

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11722

研究課題名（和文）メカニカルストレスを受容した骨細胞が分泌する膜小胞の破骨細胞分化誘導機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of osteoclastogenesis by membrane vesicles secreted from mechanical stress loaded osteocyte.

研究代表者

伊藤 智広 (Itoh, Tomohiro)

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：30435854

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）：機械的刺激後の骨細胞から分泌される膜小胞には、破骨細胞の分化を誘導する能力があることが判明した。この誘導機構には、機械的刺激によって内包されるタンパク質が関与している可能性が高く、これらタンパク質のN型グリカンが破骨細胞の分化誘導に関与することも報告されている。レクチンチップアレイ分析における-2,6-シアル酸修飾N型グリカンの量の増加は、推定タンパク質の関与を強く裏付けた結果といえる。また、単一細胞分析により、骨細胞から分泌された膜小胞の大部分が前駆破骨細胞に取り込まれるものの、その一部が破骨細胞に分化することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動など骨に荷重負荷を与えるとその荷重に適応する骨の強度を上げるために既存の骨をまず壊す工程が始まる。本研究では、この骨溶解の機構に荷重負荷のセンサー細胞である骨細胞が分泌する膜小胞が関与していることを明らかにすることができた。さらに、この骨細胞からの膜小胞だけでは分化誘導は調節されておらず、この膜小胞を受容する前駆破骨細胞の表現系（型）も重要であることが明らかとなり、この両条件が整った細胞のみ破骨細胞へ分化することが可能となると考えられた。「まず骨が壊され、新しい骨が作られる」という骨恒常性機構における骨細胞とその膜小胞の一役を示す結果といえる。

研究成果の概要（英文）：It was found that membrane vesicles secreted from osteocytes subjected to mechanical stress have the ability to induce osteoclast differentiation. The mechanism of this induction may involve proteins that are internalized by the mechanical stimuli. The N-glycans of the putative osteoclast differentiation-inducing protein contained in the membrane vesicles have been reported to be involved in the induction of osteoclast differentiation. And the increased amount of -2, 6-sialic acid-modified N-glycans in the lectin chip array analysis in this research strongly support the involvement of the putative protein. Fluorescence microscopy and single cell analysis revealed that membrane vesicles secreted from osteocytes were mostly taken up by progenitor osteoclasts and some of them were transformed into osteoclasts.

研究分野：健康科学

キーワード：骨細胞 膜小胞 メカニカルストレス 破骨細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

我が国は超高齢化社会を迎え、ロコモティブシンドロームや長期臥床による廃用性骨粗鬆症患者が増加しており、高齢者が認知機能だけでなく身体機能の低下に至らない取り組みが求められている。その取り組みの一つとして、毎日の運動が推奨されている。これは、生体の組織が外界の機械的刺激感受後にその環境変化に適応するべく細胞内で相応の情報伝達を活性化し、自らの体を構築するためである。ヒトの生体基軸である骨は、動的平衡を保ちながらその年代に適した骨代謝を行っている。骨を壊す役割の破骨細胞と骨を作る骨芽細胞に指令を出す骨細胞は機械的刺激を感知すると、ギャップ結合によって連結した樹状突起により情報伝達するシステムと骨小腔と、骨細管の傍骨細胞間隙を用いた細胞外情報伝達システムを介して隣接する骨芽細胞や破骨細胞に効率的に情報を伝達するシステムによって、骨代謝を制御することが知られている。しかし、前述のような機械的刺激感受後の骨代謝メカニズムは徐々に機構解明されつつあるものの、「細胞が如何に機械的刺激を感受し、どのような細胞情報伝達系が作動するのか」の問いに対する充分な理解には至っておらず、引き続き追究する必要がある。

2. 研究の目的

近年、生体基軸である骨の骨量維持を司る骨細胞や骨芽細胞、破骨細胞が分泌する膜小胞に内包されるマイクロ RNA (以下 miRNA) をはじめとする核酸やタンパク質の骨代謝制御機構が注目されている。申請者は、これまでの研究にて、骨細胞に機械的刺激を与えることで分泌された膜小胞が破骨細胞の分化を誘導する現象を確認した。この結果から、申請者は骨細胞が放出する膜小胞が破骨細胞の分化を優先させる一つの要因となり、「まず骨が壊され、新しい骨が作られる」というホメオスタシス機構を成り立たせているのではないかと考えた。そこで、本課題では、この機械的刺激負荷骨細胞分泌膜小胞の骨代謝における役割を明らかにするために、膜小胞の構造の解析と内包される破骨細胞分化関連因子を同定し、骨細胞分泌膜小胞が破骨細胞の分化に積極的に関与することによる骨代謝調節機構の新たな知見を示すとともに膜小胞構成成分の骨粗鬆症等の骨疾患への応用利用の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および機械的刺激負荷

