

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19289

研究課題名（和文）遺伝子バーコーディングによる多核破骨細胞の細胞系譜技術の開発

研究課題名（英文）DNA barcoding technology for tracking cell lineage of multinucleated osteoclasts

研究代表者

箭原 康人（Yahara, Yasuhiro）

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：60456390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：破骨細胞は、前駆細胞が融合することで形成される多核細胞である。本研究では、遺伝子プロファイルが異なる破骨前駆細胞が融合する過程を追跡する基盤技術を創出することを目的とした。起源が異なる破骨細胞を独立した3種類の蛍光蛋白によって標識するマウスを樹立し、ISH法を用いて蛍光蛋白をコードするRNAを検出することで、破骨細胞毎の起源を同定した。さらに、分子バーコード、gRNA、Cas9を破骨細胞特異的に発現するマウスを樹立し、バーコードに刻まれた傷をもとに細胞系譜を解析するマウスを樹立した。一つの破骨細胞を構成する前駆細胞の多様性や細胞融合の規則性を解析する新技術の創出に貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、一つの成熟破骨細胞を構成する前駆細胞の多様性や細胞融合の規則性を網羅的に解析する新技術の創出に貢献した。新たに樹立した多系統破骨細胞の系譜解析マウスは、従来の解析法では観察が困難であった細胞同士の融合現象やその生理的意義に関する洞察を深め、多核細胞形成ダイナミクスと、その多様性構築メカニズムの解明を可能にする画期的な手法を提供した。この新手法は、破骨細胞の病的活性化や機能不全における細胞融合メカニズムの解明に向けた研究成果に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Osteoclasts are multinucleated cells that form through the fusion of precursor cells. This study aimed to develop foundational technology to track the fusion process of osteoclast precursors with distinct genetic profiles. Mice were engineered to express three different fluorescent proteins, labeling osteoclasts from varied origins. Using in situ hybridization (ISH), we detected the RNA molecules of these fluorescent proteins, thereby identifying the origins of the osteoclasts. Moreover, we established mice that specifically express molecular barcodes, guide RNA (gRNA), and Cas9 protein in osteoclasts. This allowed for the analysis of cell lineage based on the genetic barcodes embedded in these precursors. This research introduces a novel technology for analyzing the diversity of precursor cells contributing to a single mature osteoclast and the regularity of their fusion.

研究分野：骨代謝学

キーワード：破骨細胞 細胞融合 系譜解析 胎児卵黄嚢 造血幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は単球・マクロファージ系の前駆細胞が細胞融合を繰り返すことで形成される多核巨細胞である。4~20個の核を持つ破骨細胞は、古い骨を吸収することで骨の新陳代謝を促し、骨の恒常性維持において重要な役割を果たす。申請者は、マクロファージおよび破骨細胞の起源細胞の同定、分化制御機構の解明を目指した基礎研究を推し進めるなかで、破骨前駆細胞には、造血幹細胞 Hematopoietic stem cell (HSC)と胎児卵黄嚢 Erythromyeloid progenitor (EMP)を起源とする2種類の細胞集団が存在することを世界に先駆けて発見した (Yahara et al. Nat Cell Biol. 2020)。その後の研究成果から両者の破骨前駆細胞は独立した遺伝子プロファイルを持つが、互いに細胞融合を繰り返しながら、骨組織の再構築を駆動することが明らかになった。しかし、起源や遺伝子プロファイルが全く異なる前駆細胞が融合を繰り返し、成熟破骨細胞を形成する過程やその機序は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子プロファイルの異なる破骨前駆細胞が分化・融合する過程を詳細に観察・追跡する基盤技術を創出する。性質の異なる複数の前駆細胞が融合を繰り返しながら、1つの破骨細胞を形成する過程を詳細に追跡することで、多核細胞形成ダイナミクスの基本原理の解明に挑戦する。

3. 研究の方法

まず、胎児卵黄嚢、胎児肝臓、骨髄造血幹細胞を起源とする3種類の破骨前駆細胞を区別する遺伝子発現マーカーを同定した。その発現マーカーと3種類の組み換え酵素 (Cre, Dre, phiC310) を利用して、起源が異なる破骨細胞を独立した3種類の蛍光蛋白 (Venus, mCherry, mCerulean) によって標識するマウスを樹立した。起源が異なる破骨細胞が融合することにより、複雑な蛍光輝度を示す破骨細胞が誕生し、その融合現象を明らかにした。さらに、それぞれの蛍光蛋白の遺伝子配列を認識可能な RNA プローブを作成し、In situ hybridization (ISH) 法を用いて Venus および mCherry の RNA 分子を検出することで、一つの破骨細胞毎の起源を同定することを試みた。さらに、細胞を区別する分子バーコード配列、gRNA、Cas9 蛋白を破骨前駆細胞特異的に発現するマウスを樹立した。細胞融合によって遺伝子バーコードに変異を導入することを試みた。この変異は娘細胞へと伝達されるため、破骨前駆細胞の遺伝子バーコードに刻まれた傷をもとに細胞系譜を解析することが可能となる。

