胞の移植のみならず、同時にそれ支持する微小環境を再構築することの重要性が指摘されているが、その方法は確立されていない。本研究によって発生期の幼若骨髄を構成する細胞群の由来や性状の一端が明らかとなり、生体にプログラムされた造血環境の構築メカニズムに対する理解が進んだという学術的な意義に加え、同定した幼若細胞群に関する知見は将来的には人工的に骨髄を再建する技術の開発に資する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow is the major hematopoietic tissue in postnatal mammalian animals. Bone marrow is known to be formed along with bone development. However, the origin and cellular lineage of bone marrow-composing cells have not been fully elucidated. In the present study, cellular lineages of murine embryonic mesenchymal cells of the bone and bone marrow were analyzed. A portion of mesenchymal cells in the early bone marrow were found to be already committed to osteoblastic or bone marrow stromal lineages, and these nascent cells further matured as the developmental stage proceeded. Furthermore, fetal septoclasts were identified at the chondro-osseous junction of the developing bone marrow. Altogether this study provides new insights into the cellular populations which participate in the development of early hematopoietic tissue.

研究分野：骨発生学

キーワード：骨髄ストローマ細胞 骨髄発生 RANKL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類の造血は胎児期から始まり、血球産生の際は発生の進行に伴って卵黄嚢、胎児肝臓、その後骨髄へと移る。出生後の造血の大部分を担う骨髄は骨内部の骨髄腔に存在し、多数の血球と血管、その間に網目のように配置された骨髄ストローマ細胞と呼ばれる間質細胞などから成る。骨髄ストローマ細胞は、造血幹細胞の維持に必要な SCF や CXCL12 などの液性因子を産生することにより造血幹細胞ニッチとして働くことが明らかにされ、CAR 細胞、Lepr 陽性細胞、NG2 陽性細胞など複数の細胞集団が造血幹細胞ニッチとして働くことが示されてきた。しかしながら骨髄造血環境がどのような発生学的経緯を経て構築されるかの全容解明には至っていない。骨髄の発生は胎児期に開始し、骨の発生と並行して進行する。初めに将来骨が形成される部位に軟骨から成る原基が形成され、マウスにおいては胎齢 15.5 日頃から軟骨が骨および骨髄組織に置き換わるようにして骨と骨髄の発生が進む。形成初期の骨と骨髄組織を構成する間葉系細胞は、両骨端の軟骨および骨幹部を覆う軟骨膜に由来することが示されていたが、これらの間葉系細胞の発生学的上流細胞の性状や分化先が決まる機序の詳細は明らかにされていなかった。

(2) 我々はマウス胎仔の骨の発生メカニズムに関する研究を進めるなかで、骨髄形成が開始する時期の一次骨化中心に TNF ファミリーに属するサイトカイン RANKL を発現する細胞が出現することを見出した。さらにこの胎仔 RANKL 陽性細胞が、発生の進行に伴い骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞を含む複数の間葉系細胞種へ分化することを見出した。これらのことから、胎仔 RANKL 陽性細胞が骨髄ストローマ細胞などへ分化、成熟する機序を解き明かすことで、骨髄造血開始期における造血環境の成り立ちに迫れるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨髄形成の最初期に出現する骨髄ストローマ細胞など造血環境を構成する間葉系細胞の発生学的上流細胞の同定ならびに下流細胞への分化系譜を明らかにすることである。骨髄間葉系細胞の上流細胞として、骨髄造血開始期の一次骨化中心に出現する RANKL 陽性細胞に着目し、その細胞運命の追跡と造血組織の形成における機能および分子基盤を明らかにすることで、骨髄造血を可能にする微小環境が構築される仕組みの一端を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 一細胞遺伝子発現解析による E15-RANKL 細胞の性状解析

これまでの研究において RANKL 発現細胞を時期特異的に蛍光タンパク質 tdTomato で標識することができる *Tnfsf11^{TA/+};LC1;R26R-tdTomato* マウスを作成し、胎齢 15.5 日 (E15.5) の一次骨化中心に tdTomato 陽性細胞 (以降 E15-RANKL 細胞) が出現することを見出した。E15-RANKL 細胞を出生まで追跡したところ、LepR 陽性骨髄ストローマ細胞や Osterix 陽性骨芽細胞など複数の細胞種に分化していることを示す実験結果を得ていた。これらの結果から、E15-RANKL 細胞が周産期の骨と骨髄を構成する間葉系細胞種の上流細胞であることが推察された。そこで、E15.5 の胎仔骨から tdTomato 発現を指標に E15-RANKL 細胞をセルソーティングし、一細胞遺伝子発現解析 (scRNA-seq) を行った。E15-RANKL 細胞の一細胞レベルでの遺伝子発現プロファイルを明らかにすることで、E15-RANKL 細胞が均一な性状を有する共通前駆細胞集団であるか、あるいは異なる遺伝子発現上の特徴を有する不均一な細胞集団であるか否かを検討した。