マウス長骨由来骨細胞様株 MLO-Y4 細胞 (米国インディアナ大学 Lynda F. Bonewald 博士より分与提供) およびマウスマクロファージ細胞 RAW264.7 細胞 (国立研究開発法人国立長寿医療研究センター池田恭治博士より分与提供) 株はそれぞれ 10%エクソソームフリー牛胎児血清, 50 U/mL ペニシリン, 50 µg/mL ストレプトマイシンを含んだ MEM または DMEM 培地 (いずれも Invitrogen) にて培養した。骨細胞株 MLO-Y4 細胞への機械的刺激負荷は、細胞を 3D スキャフォールド (GC 研究所) に 1×10^5 cells/mL の密度で播種し、72 時間前培養を行った。その後、静水圧刺激装置 (ストレックス株式会社製 SPB-100) を用いて MLO-Y4 細胞を播種した 3D スキャフォールドに 1.5 MPa, 1 時間の機械的刺激を負荷した。

(2) 機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞の調製

機械的刺激を負荷した培養細胞培地を回収し、 $15,000 \times g$, $4^\circ C$, 30 分間の遠心処理により細胞デブリスを除去した。得られた上清をさらに超遠心機 (バックマンコウルター (株), Optima™ TLX) により $100,000 \times g$, $4^\circ C$, 60 分間処理し、膜小胞を回収した。沈澱させた膜小胞をさらに PBS(-) を用いて懸濁後回収し、qEV10 (35 nm, メイワフォーシス株式会社) カラムを用いたサイズ排除カラムクロマトグラフィーにより膜小胞を調製した。膜小胞の濃度および平均粒子径は、ナノ粒子解析システム NanoSight (日本カンタム・デザイン (株)) により測定した (図 1)。