4. 研究成果

(1) 胎児卵黄嚢、胎児肝臓、骨髄造血幹細胞由来破骨前駆細胞の同定

胎生7日 (E7) に卵黄嚢に生じた EMPs は、E8.5 から 9.5 にかけて CX3C chemokine receptor 1 (Cx3cr1) 陽性の卵黄嚢マクロファージへ分化する。その一方で、血管近傍で発生した HSCs は E12.5 に胎児肝臓に移行し、二次造血を開始する。両者の遺伝子発現プロファイルを明らかにするため、scRNA-seq 解析を行った。その結果、EMPs 由来および HSCs 由来破骨前駆細胞において特徴的に発現する遺伝子 X および Y を同定することに成功した。また他のグループの報告から、胎児造血には由来せず、骨髄造血からのみ発生する顆粒球-単球前駆細胞 (GMPs) 特異的マーカーとして Ms4a3 が同定された (Liu et al., Cell. 2019)。

(2) 胎児卵黄嚢、胎児肝臓、骨髄造血幹細胞由来破骨前駆細胞を独立して系統追跡可能なマウスの樹立

胎児卵黄嚢由来破骨前駆細胞のマーカーとして遺伝子 X を、胎児肝臓由来破骨前駆細胞マーカーとして遺伝子 Y を、造血幹細胞由来破骨前駆細胞マーカーとして Ms4a3 を使用する。その発現マーカーと3種類の組み換え酵素 (Cre, Dre, phiC310) を組み合わせることで、3系統の破骨前駆細胞を独立して追跡可能なマウスラインの樹立を試みた。遺伝子 X の制御下に Cre を発現するマウスを米



遺伝子Y-Dre キメラ Ms4a3-phiC310 キメラ

図1. 多系統破骨細胞系譜解析のためのマウス作製

国ジャクソンラボから入手した。また遺伝子 Y の ATG 直下に Dre をノックインした ES 細胞、さらに Ms4a3 の終始コドンの直下に phiC310 をノックインした ES 細胞をそれぞれ樹立した (図1)。この ES 細胞を用いて、遺伝子 Y-Dre キメラマウス、Ms4a3-phiC310 キメラマウスを樹立した。前述キメラマウスと野生型マウスを交配することで、遺伝子 Y-Dre マウスおよび Ms4a3-phiC310

ノックインマウスを樹立した。

さらに3種類の組み換え酵素(Cre, Dre, phiC31o)によって3種類の蛍光蛋白(Venus, mCherry, mCerulean)の発現をコントロールできるレポーターマウス(Rosa26-Venus-mCherry-mCerulean)を理研BRCより入手した(Serizawa et al., Development 2019.)。現在、このレポーターマウスを前述のマウスと交配することで、遺伝子X-Cre; 遺伝子Y-Dre; Ms4a3-phiC31o; Rosa26-Venus-mCherry-mCeruleanの樹立を進めている。このマウスでは、卵黄嚢造血由来破骨前駆細胞でVenusが、胎児肝臓由来破骨前駆細胞でmCherryが、骨髄造血幹細胞由来破骨前駆細胞においてmCeruleanが発現することが想定される。現在、遺伝子X-Cre; 遺伝子Y-Dre; Rosa26-Venus-mCherryマウスの樹立が完了しており、その表現型解析を進めている。このマウスの解析結果から、胎児卵黄嚢造血由来細胞(Venus+)と、胎児肝臓由来破骨前駆細胞(mCherry+)は、互いに細胞融合することで、成熟破骨細胞に分化することを証明した。

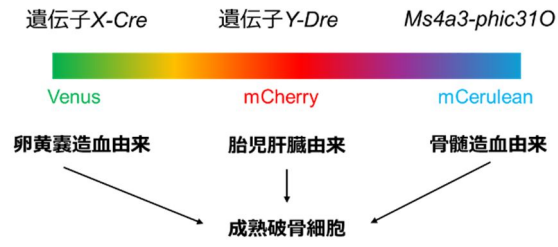
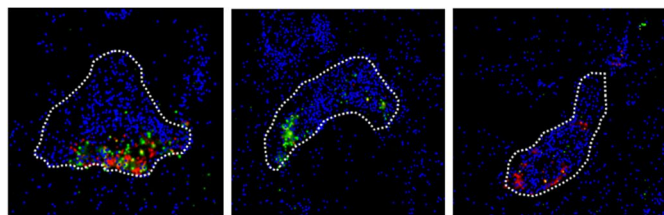


図2. 多系統破骨細胞を追跡可能なマウスの樹立

(3) 空間トランスクリプトーム解析による破骨細胞起源の同定

次の実験では、骨発生過程の破骨細胞が、どちらの前駆細胞に起源するのかを詳細に解析するため、空間トランスクリプトーム解析を実施した。単一分子FISH (smFISH)の機能を応用し、連続的なイメージングとバーコーディングを用いて、ミクロン以下の解像度でRNAを検出するMerscopeを使用した。破骨細胞関連遺伝子(150遺伝子)に加えてVenus, mCherry遺伝子の発現を読み取ることに挑戦した。VenusおよびmCherry配列を起源を読み解くためのバーコードととらえ、その描出を行った。その結果、発生中の骨の中に、VenusとmCherryのmRNAを共発現する破骨細胞を確認し、両者の融合現象を証明した。さらに、破骨細胞遺伝子の起源による発現の違いを同時に解析した。



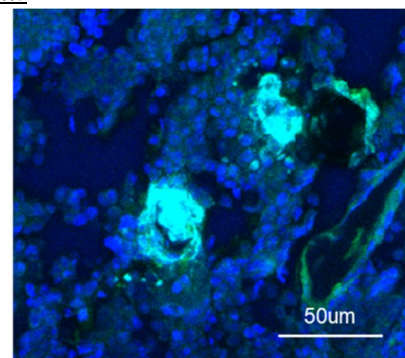
Venus mRNA (胎児卵黄嚢由来) / mCherry mRNA (胎児肝臓由来)
点線: 多核破骨細胞

図3. 空間トランスクリプトーム解析による破骨細胞リニエージの追跡

(4) Barcode sequencingによる多核融合細胞の細胞系譜技術

破骨前駆細胞は、細胞融合を繰り返しながら多核の破骨細胞に成熟する。しかし、融合細胞がどのような細胞系譜をたどって完成するのか?この謎を解明するため、barcode sequencingによる多核融合細胞の細胞系譜技術の構築を試みた。

この目的を達成するため、まずU6 RNA polymerase III promoter (pU6)の下流に10組のガイドRNAとその標的となる分子barcodeを有するマウス(CARLIN)、Rosa26遺伝子座にLoxP-Stop-LoxPカセットとCas9-EGFPがノックインされたRosa26-Cas9-EGFPマウスを米国Jackson Labより入手した。これらのマウスを破骨細胞特異的にCreを発現するマウス(Ctsk-Cre)と交配することで、Ctsk-Cre; Rosa26-LSL-Cas9-EGFP; CARLINマウスを樹立した(図4)。このマウスでは破骨細胞においてCas9-EGFPとガイドRNAが発現し、遺伝子barcodeに変異が形成される。この変異は、娘細胞へと伝達されていくことから、破骨細胞の遺伝子barcodeに刻まれた傷をもとに細胞系譜を解析することが可能となる。現在、マウスの樹立が完了しており、その解析を進めている。



CtskCre; R26-Cas9-GFP; CARLIN
図4. DNAバーコードを用いた破骨細胞追跡

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yahara Yasuhito, Nguyen Tuyet, Ishikawa Koji, Kamei Katsuhiko, Alman Benjamin A.	4. 巻 149
2. 論文標題 The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	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） 10.1242/dev.199908	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 箭原康人、石井優
2. 発表標題 “胎児造血の波”を維持する原始破骨細胞は、細胞融合によって多様性を獲得する
3. 学会等名 第8回日本骨免疫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 箭原康人、石井優
2. 発表標題 胎児造血から骨髄造血へ 絶え間ない"造血の波"を維持する破骨細胞の同定
3. 学会等名 第41回骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 箭原 康人、宮田 佐崇、石井 優
2. 発表標題 細胞融合を介した破骨細胞の多様性構築メカニズムの解明
3. 学会等名 第44回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 箭原康人、石井優、川口善治
2. 発表標題 「胎児造血の波」を維持する新規破骨細胞サブセットの同定
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 箭原康人
2. 発表標題 骨髓造血幹細胞および胎児卵黄嚢由来破骨細胞による骨恒常性維持メカニズムの解明
3. 学会等名 日本骨代謝学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 箭原康人
2. 発表標題 骨髓腔はどのようにしてできるのか？ 破骨細胞の起源多様性から紐解く長幹骨発生のダイナミクス
3. 学会等名 学術変革領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 箭原康人
2. 発表標題 細胞融合と骨吸収 破骨細胞の多様性構築と骨髓腔発生メカニズムの統合的理解
3. 学会等名 第58回日本臨床分子医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------