

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：24390412
研究課題名(和文)骨細胞による骨ミネラル化の制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of mineralization by osteocyte

研究代表者

中島 友紀(Nakahsima, Tomoki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：00346959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨を構成する細胞の約90%を占める骨細胞は、骨表面の破骨細胞と骨芽細胞を制御し骨の恒常性を司っている。そして、骨に埋め込まれ存在する骨細胞それ自身が、骨溶解に関与しミネラル代謝を司っている可能性もまた、以前から提唱されている。しかし、骨細胞の細胞特性はいまだ不明な点が多いのが現状である。本研究では、骨リモデリングとミネラル代謝を解明するため、骨細胞に焦点をあてる。申請者が世界に先駆け確立した骨細胞単離培養系を活用した骨細胞のゲノムワイドな遺伝子発現解析や新規骨細胞分化系の構築によるプロテオーム解析、骨疾患モデルマウスや遺伝子改変マウス作成から、骨細胞の細胞特性の理解を試みた。

研究成果の概要(英文)：Bone is constantly renewed by the balanced action of osteoblastic bone formation and osteoclastic bone resorption both of which mainly occur at the bone surface. This restructuring process called "bone remodeling" is important not only for normal bone mass and strength, but also for mineral homeostasis. Osteocytes, the most numerous and least well studied bone cells, are stellate-shaped cells enclosed within the bone lacuno-canalicular network of bone. Based on the osteocyte location within the bone matrix and the cellular morphology, it is proposed that osteocytes potentially contribute to the regulation of bone remodeling in response to mechanical and endocrine stimuli. To identify the regulation factor of bone remodeling and mineralization, we performed a genome-wide screening of osteocytes, and in vivo analysis of bone disease model and gene targeting mice.

研究分野：骨生物学

キーワード：骨代謝学 骨細胞 ミネラル化

1. 研究開始当初の背景

生体支持の基軸である骨組織は、生涯を通じて生れ変わっている。骨リモデリングは、健全な骨組織の維持のみならず、生命維持に必須なカルシウムやリンなどのミネラル代謝を巧妙に制御していると考えられている。これまで骨リモデリングは、骨表面上に存在する破骨細胞と骨芽細胞が中心に制御されると考えられてきた。実際、破骨細胞による骨破壊により古い骨が除去され、骨芽細胞により骨新生が起こることが重要であるが、その制御機構はいまだ明確とは言い難い。

骨組織には、骨表面上に破骨細胞と骨芽細胞、骨の中には骨細胞が観察され、骨構成細胞の約90%が骨細胞である。骨細胞は骨基質に埋め込まれ細胞突起をめぐらせることでネットワークを構成している。この神経細胞様のネットワークは骨内の骨細胞の間だけ無く、骨表面の破骨細胞や骨芽細胞とも密接に連結しており、骨細胞が細胞間の情報伝達に関わり骨の恒常性を制御する指令細胞であることが推測されている(*N Eng J Med*. 2006)。

また、妊娠や授乳期に生体は大量のカルシウムなどのミネラルを必要とするが、その供給がどの様に行われているかはいまだ不明である。破骨細胞が骨を破壊しミネラルを生体に供給すると考えることは想像に容易い。しかし、破骨細胞の骨の吸収面だけでは必要とされるカルシウムの補給に不十分であることも提唱されている。実際、妊娠や授乳期に骨細胞周辺の骨溶解が進行することが見出されている。この骨細胞による骨溶解は、妊娠や授乳期だけではなく、閉経など性ホルモン欠失状態や無重力環境、さらには冬眠する生物でも観察されており、骨細胞が骨のミネラルリゼーションを直接制御していることを強く示唆されている(*J Bone Mine Res*. 2011)。さらに骨細胞が産生する線維芽細胞増殖因子 FGF23 が、腎臓に作用し生体ミネラルの吸収を調節する骨産生ホルモンであり骨軟化症の病因遺伝子であることも示唆されている(*Nature*. 2006)。

骨表面上の破骨細胞や骨芽細胞は、1990年代から細胞培養系の確立、マウスジェネティクスを駆使した解析により、その分化機構や機能解析が進み、骨生物学に多くの情報を齎している。しかしながら、骨という特殊な硬組織に埋め込まれている骨細胞は、単離することが難しく、これまでその細胞特性は、組織学・病理学的な所見から推測されてきた。

