

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462785

研究課題名(和文) Bone lining cellsを標的としたエピゲノム制御による骨再生への展開

研究課題名(英文) Development of bone regeneration strategies by controlling the epigenetic state of bone lining cells.

研究代表者

吉岡 広陽 (YOSHIOKA, HIROTAKA)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：50523411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、休止期骨芽細胞の再活性化を利用した新しい骨形成促進剤の創薬に貢献するため、骨関連細胞の運命決定の分子基盤を解明することを目的とする。骨特異的プロモーター制御下に蛍光タンパク質Venusを発現するレポーターマウスを使用し、シングルセルRNA-seqによりVenus陽性細胞1個あたりの遺伝子発現を網羅的に解析した。解析した全ての細胞で骨芽細胞マーカーの発現が認められ、一部の細胞は既知の休止期骨芽細胞に特徴的な発現様式を示した。また、脂肪細胞分化に関連する遺伝子発現が認められるなど、Venus陽性細胞が多様性に富むことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the molecular basis of cell fate decisions in the bone and to identify new bone formation-promoting factors that control reactivation of bone lining cells. Venus-positive cells were isolated from transgenic mice that express yellow fluorescence protein Venus under the control of bone specific promoter and subjected single-cell RNA-sequencing to comprehensively profile the mRNA populations. All cells expressed osteoblast markers, and some cells showed a characteristic gene expression patterns that observed in bone lining cells. In addition, some cells expressed the genes that crucial for adipocyte differentiation. Thus, Venus-positive cells appear to comprise a heterogeneous cell population that may underlie the diversity in transcriptional profiles.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨代謝 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)骨代謝研究の重要性とその意義

超高齢化社会を迎える我が国にとって「健康で元気なお年寄り」を増やし、ご活躍いただくためにも、QOL (quality of life) の向上に向けた、骨粗鬆症や歯周病といった骨関連疾患の予防・治療法の確立は急務である。第一世代の骨代謝改善薬として、破骨細胞を標的とした骨吸収阻害薬が開発されているが、骨吸収のみならず骨形成も抑制してしまう。第二世代は、骨芽細胞・骨細胞を標的とした骨形成を特異的に促進する薬剤であり、現在臨床試験中である。本研究では、第三世代の骨代謝改善薬として、Bone lining cells (休止期骨芽細胞) を標的とした骨形成促進薬を提案する。

### (2)Bone lining cells の分化とその機能

間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞は、骨基質を合成・分泌し、骨形成を担う。骨芽細胞の50-70%はアポトーシスにより死滅するが、一部は自ら形成した骨基質の中に埋め込まれて骨細胞となるほか、約10%程度は骨表面にとどまりBone lining cellsとなる。Bone lining cellsは、破骨細胞の働きにより出来た骨吸収窩を清掃し、骨形成の再開を促す働きがあると言われている。また、骨折などの力学的刺激により、活性型骨芽細胞へ再活性化する可能性が示唆されている。しかし、骨芽細胞からBone lining cellsへと分化する機構、またその逆に再活性化する機構、Bone lining cellsを規定する分子ネットワーク、など不明な点が多い。

### (3)エピジェネティクス制御について

個体発生や細胞の分化には、DNAのメチル化、ヒストンの翻訳後修飾といったエピジェネティックな制御機構が重要である。このエピジェネティクスによる遺伝子発現制御はダイナミックな可逆反応であり、食生活、生活環境などで変化する。逆に言えば、疾患と関連する異常なエピジェネティクスを、制御因子の直接的あるいは間接的な操作により、正常化(治癒)することが可能である。実際、DNAメチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化阻害剤が血液系腫瘍の治療薬としてすでに市場にでている。また、ヒストン脱アセチル化阻害剤が骨形成を促進するという報告もある。

## 2. 研究の目的

骨表面に並ぶBone lining cells (休止期骨芽細胞) は文字通り休止した骨芽細胞であると考えられていたが、近年、骨リモデリングの場の調整に働くことや、機械的刺激等により骨芽細胞へ再活性化する可能性が報告されている。本研究では、骨芽細胞がBone lining cellsへと分化する機構を明らかにするとともに、Bone lining cellsの性質を定める分子基盤を明らかにする。また、Bone lining cellsを活性型骨芽細胞へエピジェネティックにリプログラミングさせる分子基盤の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)Bone lining cells の可視化を目的としたレポーターマウスの樹立