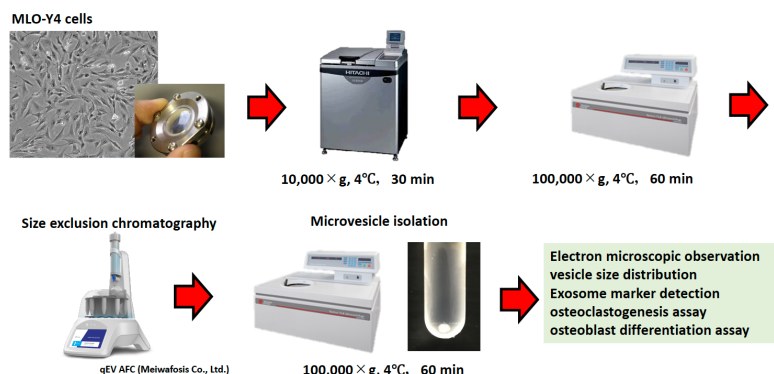


図 1. 機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞が分泌した膜小胞の回収フロー

(3) 機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞における膜表面糖鎖解析

機械的刺激負荷および未負荷の MLO-Y4 細胞を 400×g, 4°C, 5 分間の遠心処理により回収した。Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit を用いて細胞膜画分を調製した。得られた細胞膜画分抽出液を Micro BCA™ Protein Assay Kit を用いてタンパク質の定量を行い、使用時まで -80°C にて保管した。細胞膜タンパク質抽出物を 1% Triton X-100 リン酸緩衝液にて 1,000 ng/75 μL に、細胞外小胞はリン酸緩衝液にて 1,000 ng/20 μL となるようにタンパク質濃度を調整した。100 μL の Cy3 NHS Ester Mono-reactive Dye Pak に拡張性サンプルを加え、ピペッティングにより溶解し、スピンドウンにより回収後、暗所にて 1 時間室温で静置した。脱塩カラム Zeta™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO 0.5 mL を 2.0 mL チューブにのせ、1,500×g, 4°C, 1 分間遠心した。カラムに TBS を 300 μL を加え、1,500×g, 4°C, 1 分間遠心することで、チューブ内の洗浄を 3 度行った。その後、脱塩カラムを新しい 1.5 mL チューブに乗せ替え、各標識サンプル全量（細胞膜抽出タンパク質：75 μL, 細胞外小胞：20 μL）を添加し、TBS 25 μL を加えた後、1,500×g, 4°C, 2 分間遠心した。遠心後、チューブに回収した溶液に LecChip™ 測定試薬の Probing solution を 500 μL を加え、2,000 ng/mL の濃度に調整した。LecChip™ の各ウェルに Cy3 標識済みサンプルを 100 μL を 20°C で一晩反応させた。LecChip™ の液相状態を GlycoStation™ 2300 で測定した（測定条件：積算回数, 1 回；露光時間, 532, 998, 1996, 2995, 3993, 4992, 6988, 9984 msec）。測定後、解析ソフト GlycoStation® Tools Pro Suite 3.0 を用いて蛍光シグナルを数値化し、データ統合を行った。

(4) 機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞の RAW264.7 細胞への取り込み

リン酸緩衝液に懸濁した膜小胞に Sciforium™ FI7510（東洋インキ株式会社）染色液を加え（200 μM に調整した FI7510 を 4 μL 添加）、25°C, 60 分間染色後、0.45 μm フィルターにて濾過した。濾過後、100,000×g, 4°C, 60 分間の遠心を行った。遠心操作終了後、直ちに上澄を慎重に取り除き FBS 不含 MEM 培地に分散させた。この蛍光色素染色済み膜小胞を予めスライドガラスチャンバー（LAB-TEK® II Chamber Slide (Thermo Fisher Scientific)）に播種したマウスマクロファージ RAW264.7 細胞（1×10⁵ cells/mL）に添加後、18 時間 37°C で培養した。18 時間後、Hoechst33342 を終濃度が 50 μg/mL となるように加え、15 分間染色した。その後、ProLong™ Glass Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) をスライドに滴下し、カバーガラスを被せ、CoverGrip™ Sealant（コスモバイオ株式会社）を用いて固定した。膜小胞の取り込みは、Cy5.5 バンドパスフィルターを用いて蛍光顕微鏡 BZ-800（キーエンス株式会社）により観察した。

(5) シングルセル解析を用いた機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞による培養系前駆破骨細胞における細胞集団解析

機械的刺激負荷および未負荷の MLO-Y4 細胞培養溶液から調製した細胞外小胞を RAW264.7 細胞に終濃度が 800 ng protein/mL となるようにそれぞれ添加し、5 日間処理した。処理 5 日後、細胞をセルスクレーパーにて回収し、40 μm のセルストレーナーを通し、細胞数を計数した。その後、生存している細胞の濃度が 15,000 個/μL となるように調整した。シングルセル解析は株式会社ジエンブルに委託し、10x Genomics 社の標準プロトコルに従って実施した。

4. 研究成果

(1) 機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞における膜表面糖鎖解析

機械的刺激負荷による糖鎖修飾量への影響は、細胞の膜タンパク質および細胞外小胞タンパク質の双方で確認できた。定常圧培養と比較して、機械的刺激負荷がかかった膜タンパク質では、単位タンパク質あたりの糖鎖修飾量は機械的刺激負荷により減少することが示唆されたとともに、その影響は膜タンパク質の方がその影響を受けやすいことがわかった。また、機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞の膜タンパク質は α2-6 結合のシアル酸認識レクチンのシグナルが増加した。一方、細胞外小胞では全体の糖鎖プロファイルは類似しているが、糖鎖修飾量は機械的刺激負荷なし MLO-Y4 細胞由来の細胞小胞の方が高かった。さらに細胞外小胞では膜タンパク質と比較して、末端がシアル酸修飾された N 型糖鎖コンプレックス構造（コアフコース構造を含む）の割合の増加、また O 型糖鎖構造（シアル酸が 1 つないしは 2 つ付加した T 抗原構造）の割合が増加している可能性が示唆された。これらのレクチンシグナルの増加は、下田らの mesenchymal stem cell における膜タンパク質と細胞外小胞との比較解析と同様な傾向を示した (Simoda A., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **491**(3), 701-707 (2017))。また、機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞由来細胞外小胞では LecChip™ 上における ACG, LEL, STL のシグナルが同調して高いことからポリラクトサミン構造の伸長の割合が多いことが推察された (図 2)。