最近、申請者は、骨細胞だけで蛍光を発する遺伝子改変マウスを樹立し世界に先駆け、骨細胞の高純度単離培養系を確立した。そして、単離骨細胞が破骨細胞分化因子 RANKL を強力に発現し破骨細胞を誘導することを細胞および生体レベルで実証し、骨の再構築のサイクルが骨細胞によって制御されていることを明らかにした(*Nakashima et al, Nat Med*. 2011)。この報告により、骨細胞研究が

一躍活性化されることが世界レベルで期待されている。しかし、骨細胞による骨リモデリングの制御および骨ミネラルリゼーションの制御機構の全体像はいまだ不明である。

2. 研究の目的

骨を構成する細胞の約90%を占める骨細胞は、骨表面の破骨細胞と骨芽細胞を制御し骨の恒常性を司っている。そして、骨に埋め込まれ存在する骨細胞それ自身が、骨溶解に関与しミネラル代謝を司っている可能性もまた、以前から提唱されている。しかし、骨細胞の細胞特性はいまだ不明な点が多いのが現状である。本研究では、骨リモデリングとミネラル代謝を解明するため、骨細胞に焦点をあてる。申請者が世界に先駆け確立した骨細胞単離培養系を活用した骨細胞のゲノムワイドな遺伝子発現解析や新規骨細胞分化系の構築によるプロテオーム解析、骨疾患モデルマウスや遺伝子改変マウス作成から、骨リモデリングとミネラルリゼーションの制御因子の同定とその機能を解明し、骨細胞の細胞特性を統合的に理解することを目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、骨リモデリングとミネラルリゼーションを制御する分子を同定するために、様々な骨量低下モデルマウスやメカニカルストレスモデルから高純度な骨細胞の単離を実施し、世界に先駆け、骨細胞の網羅的な遺伝子発現解析を実施しバイオインフォマティクスを活用したデータベースを構築する。また、骨細胞の発現遺伝子の機能を明らかにするため、骨細胞分化およびミネラルリゼーションのスクリーニング系の構築を試みる。さらに骨細胞特異的な遺伝子改変マウスを作成し、個体レベルでの制御因子の意義を明らかにする。

4. 研究成果

4-1) 本研究で使用した筋肉組織特異的欠損するマウス(cKO)は、興味深いことに、若年齢では筋委縮が現れず、成獣にまでは正常に成長し、加齢に伴い筋肉量が野生型マウスと比べ急激に減少する。

そのため、力学的負荷の変化を生体レベルで観察できる生体モニタリングのモデルとしての有効性を検証した。

本モデルは、人間の加齢に伴う

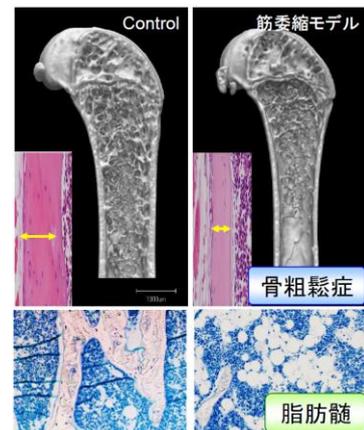


図1: 筋委縮に伴う骨量減少と脂肪髄増加

骨量減少と脂肪髄増加の病態に酷似しており、有用な実験モデルであると考えられた(未発表データ：図1)。

本モデルマウスを用い急激な筋肉の減少が始まる前から完全に筋萎縮が終了するまでの過程で、得られる骨組織から骨形態計測・病理解析を実施し、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞の数、骨形成および骨破壊量等を解析することで生体における力学的負荷の変化に伴う骨リモデリングの責任細胞ならびにその機能変化を検討することが可能となった(未発表データ：図2)。

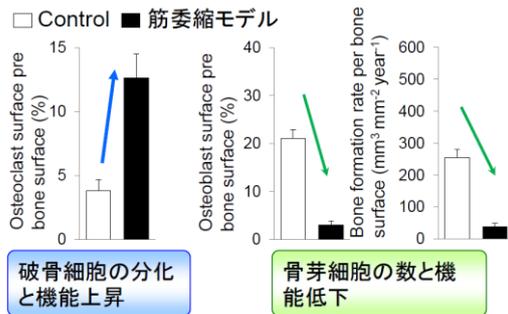


図2：筋萎縮に伴う骨形態計測

また、力学的負荷の変化に伴う各ステージ別の細胞から、mRNA を採取し発現遺伝子のスクリーニングに繋ぐことが可能となった。

さらに、自発的なレジスタンストレーニングを評価するメカニカルストレス負荷システムとして、マウス専用のクライミング運動負荷システムを構築した(未発表データ：図3)。本モデルでは、長期のマウス飼育・観察が可能であり、骨における経時的なメカニカルストレス応答性分子の解析を可能とする。