骨芽細胞とBone lining cellsの細胞内小器官の発達の違いに着目する。

Col1a1-Cre マウスとR26R-Lyn-Venus マウスの交配により、I型コラーゲンプロモーター制御下で細胞膜に蛍光タンパク質 Venus を発現するレポーターマウスを樹立する。

さらに R26R-Golgi-mCherry マウスとの交配により、I型コラーゲンプロモーター制御下で細胞膜に Venus、ゴルジ体に mCherry を発現するレポーターマウスを樹立する。

### (2)Bone lining cells の骨組織分布と成長や加齢に伴う動態の解析

上記のレポーターマウスを材料に、骨芽細胞、Bone lining cells および骨細胞について成長や加齢に伴う組織学的分布ならびにゴルジ体の発達度合いを観察する。

3週齢、8週齢、6ヶ月齢のレポーターマウスの大腿骨および頭頂骨について、パラフィン切片を作製し、免疫組織化学染色により Venus および mCherry の局在を確認する。

### (3)レポーターマウス初代骨芽細胞培養系の樹立

レポーターマウス(新生仔)の頭蓋冠をコラーゲナーゼ/EDTAで連続的に消化し、頭蓋冠細胞(骨原生細胞)を回収する。

アスコルビン酸含有骨分化誘導培地にて培養し、アルカリフォスファターゼ(ALP)/von Kossa 染色により石灰化能を検討する。

培養細胞における Venus および mCherry の発光および局在を確認する。

### (4)フローサイトメトリー (FACS) を用いた Bone lining cells の存在比の解析

Col1a1-Cre マウスとR26R-Lyn-Venus マウスの交配により得られた新生仔の頭蓋冠をコラーゲナーゼ/EDTAで連続的に消化し、頭蓋冠細胞(骨原生細胞)を回収する。

頭蓋冠細胞(骨原生細胞)をER-trackerにて染色する。

FACSにより Venus 陽性細胞のうち、ER-tracker 陽性あるいは陰性の細胞の存在比を解析する。

### (5)シングルセル RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析

上記のように、レポーターマウスから頭蓋冠細胞(骨原生細胞)を回収する。

FACSにより単離した Venus 陽性細胞をC1システム(フリューダム社)にて1細胞ごとに単離し、RNA-seqライブラリーを作製する。次世代シーケンサーHiSeq2500(イルミナ社)により、ペアエンド100bpリード解析する。

TopHatを用いてリード配列を参照ゲノム配列(*Mus Musculus* GRCm38/mm10)にアラインメントする。また、遺伝子発現レベルの定

量には, Cufflinks を用いる。  
SINGuLAR 解析ツール (フリーダタイム社) を用いて, 階層的クラスター解析, 主成分分析を行い, 類似した発現プロファイルを示す遺伝子群を抽出する。さらに, その群間比較を行い, ヒートマップ, バイオリンプロットなどを作図する。

#### (6) 骨芽細胞の脂肪細胞への分化転換能の解析

上記のように, レポーターマウスから頭蓋冠細胞 (骨原生細胞) を回収する。  
FACS により Venus 陽性細胞のみを回収する。  
アスコルビン酸含有骨分化誘導培地にて培養し, PPAR $\gamma$  の合成リガンド (ロシグリタゾン) の負荷による脂肪細胞への分化転換能を観察する。  
その過程における RUNX2 および PPAR $\gamma$  の発現・局在を免疫染色により観察する。

#### 4. 研究成果

##### (1) Bone lining cells の可視化を目的としたレポーターマウスの樹立

Col1a1-Cre マウスと R26R-Lyn-Venus マウスを交配させ, I 型コラーゲンプロモーター制御下で細胞膜に蛍光タンパク質 Venus を発現するレポーターマウスを樹立した。  
さらに, R26R-Golgi-mCherry マウスとの交配により, I 型コラーゲンプロモーター制御下で細胞膜に Venus, ゴルジ体に mCherry を発現するレポーターマウスを樹立した。