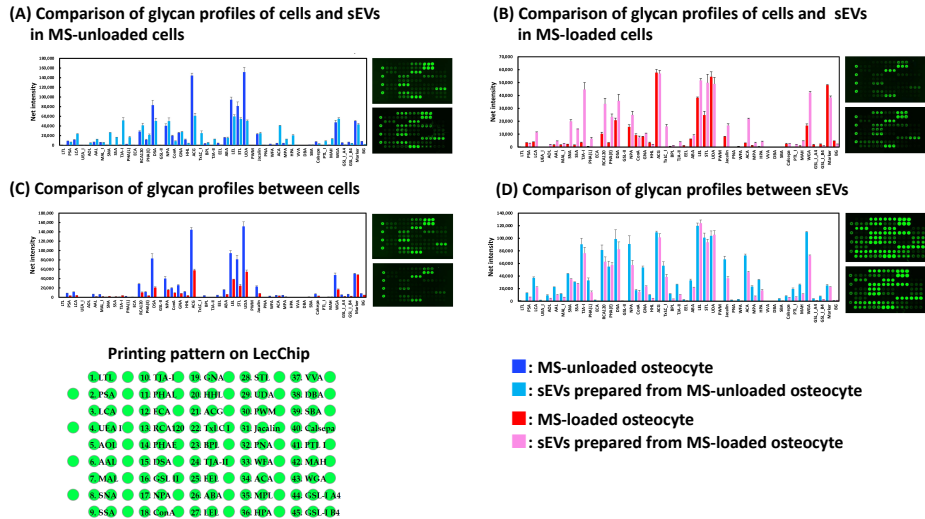


図 2. 機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞における膜表面糖鎖解析

(A) 機械的刺激未負荷細胞および分泌膜小胞間の糖鎖修飾比較, (B) カニカルストレス負荷細胞および分泌膜小胞間の糖鎖修飾比較, (C) 機械的刺激負荷および未負荷細胞間の糖鎖修飾比較, (D) 機械的刺激負荷および未負荷細胞由来分泌膜小胞間の糖鎖修飾比較

(2) 機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞の RAW264.7 細胞への取り込み

機械的刺激を負荷した骨細胞から調製した膜小胞 (MsOc-MVs) による前駆破骨細胞の成熟分化機構を検討するために, MsOc-MVs を Paul Karl Horan 67 (PKH67) 試薬にて蛍光染色し, 受容した前駆破骨細胞が破骨細胞に分化誘導されるのか検討した. しかし, PKH67 で染色した MsOc-MVs の破骨細胞への取り込みは一部の細胞に限られ, MsOc-MVs 自身も凝集をしている様子が観察され, 前駆破骨細胞への取り込みに不具合を与えている可能性が考えられた. すでに, PKH26 による蛍光染色がエクソソームの膨張を引き起こし, 生体内におけるエクソソームの分布と細胞への取り込み率を変化させる可能性があること示唆されていることから, PKH67 蛍光染色においてもその影響が強いと考え, 蛍光試薬を SciForiem FI7510 (東洋インキ株式会社) に切り換え, 再度前駆破骨細胞への MsOc-MVs の取り込み試験を行った. その結果, MsOc-MVs は全ての前駆破骨細胞への取り込みが均一に行われている様子を再現よく確認することができた (図 3). この結果から, MsOc-MVs が誘導する破骨細胞の分化には, 前駆破骨細胞へ取り込まれることが必要条件であり, 受容する前駆破骨細胞が分化に対する十分条件を握っているものと推察された.

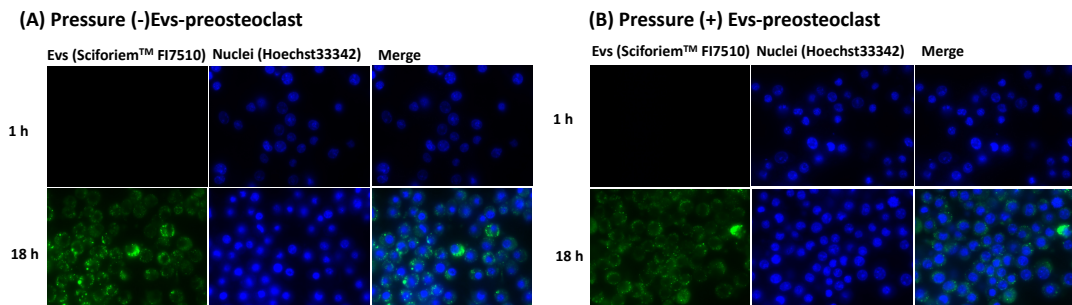


図 3. 機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞の RAW264.7 細胞への取り込み

(A) 機械的刺激未負荷細胞由来分泌膜小胞の RAW264.7 細胞への取り込み, (B) メカカルストレス負荷細胞由来分泌膜小胞の RAW264.7 細胞への取り込み