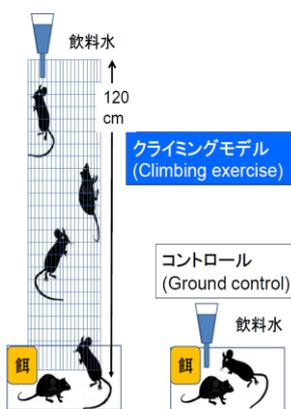


図3：自発的なレジスタンストレーニングシステム

4-2) 骨細胞の単離培養系を活用し、骨細胞と骨芽細胞の増殖能とミネラル化能を検討したところ、骨細胞は増殖能力が低いにも関わらず、高度なミネラル化能を持っていることが見出された(未発表データ：図4)。すなわち、骨細胞と骨芽細胞の遺伝子発現を比較検証することで、ミネラル化を司る分子の同定が期待さ

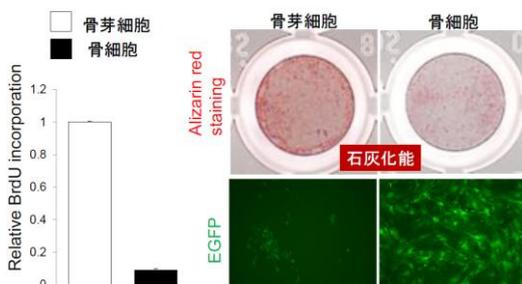


図4：単離骨芽細胞と骨細胞の増殖能と石灰化能

れた。

高純度な骨細胞と骨芽細胞の網羅的なトランスクリプトーム解析を実施し骨芽細胞と骨細胞の全遺伝子発現プロファイリングを完成させた(未発表データ：図5)。

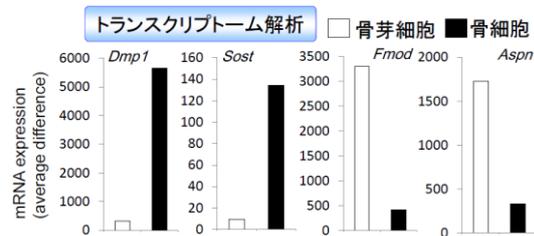


図5：骨細胞の全遺伝子発現プロファイリングの確立

さらに、世界に先駆け骨芽細胞から骨細胞への分化実験系を確立することに成功した。この新規骨細胞分化系の構築は、骨芽細胞から骨細胞への分化をビジュアル化・定量化することで、様々な分子や薬剤スクリーニングを可能とした点において、大きな意味を持つ。さらに、これまで不可能であった網羅的なプロテオーム解析に着手することを可能とした(未発表データ：図6)。

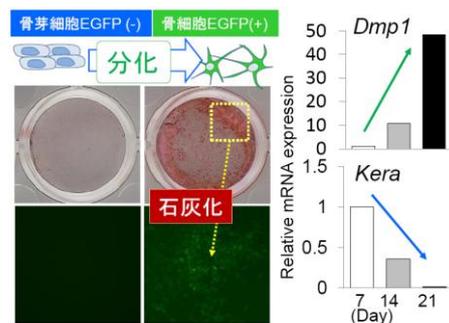


図6：新規骨細胞分化系の確立

本研究から骨細胞の全遺伝子・タンパク質発現のプラットフォームが完成し細胞特性解明に大きな足掛かりとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 47 件)

- 1) Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G, Nakashima T, Takayanagi H. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis* in press, (2015) (査読有)
- 2) Nakamura H, Nakashima T, Hayashi M, Izawa N, Yasui T, Aburatani H, Tanaka S, Takayanagi H. Global epigenomic analysis indicates protocadherin-7 activates osteoclastogenesis by promoting cell-cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 455, 305-11 (2014) (査読有)
- 3) Okura H, Sato S, Kishikawa S, Kaneto S, Nakashima T, Yoshida N, Takayanagi H, Kiyono H. Runx2-I Isoform Contributes to Fetal Bone Formation Even in the Absence of