(2) E15-RANKL 細胞の分化系譜の推定

E15.5 に tdTomato 標識した RANKL 陽性細胞を胎齢 17.5 日および生後 3 日に単離し、それぞれ scRNA-seq 解析を行った。(1) のデータと合わせ、E15.5、E17.5、P3 の各タイムポイントにおける一細胞遺伝子発現情報から cell trajectory 解析を行い、未分化細胞から骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞などに分化、成熟する過程を推定した。また軟骨細胞系譜細胞を標識できる *Col10a1-Cre; R26R-tdTomato* マウスの 15.5 胎仔骨について同様に scRNA-seq 解析を行い、E15-RANKL 細胞と比較することで E15-RANKL 細胞と軟骨細胞系譜細胞との関係を検討した。

(3) 遺伝子発現情報をもとにした機能的転写因子の候補探索と生体での機能の検証

E15-RANKL 細胞の scRNA-seq データについて発現差解析を行い、細胞機能に発揮に関わる可能性のある特異的に高発現する転写因子を探索した。得られた候補遺伝子を欠損したマウスを作成し、骨と骨髄発生に及ぼす影響を解析することで、生体での細胞機能発揮に関わる分子メカニズムを探った。

4. 研究成果

(1) E15.5 の *Tnfsf11^{TA/+};LC1;R26R-tdTomato* マウスの骨幹部から tdTomato 陽性の非血球細胞 (E15-RANKL 細胞) をセルソーティングし、Chromium システム (10X Genomics) を用いて一細胞遺伝子発現ライブラリーを調製し、次世代シーケンシングにより一細胞遺伝子発現データを得た。

解析の結果、E15-RANKL 細胞は5個のクラスターに分かれた。既知マーカー遺伝子の発現をもとに各クラスターの細胞種を判定したところ、骨芽細胞、骨芽前駆細胞、骨髄ストローマ細胞前駆細胞、軟骨膜細胞およびRANKL高発現細胞集団が見つかった。この結果から、E15-RANKL細胞が骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞の共通前駆細胞となる均一な未分化な細胞ではなく、すでに分化の方向性が決まり、既知マーカー遺伝子を発現する幼若細胞の集まりであることが分かった。RANKL高発現細胞として同定されたクラスターにおいては *Mmp9*、*Mmp13*、*Mmp14* 遺伝子を高発現していた他、*Fabp5* 遺伝子を特異的に発現していた。E15.5マウス大腿骨の組織免疫染色によりFABP5発現細胞の分布を調べたところ、一次骨化中心の軟骨-骨境界面に局在することが明らかになった。以上の遺伝子発現および組織分布の特徴は、既報の軟骨分解細胞セプトクラストと酷似することから、E15-RANKL細胞集団の中に見出された *Fabp5* 陽性 RANKL 高発現細胞は胎仔期のセプトクラストであると判断した。

(2) E15-RANKL細胞が骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞などへ分化する過程を探ることを目的として、*Tnfsf11^{1TA/+};LC1;R26R-tdTomato* マウスにE15.5からdoxycyclineを投与することによりtdTomato標識を止め、標識細胞をE17.5およびP3においてそれぞれ単離し、scRNA-seq解析を行った。E15.5、E17.5、P3の各タイムポイントでの結果を統合してクラスター分けを行ったところ、「幼若細胞」「骨芽細胞」「*Cxcl12*-low骨髄ストローマ細胞」「*Cxcl12*-high骨髄ストローマ細胞」「傍血管細胞」および「骨膜細胞」の6個の亜集団に分かれた。このうち骨膜細胞に分類されたE15-RANKL細胞は、*Tnfsf11^{1TA/+};LC1;R26R-tdTomato* マウスを用いた fate mapping 実験よりE14.5以前にtdTomato標識され、その後骨髄中でほとんど検出されないことが分かったため、E15.5以降の骨髄中にみられる標識細胞とは別系譜であることが示唆された。次にscRNA-seqの結果から骨膜細胞集団を除外した5個のクラスターをSTREAM法(Chen et al. *Nat Commun.* 2019)を用いて擬似時間解析した結果、幼若細胞集団から骨芽細胞と骨髄ストローマ細胞・傍血管細胞へ分岐する細胞系譜が推定された(図)。さらに、E15.5/E17.5/P3統合データのRNA velocity解析を行ったところ、主にE15.5の細胞から構成される幼若細胞集団中の別々の亜集団から *Cxcl12* 陽性骨髄ストローマ細胞および傍血管細胞がそれぞれ分化することを示唆する trajectory が描かれる結果が得られ、*Cxcl12* 陽性骨髄ストローマ細胞と傍血管細胞が互いに上流・下流関係にはないことが推定された。一方、E15.5のセプトクラストからは他の細胞種への分化を示唆するような trajectory は描かれなかった。

骨髄の間葉系細胞は一次骨化中心形成以前の軟骨膜由来の細胞ならびに軟骨由来の細胞から構成されることが報告されている。そこで軟骨系譜の細胞が標識される *Col10a1-Cre;R26R-tdTomato* マウスのE15.5における一次骨化中心からtdTomato陽性細胞を単離し、scRNA-seq解析を実施した。E15-*Col10a1*細胞およびE15-RANKL細胞のscRNA-seqデータを統合し解析したところ、二つのデータはほとんど重ならず、異なる遺伝子発現傾向を示すクラスターとしてプロットされた。この結果は、E15-RANKL細胞が軟骨細胞に由来しないことを示唆する。また胎仔セプトクラストに相当する細胞はE15-*Col10a1*細胞の中に見出されなかったことから、セプトクラストは軟骨細胞とは異なる細胞系譜から起こることが分かった。

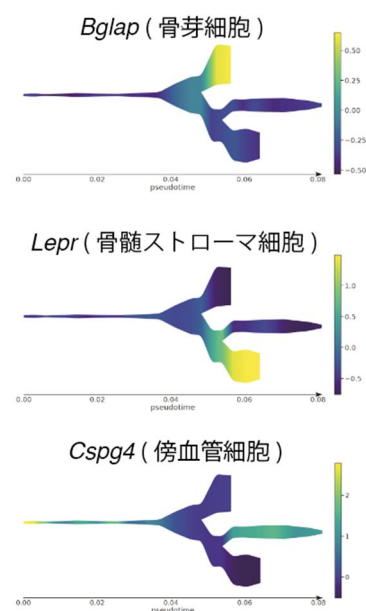


図 E15-RANKL細胞の擬似時間解析。 E15.5の幼若細胞集団を起点(左側)としてE15.5/E17.5/P3時点でのE15-RANKL細胞を遺伝子発現傾向に従い横軸を擬似時間としてプロットした細胞系譜推定図を得た。細胞系譜推定図における既知マーカー遺伝子の発現量を示す。

(3) E15-RANKLのscRNA-seq解析で同定された5個のクラスターに対して発現差解析を行った。その結果セプトクラストに特異的に高発現する転写因子として *Ets1* および *Mafb* を見出した。ETS1は関節リウマチ滑膜線維芽細胞においてRANKL誘導に働くことが報告されている(Yan et al. *Nat Immunol.* 2022)。そこでセプトクラスト特異的に *Ets1* を欠損させたマウス (*Ets1* cKO) を作出した。E15.5の *Ets1* cKOマウスの骨幹部の細胞をflow cytometryにより解析したところ、セプトクラストの数や頻度は対照マウスと同程度であったことから、*Ets1* は胎仔セプトクラストの形成には影響しないことが示唆された。さらにE15.5の *Ets1* cKOマウスの大腿骨を組織学的に解析したが、一次骨化中心の形成に異常は認められなかった。また *Ets1* を欠損したセプトクラストを単離し、RNA-seq解析により遺伝子発現を調べたところ、RANKLやMMP類の発現量は対照群と同程度であった。以上の結果は胎仔セプトクラストにおいて *Ets1* はRANKLやMMP類の発現には寄与せず、骨と骨髄の発生にも影響を与えないことを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 住谷瑛理子、澤新一郎
2. 発表標題 一次骨化中心に出現する胎仔RANKL陽性細胞は骨芽細胞および骨髄ストローマ細胞へ分化することで骨の発生に寄与する
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 Cartilage-degrading cells in the primary ossification center contributes to perinatal bone marrow development
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 住谷瑛理子
2. 発表標題 一細胞遺伝子発現解析を活用した骨髄発生に寄与する新規細胞集団の同定
3. 学会等名 第7回理論免疫学ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 RANKL+ cells in the primary ossification center contributes to perinatal bone marrow development
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住谷瑛理子、澤新一郎
2. 発表標題 胎仔期の軟骨-骨境界面に局在するセプトクラストは破骨細胞形成を促進し骨髄腔の発生に寄与する
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 RANKL-expressing cells in the primary ossification center functions as an osteoclast niche during early bone marrow development
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 住谷瑛理子
2. 発表標題 一細胞遺伝子発現解析を活用した破骨細胞誘導細胞の探索
3. 学会等名 第8回理論免疫学ワークショップ
4. 発表年 2024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
---------	---------