(3) シングルセル解析を用いた機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞による培養系前駆破骨細胞における細胞集団解析

MsOc-MVs 刺激 5 日後の前駆破骨細胞を回収し, 6,000 個の細胞を単離後, シングルセル RNA-seq 解析によりひとつひとつの細胞の全遺伝子情報を取得した. データクリーニングを行い, batch effect および細胞周期の影響を補正した. PCA による次元削減を行なった後, 細胞をクラスタリングし, UMAP によって二次元に可視化した. その結果, 合計 13 種の細胞集団が存在し

ており、破骨細胞様細胞集団 1 つ、成熟した破骨細胞の集団 2 つのほか、様々な段階の破骨細胞前駆細胞や、破骨細胞への分化能を持たない集団など、多様な細胞種が混在していることがわかった (図 4A)。

次に全てのクラスタの発現変動遺伝子の中で avg_log2FC が大きいものから 10 遺伝子ずつを選択し、縦軸に選択した遺伝子、横軸に個々の細胞をとってヒートマップを作成した。また、当該クラスタの細胞と、当該クラスタ以外の全ての細胞の遺伝子発現量を比較して、発現変動遺伝子を抽出した (図 4B~4D に遺伝子毎の発現分布と発現量を二次元分布図とバイオリンプロットによりクラスタごとに表示した)。その結果、破骨細胞様細胞集団や成熟した破骨細胞の集団では、破骨細胞の成熟化に関わる転写因子 nuclear factor of activated T cell c1 (Nfatc1) や巨核化のための細胞融合に関わる dendritic cell specific transmembrane protein (Dc-stamp), ADAM metalloproteinase domain 8 (ADAM8), 溶骨に関わる Acid phosphatase 5 (ACP5) の発現量が統計学的有意な高値を示した。