- Specific N-Terminal Amino Acids. *PLoS One* 9, e108294 (2014) (査読有)
- 4) Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into T_H17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 20, 62-68 (2014) (査読有)
 - 5) O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone* 54(2), 258-263 (2013) (査読有)
 - 6) Miyazaki T, Iwasawa M, Nakashima T, Mori S, Shigemoto K, Nakamura H, Katagiri H, Takayanagi H, Tanaka S. Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption. *J Biol Chem* 287, 37808-23 (2012) (査読有)
 - 7) Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi N, Kumanogo A, Takayanagi H. Osteoprotection by semaphorin3A. *Nature* 485, 69-74 (2012) (査読有)
 - 8) Nakashima T, Mikihiro Hayashi, Takayanagi H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 23, 582-590 (2012) (査読有)
 - 9) 中島友紀：破骨細胞研究と骨免疫学 *日本臨床免疫学会会誌* 38 (1)17-25 (2015)
 - 10) 中島友紀：骨細胞による骨リモデリングの制御 *CLINICAL CALCIUM* 25 (1) 21-28 (2015) (査読無)
 - 11) 中島友紀：破骨細胞研究からみた骨破壊治療の新展開 *リウマチ科* 52 (6) 655-662 (2014) (査読無)
 - 12) 中島友紀：骨細胞による骨代謝調整 *Bio Clinica* 30 (1) 28-32 (2015) (査読無)
 - 13) 中島友紀：骨と筋肉との相互連関 *Medical Practice* 31 (12) 1945-1948 (2014) (査読無)
 - 14) 中島友紀：骨細胞による骨リモデリングの制御 *Current Therapy* 32 (10) 1015-1020 (2014) (査読無)
 - 15) 中島友紀：骨転移とRANKL *CLINICAL CALCIUM* 24 (8) 1201-1208 (2014) (査読無)
 - 16) 中島友紀：骨細胞-骨代謝の司令塔 *腎と骨代謝* 27(3) 191-197 (2014) (査読無)
 - 17) 中島友紀：骨構成細胞のカップリングとコミュニケーション *CLINICAL CALCIUM* 24 (6) 853-861 (2014) (査読無)
 - 18) 中島友紀：RANKLの多彩な作用 *実験医学 (増刊)* 32 (7) 43-52 (2014) (査読無)
 - 19) 中島友紀：巻頭言：骨と幹細胞研究の最前線 *CLINICAL CALCIUM* 24 (4) 11 (2014) 特集ゲスト編集 (査読無)
 - 20) 林幹人、中島友紀：造血系細胞から分化する破骨細胞分化制御 *CLINICAL CALCIUM* 24 (4) 487-500 (2014) (査読無)
 - 21) 中島友紀：骨細胞による骨制御 *腎と骨代謝* 27(2) 136-146 (2014) (査読無)
 - 22) 中島友紀：乳癌の骨転移病変とRANKL *腎と骨代謝* 27(1) 15-23 (2014) (査読無)
 - 23) 林幹人、中島友紀、高柳広：セマフォリンシグナルによる骨代謝調節 *THE BONE* 27(4) 379-383 (2013) (査読無)
 - 24) 中島友紀：ストレスと骨の細胞間コミュニケーション *CLINICAL CALCIUM* 23 (11) 1595-1603 (2013) (査読無)
 - 25) 中島友紀：Chapter3:骨転移の成立・進展のメカニズム1.乳癌細胞の進展のメカニズムとRANKL *癌と骨* 87-94 (2013) (査読無)
 - 26) 中島友紀：骨細胞による骨吸収制御 *THE BONE* 27(3) 49-57 (2013) (査読無)
 - 27) 中島友紀、林幹人、高柳広：骨細胞による骨恒常性の制御 *Medical Science Digest* 39 (8) 353-356 (2013) (査読無)
 - 28) 中島友紀、林幹人、高柳広：骨細胞による骨吸収調節機構 *日本臨床 増刊号* 71(2) 121-125 (2013) (査読無)
 - 29) 中島友紀、林幹人、高柳広：骨リモデリングの制御機構 *実験医学* 31 (6) 842-848 (2013) (査読無)
 - 30) 林幹人、中島友紀、高柳広：セマフォリンによる骨代謝 *内科* 111 (4) 711-715 (2013) (査読無)
 - 31) 中島友紀、林幹人：Semaphorin *骨粗鬆症治療* 12(1) 54-57 (2013) (査読無)
 - 32) 林幹人、中島友紀、高柳広：セマフォリンによる骨代謝 *実験医学* 31 (4) 510-514 (2013) (査読無)
 - 33) 中島友紀、林幹人、高柳広：骨疾患の治療標的としてのWnt シグナル *リウマチ科* 49 (3) 363-368 (2013) (査読無)
 - 34) 中島友紀：骨構成細胞による骨恒常性の制御 *CLINICAL CALCIUM* 23 (2) 218-228 (2013) (査読無)
 - 35) 中島友紀、高柳広：骨代謝における骨細胞の新たな役割 *Medical Practice* 29 (11) 1925-1928 (2012) (査読無)
 - 36) 林幹人、中島友紀、高柳広：セマフォリンによる骨代謝 *CLINICAL CALCIUM* 22 (11) 1693-1699 (2012) (査読無)
 - 37) 中島友紀：骨細胞による骨恒常性の制御 *リウマチ科* 48 (3) 352-361 (2012) (査読無)
 - 38) 林幹人、中島友紀、高柳広：Semaphorin シグナルによる骨代謝 *アンチ・エイジング医学* 8 (5) 704-709 (2012) (査読無)
 - 39) 中島友紀、高柳広：関節リウマチ骨破壊のメカニズム *Jpn J Rehabil Med* 49 (10) 683-689 (2012) (査読無)
 - 40) 中島友紀：骨細胞による骨リモデリング制御 *THE BONE* 26(3) 5-10 (2012) (査読無)
 - 41) 中島友紀、林幹人、高柳広：骨細胞と骨リモデリング *リウマチ科* 47 (5) 530-537 (2012) (査読無)
 - 42) 中島友紀、林幹人、高柳広：骨細胞によ