##### (2) Bone lining cells の骨組織分布と成長や加齢に伴う動態の解析

よく発達したゴルジ体を持つ立方体の骨芽細胞は, 3 週齢では海綿骨, 皮質骨ともに, ほぼすべての骨表面に並んでいるが, 8 週齢では点在するようになり, 6 ヶ月齢ではごくわずかに存在するのみであった。  
比較的ゴルジ体に乏しく扁平な Bone lining cells は, 3 週齢, 8 週齢ともに骨外膜に点在する様子が観察されたが, 6 ヶ月齢ではごくわずかに存在するのみであった。  
骨細胞は, 3 週齢, 8 週齢では比較的大きく, よく発達したゴルジ体を持つが, 6 ヶ月齢では小さく扁平でゴルジ体に乏しい構造を示した。

##### (3) レポーターマウス初代骨芽細胞培養系の樹立

ALP/von Kossa により染色される石灰化ノジュールが多数形成された。また, Venus および mCherry 陽性を示す細胞がノジュールを構成することが確認された。  
予想外に Venus 陽性の脂肪細胞が認められたことから, 一部の骨芽細胞にコミットした細胞が脂肪細胞に分化転換する可能性が示唆された。

##### (4) FACS を用いた Bone lining cells の存在比の解析

Bone lining cells は Venus 陽性細胞の約 3% と少数であることが明らかとなった。  
組織学的解析を裏付ける結果であった。

##### (5) シングルセル RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析

計 96 個の Venus 陽性細胞を解析し, そのうち 90 個の細胞について信頼性の高い結果が得られた。  
全ての Venus 陽性細胞が Col1a1/2 や Ibsp などの骨芽細胞マーカーを発現し, Sost や Fgf23 などの骨細胞マーカーは発現していなかった。  
教師なしクラスター解析の結果, Venus 陽性細胞は大きく 2 つのクラスターで構成され, そのうちの 1 つは複数のサブクラスターにさらに分類された。

2 つのクラスターは骨芽細胞マーカー, 幹細胞マーカーなど, 計 145 の遺伝子発現に有意差を認めた。

Bone lining cells に特徴的な遺伝子発現 (Col1a1/2 および Bglap の低発現, CD54 の高発現) を示す細胞が 5 個確認された。  
脂肪細胞分化のマスター転写因子である Pparg を発現する細胞が 3 個確認された。

##### (6) 骨芽細胞の脂肪細胞への分化転換能の解析

FACS により Venus 陽性細胞を単離し, アスコルビン酸含有骨分化誘導培地で培養した。

24 時間培養後に免疫染色を行った結果, RUNX2 は 92% が陽性で, 全てが核に局在を認めた。このうち約 14% の細胞が PPAR $\gamma$  陽性で, いずれも細胞質に局在していた。また, 0.9% の細胞においては, RUNX2 と PPAR $\gamma$  が核内に共局在していた。

ロシグリタゾンを負荷すると, RUNX2 と PPAR $\gamma$  の局在が変化し, PPAR $\gamma$  核陽性 / RUNX2 陰性で, 大型の脂肪滴を蓄積した細胞が増加した。

脂肪滴を蓄積した細胞は Perilipin 陽性を示した。

PPAR $\gamma$  を発現する骨芽細胞が脂肪細胞へと分化転換する可能性が示唆された。

#### 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 4 件)

1. Fujino Y, Minamizaki T, Hayashi I, Kawakami A, Miyaji T, Sakurai K, Yoshioka H, Kozai K, Okada M, Yoshiko Y. Comparative proteome analysis of wild-type and klotho-knockout mouse kidneys using a combination of MALDI-IMS and LC-MS/MS. Proteomics Clinical Applications, Epub ahead of print,

2017 (査読有)

DOI: 10.1002/prca.201600095.

2. Fujino Y, Minamizaki T, Yoshioka H, Okada M, Yoshiko Y. Imaging and mapping of mouse bone using MALDI-imaging mass spectrometry. *Bone Reports*, 5: 280-285, 2016 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.bonr.2016.09.004
3. Yoshioka H, Minamizaki T, Yoshiko Y. The dynamics of DNA methylation and hydroxymethylation during amelogenesis. *Histochemistry and cell biology*, 144: 471-478, 2015 (査読有)  
DOI: 10.1007/s00418-015-1353-z
4. Takei Y, Minamizaki T, Yoshioka H, Yoshiko Y. Bone-derived miRNA as a mediator of cell-cell-communication. *Proceedings of 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry*, 71-72, 2015 (査読無)

(学会発表) (計 23 件)

1. 沖田紗季, 吉岡広陽, 南崎朋子, 谷本幸太郎, 吉子裕二. 骨芽細胞の多様性と脂肪細胞への分化転換. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜 (横浜)
2. 沖田紗季, 吉岡広陽, 南崎朋子, 谷本幸太郎, 吉子裕二. シングルセル RNA-seq による骨芽細胞の多様性の解析. 日本解剖学会第 71 回中国・四国支部学術集会, 2016 年 10 月 22 日, 岡山大学鹿田キャンパス (岡山)
3. Ahmed F, Minamizaki T, Yoshioka H, Yoshiko Y. Histomorphometric analysis of *Klotho*-deficient mice by nano-CT. 日本解剖学会第 71 回中国・四国支部学術集会, 2016 年 10 月 22 日, 岡山大学鹿田キャンパス (岡山)
4. Irie Y, Minamizaki T, Ahmed F, Nakao Y, Yoshioka H, Tanimoto K, Kozai K, Yoshiko Y. Osteoblasts inhibit osteoclast formation by targeting *Prdm1* via the mechanism underlying matrix vesicle-mediated transfer of miR-125b. *The American Society of Bone and Mineral Research 2016 Annual Meeting*, 2016 年 9 月 16 日, Atlanta (USA)
5. Irie Y, Minamizaki T, Nakao Y, Ahmed F, Yoshioka H, Kozai K, Tanimoto K, Yoshiko Y. Matrix vesicle miR-125b suppress osteoclast formation by targeting *Prdm1*. *Annual Meetings of the Endocrine Society of Australia and Society for Reproductive Biology and Australia and New Zealand Bone and Mineral Society 2016*, 2016 年 8 月 21 日, Gold Coast (Australia)
6. 入江泰正, 南崎朋子, 中尾裕子, Faisal Ahmed, 吉岡広陽, 香西克之, 竹井悠一郎, 吉子裕二. 骨芽細胞は基質小胞を介して miR-125b を輸送し, *Prdm1* を標的として破骨細胞の形成を抑制する. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会, 2016 年 7 月 23 日, 大阪国際会議場 (大阪)
7. Minamizaki T, Takei Y, Nakao Y, Irie Y, Yoshioka H, Tanimoto K, Kozai K, Yoshiko Y. MicroRNA-125b in bone matrix plays a crucial role in osteoblast-osteoclast communication. *43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress*, 2016 年 5 月 16 日, Rome (Italy)
8. 南崎朋子, 吉岡広陽, 竹井悠一郎, 吉子裕二. ナノ CT による *Klotho* 変異マウス骨小腔の解析. 第 121 回日本解剖学会総会・学術集会, 2016 年 3 月 28 日, ビッグパレットふくしま (福島)
9. Yoshioka H, Kagawa K, Okita S, Kuremoto K, Takei Y, Minamizaki T, Tanimoto K, Tsuga K, Yoshiko Y. A Novel isoform of *FGFR2* modulates *FGF10*-*FGFR* signaling in osteochondrogenesis. *6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry*, 2015 年 10 月 23 日, 広島国際会議場 (広島)
10. Nakao Y, Takei Y, Minamizaki T, Yoshioka H, Ahmed F, Tanimoto K, Niida S, Yoshiko Y. MicroRNAs involved in bone metabolism are transported into matrix vesicles during bone formation. *The American Society for Bone and Mineral Research 2015 Annual Meeting*, 2015 年 10 月 11 日, Seattle (USA)
11. Takei Y, Nakao Y, Minamizaki T, Irie Y, Ahmed F, Yoshioka H, Niida S, Tanimoto K, Yoshiko Y. Matrix vesicles mediate the cell-to-cell transmission of microRNA-125b as an inhibitor of osteoclastic bone resorption. *The American Society for Bone and Mineral Research 2015 Annual Meeting*, 2015 年 10 月 10 日, Seattle (USA)
12. Minamizaki T, Sakurai K, Yoshioka H, Takei Y, Kozai K, Yoshiko Y. Nano-CT analysis of osteocyte anomalies in *Klotho*-deficient mice. *The American Society for Bone and Mineral Research 2015 Annual Meeting*, 2015 年 10 月 10 日, Seattle (USA)
13. Kagawa K, Yoshioka H, Okita S, Kuremoto K, Takei Y, Minamizaki T, Tanimoto K,