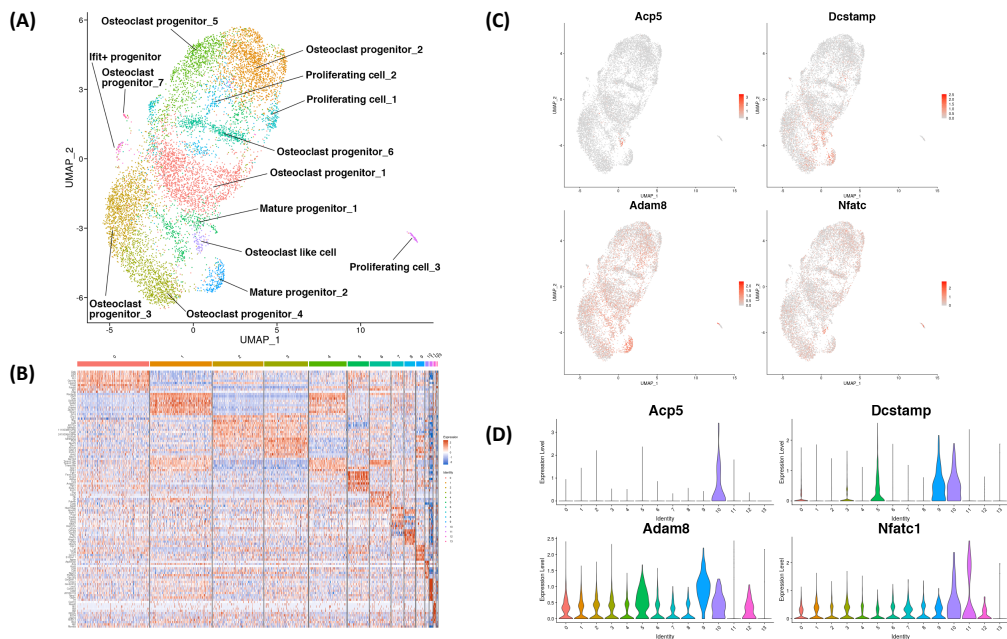


図 4. シングルセル解析を用いた機械的刺激負荷 MLO-Y4 細胞分泌膜小胞による培養系前駆破骨細胞における細胞集団解析

(A) 全細胞のクラスタリング結果 細胞をクラスタ毎に色分けし、二次元表示した。(B) 遺伝子発現ヒートマップ 各クラスタの発現変動遺伝子を縦軸、細胞をクラスタ毎にまとめて横軸にとり、遺伝子発現量をカラー表示した。発現量の多い遺伝子を赤、少ない遺伝子を青、中間を白で示した。(C) 遺伝子発現分布、各遺伝子の発現分布を細胞ごとに二次元に表示した。凡例のスケールの $\log(\text{正規化した発現量} + 1)$ を示す。(D) 各遺伝子のバイオリンプロット。縦軸は $\log(\text{正規化した発現量} + 1)$ 、横軸の各クラスタ、バイオリンプットの幅は密度分布 (プロットされた細胞数に相当) を示す。

(総括)

本研究課題から、機械的刺激を負荷した骨細胞から分泌される膜小胞には破骨細胞の分化誘導能を有することが示唆された。その機構については、機械的刺激受容により内包されるタンパク質が関与している可能性が考えられ、現在その同定を進めている。この膜小胞に含まれる破骨細胞の分化を誘導する想定タンパク質の N 型糖鎖が破骨細胞の分化誘導に関わる既報もあり、本研究課題のレクチンチップアレイ解析において α -2, 6-シアル酸修飾された N 型糖鎖の量が増加する結果は、想定しているタンパク質の関与を一層強くさせた。

また、骨細胞から分泌される膜小胞がほとんどの前駆破骨細胞に取り込まれ、その一部が破骨細胞へと変化していく様子を蛍光顕微鏡観察およびシングルセル解析から明らかにすることができた。破骨細胞へと分化するためには膜小胞の内包物の変化とともにそれを受容する細胞の表現系も深く関与し、この二条件が整わないと分化誘導しないことが推察された。本研究課題にて機械的刺激受容骨細胞由来膜小胞処理による破骨細胞様細胞の細胞集団を特定できたことから、今後さらに膜小胞処理後の細胞を経時的に回収し、多様な分化状態の細胞を各細胞集団に分類後、分化経路推定遺伝子情報の類似度に基づいて推定された擬似的な時間 (pseudotime) 軸に沿って細胞の系譜を推定することで、膜小胞により分化する細胞の経路と特徴から分化機構を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤 智広, 赤尾 幸博, 伊藤 裕子 |
| 2. 発表標題 The extracellular vesicles that are released from mechanical stress-loaded osteocyte induces osteoclastogenesis. |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤智広, 脇田絵里, 伊藤裕子, 赤尾幸博 |
| 2. 発表標題 Effect of extracellular vesicles secreted by an indigenous skin bacterium, <i>Streptococcus thermophilus</i> , on ceramide synthesis in human epidermal cells. |
| 3. 学会等名 日本細胞外小胞学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 古市 圭, 伊藤 智広 |
| 2. 発表標題 MicroRNA-122b-3p regulates α -MSH-stimulated melanogenesis by targeting tyrosinase in murine B16-4A5 cells. |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤 智広, 出川 朋美, 赤尾 幸博, 伊藤 裕子, 奥村 暢章 |
| 2. 発表標題 Extracellular membrane vesicles isolated from royal jelly-treated mesenchymal stem cells promote fibroblast proliferation, migration, and collagen production. |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 伊藤 智広, 脇田 絵理, 伊藤 裕子, 赤尾幸博, |
| 2. 発表標題 皮膚常在菌Streptococcus thermophilusが分泌する細胞外小胞の 表皮細胞におけるセラミド合成への影響 |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤 智広, 世古 夏実, 伊藤 裕子, 赤尾 幸博 |
| 2. 発表標題 ヒロメ(Undaria undarioides)から調製したエクソソーム様微小胞の免疫賦活能 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 三重大学 大学院生物資源学研究科 水圏材料分子化学教育研究分野ホームページ http://www.bio.mie-u.ac.jp/seimei/marine/mcam |
|--|

| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|