る破骨細胞形成の制御機構 *内分泌・糖尿病・代謝内科* 34 (5) 457-464 (2012) (査読無)

- 43) 林幹人、中島友紀、高柳広：骨リモデリングの制御機構 *細胞* 44 (7) 8-11 (2012) (査読無)
- 44) 中島友紀、林幹人、高柳広：骨細胞による骨吸収制御 *CLINICAL CALCIUM* 22 (5) 85-96 (2012) (査読無)
- 45) 中島友紀、高柳広：破骨細胞分化における正と負の転写制御 *炎症と免疫* 20 (3) 227-233 (2012) (査読無)
- 46) 中島友紀、高柳広：骨免疫学からみたRA治療の新展開 *最新医学* 62 (2) 203-211 (2012) (査読無)
- 47) 中島友紀、高柳広：骨を作りかえる指令細胞の発見 *整形外科* 63 (1) 50 (2012) (査読無)

[学会発表] (計 27 件)

- 1) 中島友紀 骨免疫学の開拓と治療への応用 *JBAバイオセミナー* 1月20日2015年 東京(招待講演)
- 2) 林幹人、中島友紀、高柳広 *Sema3A* による骨代謝制御 第87回日本生化学会大会 10月16日2014年 京都
- 3) 中島友紀 骨リモデリングの制御機構と創薬標的 第2回川越骨代謝セミナー 10月10日2014年 埼玉(招待講演)
- 4) Hayashi M, Nakashima T, Takayanagi H. Regulation of bone metabolism by Semaphorin 3A derived from osteoblastlineage cells. *ASBMR 2014 Annual Meeting* Sep.13 2014.
- 5) 中島友紀 *RANKL Biology* 第32回日本骨代謝学会日韓合同シンポジウム 7月26日2014年 大阪(招待講演)
- 6) 中島友紀 炎症と骨破壊 第32回日本骨代謝学会日本リウマチ学会合同シンポジウム 大阪 7月25日2014年 大阪(招待講演)
- 7) 中島友紀 骨と運動器の連環システム 第32回日本骨代謝学会 7月24日2014年 大阪(招待講演)
- 8) 中村春彦、中島友紀、林幹人、高柳広、田中栄 破骨細胞分化にともないヒストン修飾が活性型に変化する遺伝子群の解析 第1回日本骨免疫会議 7月5日2014年 沖縄
- 9) 寺島明日香、岡本一男、中島友紀、高柳広 骨細胞除去マウスの免疫細胞への影響 第1回日本骨免疫会議 7月4日2014年 沖縄
- 10) 小松紀子、岡本一男、澤新一郎、中島友紀、田中 栄、高柳広 *Foxp3* 陽性 T 細胞から分化した *Th17* 細胞の自己免疫性関節炎における重要性 第35回日本炎症・再生医学会 7月2日2014年 沖縄
- 11) 澤新一郎、永島一樹、中島友紀、高柳広 リンパ節形成における *RANKL* 発現細胞