- Tsuga K, Yoshiko Y. Newly identified FGFR2 isoform modulates FGF10-FGFR signaling during osteochondrogenesis. The American Society for Bone and Mineral Research 2015 Annual Meeting, 2015年10月10日, Seattle (USA)
14. 南崎朋子, 吉岡広陽, 竹井悠一郎, 吉子裕二. 骨量減少・骨髄の脂肪化と糖尿病関連因子 FGF21/ Klotho の関連について. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015年9月13日, 朱鷺メッセ (新潟)
15. 南崎朋子, 吉岡広陽, 竹井悠一郎, 吉子裕二. 骨を対象としたイメージング質量分析の検討. 第33回日本骨代謝学会学術集会, 2015年7月25日, 京王プラザホテル (東京)
16. Sakurai K, Minamizaki T, Yoshioka H, Takei Y, Kozai K, Yoshiko Y. MEPE-ASARM, a substrate of PheX, decreases bone volume independently of serum phosphate levels. 第48回広島大学歯学会総会, 2015年6月27日, 広島大学霞キャンパス (広島)
17. 香川和子, 吉岡広陽, 呉本晃一, 竹井悠一郎, 南崎朋子, 津賀一弘, 吉子裕二. 線維芽細胞増殖因子(FGF)10は頭蓋顎顔面の骨格形成を負に制御する. 第98回広島大学歯学会例会, 2014年11月9日, 広島大学霞キャンパス (広島)
18. 櫻井薫, 南崎朋子, 川本真貴子, 藤野陽子, 竹井悠一郎, 吉岡広陽, 岡田貢, 香西克之, 吉子裕二. 骨基質タンパク MEPE-由来 ASARM は血中リン濃度非依存的に骨量を減少させる. 日本解剖学会第69回中国・四国支部学術集会, 2014年10月26日, 広島大学霞キャンパス (広島)
19. 香川和子, 吉岡広陽, 呉本晃一, 竹井悠一郎, 南崎朋子, 津賀一弘, 吉子裕二. 線維芽細胞増殖因子(FGF)10がマウスの頭蓋顎顔面骨格系の形態形成に与える影響. 日本解剖学会第69回中国・四国支部学術集会, 2014年10月25日, 広島大学霞キャンパス (広島)
20. 藤野陽子, 南崎朋子, 宮脇聡子, 川上朝子, 宮地孝明, 櫻井薫, 竹井悠一郎, 吉岡広陽, 香西克之, 岡田貢, 吉子裕二. Klotho 欠損マウス腎臓のイメージング質量分析. 日本解剖学会第69回中国・四国支部学術集会, 2014年10月25日, 広島大学霞キャンパス (広島)
21. 香川和子, 吉岡広陽, 呉本晃一, 竹井悠一郎, 南崎朋子, 津賀一弘, 吉子裕二. 胎生期中後期における線維芽細胞増殖因子(FGF)10の過剰発現はマウス頭蓋顎顔面の形成障害をもたらす. 第56回歯科基礎医学会学術大会, 2014年9月26日, 福岡国際会議場 (福岡)
22. Sakurai K, Minamizaki T, Fujino Y, Takei Y, Yoshioka H, Okada M, Kozai K, Yoshiko Y. MEPE-ASARM, a substrate of PheX, decreases bone volume independently of serum phosphate levels. The American Society for Bone and Mineral Research 2014 Annual Meeting, 2014年9月14日, Houston (USA)
23. 櫻井薫, 南崎朋子, 吉岡広陽, 竹井悠一郎, 香西克之, 吉子裕二. PheXの基質 MEPE-ASARM は血中リン濃度非依存的に骨量を減少させる. 第32回日本骨代謝学会学術集会, 2014年7月26日, 大阪国際会議場 (大阪)
- {その他}  
ホームページ等  
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/anato1/welcome.htm>
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
吉岡 広陽 (YOSHIOKA, Hirotaka)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号:50523411
- (2)研究分担者  
吉子 裕二 (YOSHIKO, Yuji)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号:20263709
- (3)連携研究者  
新飯田 俊平 (NIIDA, Shunpei)  
国立長寿医療研究センター・メディカルゲノムセンター・センター長  
研究者番号:10137630
- (4)研究協力者  
南崎朋子 (MINAMIZAKI, Tomoko)  
竹井悠一郎 (TAKEI, Yuichiro)  
樋山伸二 (HIYAMA, Shinji)  
香川和子 (KAGAWA, Kazuko)  
沖田紗季 (OKITA, Saki)  
中野将志 (NAKANO, Masashi)