

令和 6 年 5 月 25 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：21K10085

研究課題名(和文) Wntシグナルによる骨モデリング・リモデリング制御機構の時空間的解析

研究課題名(英文) Spatiotemporal analysis of regulatory mechanisms for bone modeling and remodeling by Wnt signaling

研究代表者

疋田 温彦(Hikita, Atsuhiko)

東京大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：60443397

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)：古典的Wntシグナル活性を検出可能な蛍光プローブを作製した。骨モデリングおよびリモデリング過程をin vitroで再現し、2光子顕微鏡を用いた経時的解析を可能とした培養系において、骨形成過程における骨芽細胞形態と基質変化の関係を明らかにし、Wntシグナル刺激による骨芽細胞の再活性化過程を定量解析した。また、骨リモデリング過程において、基質吸収と形成の時空間的関連、すなわちカップリングを定量的に示し、カテプシン阻害によりカップリングが消失することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では独自の培養系を用いて、骨の恒常性維持において重要とされるWntシグナル活性と骨芽細胞や基質変化の関係を時空間的に明らかにした。また、骨の吸収と形成の関連を解析することは困難であるが、本研究では独自の培養系によりこの現象を捉え、また薬剤投与によりこの現象が影響を受けることを示した。本研究で得られた成果は、骨恒常性維持機構の理解を深め、よりよい骨粗鬆症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)：A fluorescence probe was constructed for the detection of Wnt signaling activity. In a culture system in which bone modeling and remodeling could be reproduced and observed temporally by two-photon microscopy, the relationship between osteoblast morphology and matrix change was elucidated. In addition, the re-activation process of osteoblasts by stimulation of Wnt signaling was analyzed quantitatively. Furthermore, in bone remodeling process, spatiotemporal relationship between matrix resorption and formation, which is called coupling, was indicated quantitatively, which was disappeared by inhibition of cathepsin activity.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨リモデリング 骨モデリング カップリング Wntシグナリング イメージング In vitro系

1. 研究開始当初の背景

歯科領域においては、歯周炎、外傷、腫瘍切除などにより歯槽骨の骨量低下や欠損が生じる。失われた骨の回復は、機能回復や整容面の改善のために大変重要である。

骨の恒常性は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により保たれている。骨粗鬆症治療剤である bisphosphonate や抗 RANKL 抗体は骨吸収を抑制するが、骨形成も同時に阻害する。近年、骨吸収阻害ではなく、骨形成促進により骨粗鬆症を治療する薬剤が開発され、臨床応用されている。例えば、Wnt シグナル阻害分子 sclerostin に対する中和抗体 (romosozumab) が優れた骨量増加作用を示している。また、PTH 製剤 (teriparatide) は間欠投与により骨形成促進作用を示す。その作用機序の一つとして、Wnt シグナルの関与が挙げられている (Xiao et al. Bone Reports 2018)。

口腔外科領域においても、Wnt シグナルを活性化するこれらの薬剤の応用が期待されている。例えば、sclerostin 中和抗体についてはラット歯周炎モデル (Taut et al. JBMR 2013、Chen et al. Bone 2015)、ラット顎骨欠損-インプラント植立モデル (Yu et al. Tissue Eng Part A. 2018)、ラット歯槽骨の大欠損モデル (Yao et al. Sci Rep 2020) などで骨再生を促進したとする報告がある。また、PTH の間欠投与により、健常あるいは糖尿病ラット歯周炎モデルでの歯槽骨減少抑制効果 (Tokunaga et al. J Periodontal Res. 2011、Chen et al. Arch Oral Biol. 2017、Kim et al. J Transl Med. 2018) が示されている。しかし、romosozumab は有効性を示す期間が限られており、また teriparatide は骨肉腫のリスク上昇の懸念があり、それぞれ生涯のうち 1 年間、2 年間しか投与できない。この欠点を克服した新しい治療法の開発には、Wnt シグナルの骨代謝における役割を詳細に解析する必要がある。

Wnt シグナルの骨代謝における重要性は、Wnt シグナル関連因子の遺伝子変異が種々の骨系統疾患を生じることからも明らかである (Huybrechts et al. Front Endocrinol (Lausanne). 2020)。しかし、骨モデリング・リモデリングにおいて、細胞ごとの Wnt シグナル活性が様々な因子により、どのように時空間的制御を受けるのかはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨代謝において重要な役割を果たす Wnt シグナルと骨芽細胞、破骨細胞、基質変化との時空間的関連を、細胞レベルで明らかにすることである。

3. 研究の方法

骨モデリング・リモデリング in vitro 再現系と、Wnt シグナル活性検出蛍光プローブを用いて、骨モデリング、骨リモデリングにおける Wnt シグナル活性変化を細胞ごとに、時空間的に解析する。さらに、Wnt シグナル活性に影響を及ぼす様々な分子や薬剤を投与し、Wnt シグナル活性変化と細胞の挙動変化をあわせて解析し、骨モデリング、骨リモデリングにおいて観察される現象と Wnt シグナル活性との関連を明らかにする。

4. 研究成果

骨モデリング過程、骨リモデリング過程において、骨芽細胞での古典的 Wnt シグナル活性を蛍光で検出するために、TCF/LEF 結合配列、蛍光タンパク (mCherry) 遺伝子配列、Puromycin 耐性遺伝子配列を持つレトロウイルスベクターを作製した。これをパッケージング細胞にトランスフェクションし、上清を回収してレトロウイルス液を調製した。調製したウイルス液を細胞に感染させ、その蛍光タンパク発現を評価した。

骨モデリング過程における骨芽細胞形態変化と基質産生、Wnt シグナルの関連を検討するために、EGFP 発現マウス由来骨芽細胞を骨芽細胞分化培地 (ascorbic acid, β -Glycerophosphate 含有) で培養し、同一部位を数日ごとに 2 光子顕微鏡で観察した。骨芽細胞が産生するコラーゲン基質は、第二次高調波発生により無染色で検出した。その結果として、骨基質形成活性が高いと考えられる立方形の骨芽細胞が存在した部位で、その後の基質の添加が起こっていることを視覚的および定量的に示した。これらの立方形の骨芽細胞においては、高い運動性と、細胞膜の局所的な突出と後退を繰り返す現象である Blebbing が観察できた。また、基質の増大に伴い、骨芽細胞の形態が徐々に扁平化していくことを、画像解析ソフトを用いて定量的に示した。骨芽細胞が扁平化した状態で、Wnt シグナル系を活性化する薬剤である BIO を添加し、経時的な観察を行ったところ、扁平な骨芽細胞が再び立方形へと変化し、激しく移動することを確認した。さらに、BIO 投与による Wnt シグナル系再活性化により、対照群と比較して基質の形成が増大することを定量的に示した。

Wnt シグナル活性化物質である BIO や、骨粗鬆症治療に一般的に用いられるビスフォスフォネートの一種であるゾレドロン酸、カテプシン阻害剤である E64 など様々な薬剤が骨恒常性に与える影響を検討するために、骨リモデリングを *in vitro* で再現した実験系を用いて検討した。上記と同様に、EGFP 発現マウス由来骨芽細胞を骨芽細胞分化培地で培養し、石灰化結節を形成させた。次に、破骨細胞を蛍光標識可能な、RANK-Cre; R26Tomato マウスあるいは Ctsk-Cre; R26Tomato マウスより採取した骨髄細胞を加えて、VitB12、Prostaglandin E2 含有培地で 2 または 3 週間共培養した。その後、再度骨芽細胞分化培地を用いて 3 週間培養した。この間、共培養開始時から 1 週間ごとに同一部位を 2 光子顕微鏡により観察した

(図 1)。その結果、破骨細胞により生じた吸収窩が骨芽細胞による基質形成により特異的に充填される様子が観察された。

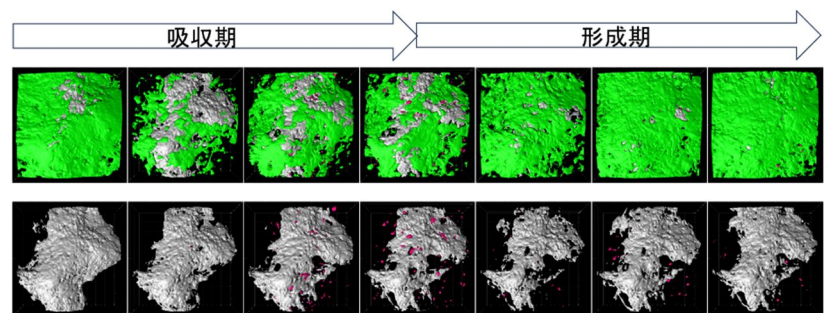


図1: 同一部位の1週間ごとの経時的観察

この吸収窩の特異的な再充填を定量的に示すためには位置情報を含めた解析が必要である。これを可能とするために、解析法の改良を行った。Region of Interest (ROI) を 16 分割して、それぞれの領域における器質、骨芽細胞、破骨細胞パラメータを定量化し、それぞれの値の相関について解析した。その結果、骨吸収と骨形成の両者が見られた領域においては、吸収量と形成量の間には中等度の相関がみられた (図 2)。すなわち、吸収と形成は量的およ

び空間的に関連していることが示された。また、破骨細胞パラメータと器質吸収量、骨芽細胞パラメータと器質吸収量に相関がみられた。しかし、骨芽細胞パラメータと基質形成量あるいは破骨細胞パラメータとの相関はみられなかった。これについては、骨芽細胞が密集して存在しており、大きな塊として認識されてしまっていることがこの結果に影響していると考えられた。そのため、細胞シグナル領域のセグメンテーションを行って一つの細胞ごとに解析したところ、相関が見られなかったこれらのパラメータ間にも相関が示された。

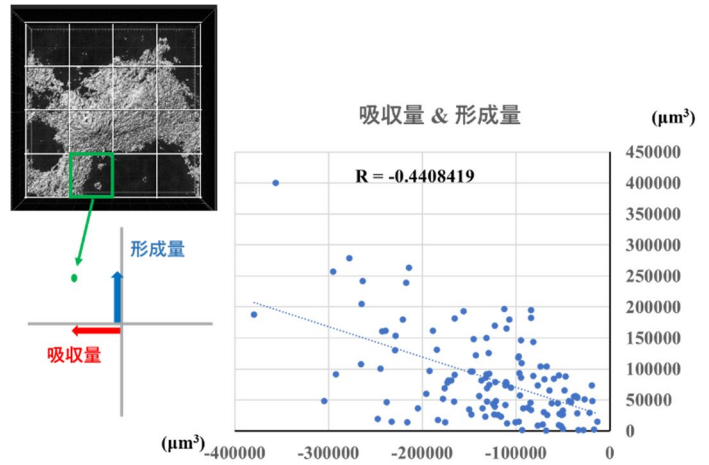


図2: 各部位における基質吸収量と形成量は中等度の相関を示す

投与した薬剤のうち、ビスフォスフォネートの一種であるゾレドロネートについては、投与した際に吸収と形成の両者が抑制されたが、それらの量的・空間的相関は保たれていた。一方、カテプシン阻害剤である E64 を投与したところ、吸収量と形成量の抑制はゾレドロネート投与時ほどではなかったが、これらの量的・空間的相関は相関がみられなくなった(図3)。このことから、カテプシン阻害はカップリングを乱すことが示唆された。

コントロール群では吸収期の終わりににおける骨芽細胞の球形度とその後の骨形成量に相関が見られた。画像的には、吸収窩に比較的球形度の高い骨芽細胞が出現しており、定量データはこれを示しているものと考えられた。過去の文献では、骨吸収窩には reversal cell と呼ばれる骨芽細胞系細胞が出現し、吸収期と形成期の橋渡しにおいて重要な働きをされるとされている。E64 投与群ではこの比較的球形度の高い骨芽細胞の出現が抑制されており、E64 によるカテプシン阻害はこの reversal cell 様細胞の出現抑制を通じてカップリングを乱している可能性が示唆された。

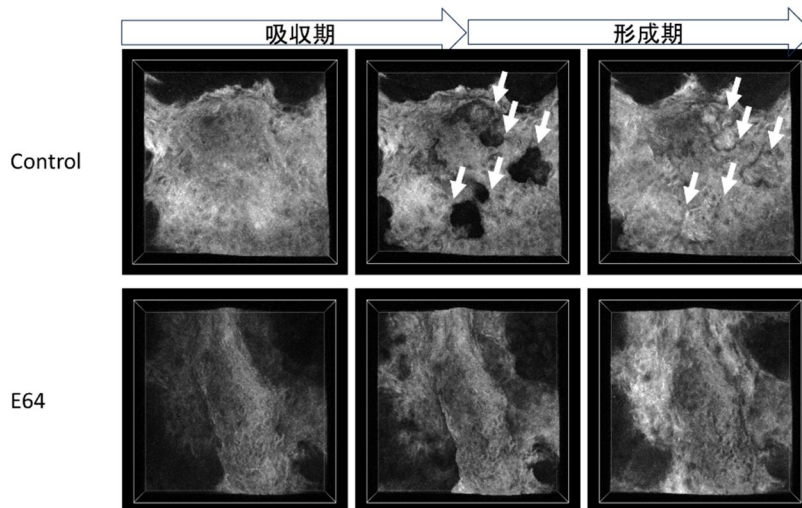


図3: Controlでは吸収部が特異的に充填されるが、E64群では吸収と形成の関連が不明瞭となる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ono Sayaka, Tsuji Naoki, Sakamoto Tomoaki, Oguchi Shuya, Nakamura Takashi, Hoshi Kazuto, Hikita Atsuhiko	4. 巻 42
2. 論文標題 Inhibition of cysteine protease disturbs the topological relationship between bone resorption and formation in vitro	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 166 ~ 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-023-01489-w	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 Tsuji N, Sakamoto T, Hoshi K, Hikita A.	4. 巻 6
2. 論文標題 Spatiotemporal Analysis of Osteoblast Morphology and Wnt Signal-Induced Osteoblast Reactivation during Bone Modeling in Vitro.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 e10689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm4.10689	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 Oguchi Shuya, Sakamoto Tomoaki, Hoshi Kazuto, Hikita Atsuhiko	4. 巻 41
2. 論文標題 Quantitative analyses of matrices, osteoblasts, and osteoclasts during bone remodeling using an in vitro system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 3 ~ 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-022-01381-z	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辻 直紀、坂本 朋昭、中村 貴、星 和人、疋田 温彦
2. 発表標題 骨リモデリング再現系での破骨細胞のアポトーシスによるカップリングへの影響
3. 学会等名 第77回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 疋田 温彦
2. 発表標題 骨モデリング・リモデリングのin vitroイメージング
3. 学会等名 第43回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻 直紀、坂本 朋昭、中村 貴、星 和人、疋田 温彦
2. 発表標題 骨リモデリング再現系での破骨細胞のアポトーシスによるカップリングへの影響
3. 学会等名 第43回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野 紗也加、坂本 朋昭、小口 修矢、辻 直紀、中村 貴、星 和人、疋田 温彦
2. 発表標題 骨代謝ネットワークin vitro再現系を用いた骨吸収抑制剤の骨リモデリングに対する 影響の時空間解析
3. 学会等名 第43回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野紗也加 小口修矢 辻直紀 中村貴 星和人 疋田温彦
2. 発表標題 骨代謝ネットワークin vitro再現系を用いた骨吸収抑制剤の骨リモデリングに対する影響の時空間解析
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 辻 直紀, 星 和人, 疋田 温彦
2. 発表標題 Bone nodule形成過程における骨芽細胞形態とWnt Signalによる骨芽細胞の再活性化の時空間的解析
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 Naoki Tsuji, Tomoaki Sakamoto, Takashi Nakamura, Kazuto Hoshi, Atsuhiko Hikita
2. 発表標題 Bone remodeling reconstitution system revealed the engulfment of apoptotic osteoclasts by osteoblasts contributed to osteogenesis.
3. 学会等名 第22回東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻 直紀, 星 和人, 疋田 温彦
2. 発表標題 2光子顕微鏡を用いた骨形成過程における骨芽細胞形態の時空間的解析
3. 学会等名 第76回日本口腔科学学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻 直紀, 坂本 朋昭, 星 和人, 疋田 温彦
2. 発表標題 骨形成過程における骨芽細胞形態とWnt Signalによる骨芽細胞の再活性化の時空間的解析
3. 学会等名 第42回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本 朋昭、山脇 孝徳、杉山 円、疋田 温彦、星 和人
2. 発表標題 骨芽細胞培養条件と石灰化結節形態の関連についての解析
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	阿部 雅修 (Abe Masanobu) (10392333)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	星 和人 (Hoshi Kazuto) (30344451)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	

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
---------	---------