の機能解析 第35回日本炎症・再生医学会 7月2日2014年 沖縄

- 12) 林幹人、中島友紀、高柳広 *Sema3A* による骨代謝制御 第35回日本炎症・再生医学会 7月2日2014 沖縄
- 13) 岡本一男、林幹人、中島友紀、高柳広 *EF-hand* タンパク質を介した破骨細胞分化と赤血球生成制御 第35回日本炎症・再生医学会 7月1日2014 沖縄
- 14) 中島友紀 骨細胞による骨吸収制御機構 第55回歯科基礎医学会サテライトシンポジウム 9月20日2013年 岡山(招待講演)
- 15) 中島友紀 *RANKL* と骨疾患 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会第2回 合同国際会議 (*IBMS-JSBMR 2013*) 5月30日2013年 神戸(招待講演)
- 16) Nakashima T Regulation of bone remodeling by osteocytes. 第22回国際リウマチシンポジウム/第57回日本リウマチ学会 April 19 2013 Kyoto(招待講演)
- 17) 中島友紀 *RANKL* と骨免疫学 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 10月26日2012年 名古屋(招待講演)
- 18) Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H Osteocyte-derived *RANKL* in bone remodeling. *American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting*. Sep 13 2012 Minneapolis USA
- 19) Nakashima T Osteoprotection by semaphoring 3A. 22nd Annual Scientific Meeting ANZBMS and Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting. Sep 3 2012 Australia (招待講演)
- 20) 中島友紀 骨細胞による破骨細胞分化の制御機構 第30回日本骨代謝学会 7月21日2012年 東京(招待講演)
- 21) 中島友紀 骨リモデリングの制御機構の解明 第30回日本骨代謝学会 7月20日2012年 東京(招待講演)
- 22) 中島友紀 骨リモデリングの制御機構の解明 第33回日本炎症・再生医学会 7月5日2012年 福岡(招待講演)
- 23) 中島友紀 骨リモデリングの制御機構の解明 第54回日本老年医学会学術集会 6月29日2012年 東京(招待講演)
- 24) 中島友紀 骨リモデリングの制御機構の解明 第12回日本抗加齢医学会総会 6月24日2012年 横浜(招待講演)
- 25) Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H Osteocyte-derived *RANKL* in bone metabolism. 4st International Conference on Osteoimmunology. Jun 20 2012 Greece
- 26) 中島友紀、高柳広 骨リモデリングの制御機構の解明 第66回日本口腔科学会学術集会 5月16日2012年 広島(招待講演)
- 27) 中島友紀、高柳広 *RANKL* と骨免疫学 第56回日本リウマチ学会 4月28日2012年 東京(招待講演)

〔図書〕(計 5 件)

- 1) Hayashi M, Nakashima T, Takayanagi H. Semaphorins in bone homeostasis. *Semaphorin* (Book; Springer New York, Editor Atsushi Kumanogoh) in press, (2015) (査読有)
- 2) Nakashima T, Takayanagi H. RANK and RANKL. *Encyclopedia of Signaling Molecules* (Book; Springer New York, Editor Sangdum Choi) 1581-1589 (2012) (査読有)
- 3) 中島友紀 : RANKL/RANK/OPG 骨ペプチド 124-125 (2015) (査読無)
- 4) 中島友紀 : ビタミンDと骨免疫学 ビタミンDと疾患 100-108 (2013) (査読無)
- 5) 中島友紀、高柳広 : 骨吸収作用ファーマナビゲーターPTH編 46-54 (2013) (査読無)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bonebiology.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 友紀 (NAKASHIMA Tomoki)
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 : 00346959

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし