

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462826

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞が支持する破骨細胞前駆細胞ニッチの解析

研究課題名(英文) Analysis of osteoclast precursor niche regulated by BM-MSc

研究代表者

溝口 利英 (Mizoguchi, Toshihide)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：90329475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、生体内の破骨細胞前駆細胞(quiescent osteoclast precursors: QOP)を同定した。骨髄間葉系幹細胞(BM-MSc)がQOPを支持することを予想し、BM-MScの挙動を調べた。(1) BM-MSc(LepR陽性細胞)はRunx2を発現すること(LepR+Runx2low細胞)、(2) 副甲状腺ホルモン(PTH)投与に伴いLepR+Runx2low細胞は骨表面で層状構造(multi-layered cells)を形成し骨芽細胞に分化すること、(3)multi-layered cellsではOsterixとタイプ1コラーゲンの発現が上昇することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Previously, we identified an in vivo osteoclast precursor (QOP: quiescent osteoclast precursor). We hypothesized that the QOP are regulated by bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSc), and analyzed in vivo behavior of BM-MSc. In the present study, we revealed following things: (1) BM-MSc (LepR+ cells) express Runx2 (LepR+Runx2low cells). (2) In response to parathyroid hormone (PTH), LepR+Runx2low cells differentiate into osteoblasts via multi-layered cell formation. (3) The multi-layered cells express Osterix and Type I collagen sequentially, and eventually differentiate into mature osteoblasts.

研究分野：骨代謝学

キーワード：破骨細胞 破骨細胞前駆細胞 ニッチ 間葉系幹細胞 骨芽細胞 Runx2 Osterix レプチン受容体

1. 研究開始当初の背景

(1)破骨細胞前駆細胞の同定：以前我々は、生体内における破骨細胞が細胞増殖の停止した破骨細胞前駆細胞 (Cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors: QOP) から分化することを明らかにした (J Cell Biol 184:541-554, 2009)。しかしながら生体内におけるQOPの形成と支持機構は不明である。
 (2)造血幹細胞(HSC)の支持機構：成体における造血の場は骨髄である。すなわち、骨髄間葉系幹細胞(BM-MSC)がHSCを支持する微小環境(ニッチ)を構成することが知られている (Annu Rev Immunol 31: 285-316, 2013)。我々は、BM-MSCがQOPの支持も担うことを予想した。

2. 研究の目的

本研究は、破骨細胞前駆細胞 (QOP) の形成機構を解明することを目的とした。そのために、骨髄内で QOP の形成を支持する微小環境 (QOP ニッチ細胞) を同定することを目指した。BM-MSC は、自己複製能を持ち骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への多分化能を有する。我々は、BM-MSC が QOP のニッチの役割を担うという仮説を立て、生体内における BM-MSC を同定し、その挙動の詳細を解析した。以前我々は、細胞系譜解析を用いて BM-MSC をレプチン受容体 (LepR) 陽性細胞として同定している (Dev Cell 29: 340-349, 2014)。本研究では、LepR 陽性細胞の生体内における挙動についての解析を進めた。

3. 研究の方法

(1)Runx2-GFP 陽性細胞の組織学的観察：Runx2 は骨芽細胞分化のマスター転写因子である。BM-MSC の骨芽細胞分化過程を観察するために、Runx2 遺伝子の発現制御領域に依存して GFP を発現する Runx2-GFP マウスの骨髄組織の観察を行った。
 (2)Runx2-GFP 陽性細胞のフローサイトメーター解析：LepR 陽性細胞の Runx2-GFP 発現をフローサイトメーターにより調べた。
 (3)LepR 陽性細胞のサブポレーションにおける幹細胞能の解析：LepR-Cre、Tomato レポーターおよび Runx2-GFP の遺伝子を有したマウス (LepR/Tomato/Runx2 -GFP) を作製する。LepR 陽性細胞画分を Runx2-GFP 陽性と陰性の細胞群に分け、それぞれの幹細胞能を CFU-F (colony-forming unit fibroblasts) 解析およびスフェロイド培養解析により調べた。
 (4)生体内における骨芽細胞分化誘導実験：LepR/Tomato/Runx2 -GFP マウスに副甲状腺ホルモン (PTH) (1-34) を間歇投与し、骨形成を誘導する。LepR 陽性の BM-MSC の骨芽細胞分化過程を Runx2-GFP の発現を指標に調べた。さらに、骨芽細胞分化に必須な転写因子である Osterix (Osx) と Runx2 の挙動を調べるため、Osx-CreERT2 (iOsx)/Tomato/Runx2-GFP マウスを作製し、PTH(1-34) 投与による影響を調べた。また、成熟骨芽細胞の分化マーカーで

あるタイプ I コラーゲン (Col1) と Osx の関係性を調べるために、iOsx/Tomato/Col1-GFP を作製し、PTH(1-34) 投与による影響を調べた。

4. 研究成果

(1)Runx2-GFP 陽性細胞の組織学的観察：Runx2-GFP マウスの骨組織の切片を作製した Runx2-GFP の発現は、骨芽細胞と軟骨細胞で認められる一方、骨髄組織中にも確認され (図 1A)。LepR の免疫染色を行った結果、LepR 陽性の BM-MSC が Runx2-GFP を発現していることが明らかになった (図 1B)。

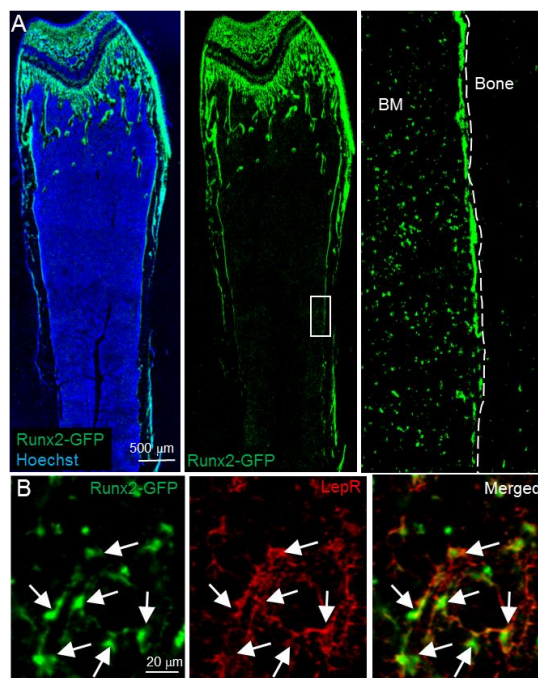


図 1 Runx2-GFPマウスの骨所見

(2)Runx2-GFP 陽性細胞のフローサイトメーター解析：Runx2-GFP マウスの骨髄細胞を回収し、フローサイトメーター解析を行った。その結果、骨髄の LepR 陽性細胞の約 60% が Runx2-GFP 陽性 (Runx2-GFP^{low}) であることが明らかになった (図 2A)。また、LepR⁺Runx2-GFP^{low} 細胞の絶対数および骨髄中の頻度は、LepR⁺Runx2-GFP⁻の約 3 倍であることが明らかになった (図 2B)。

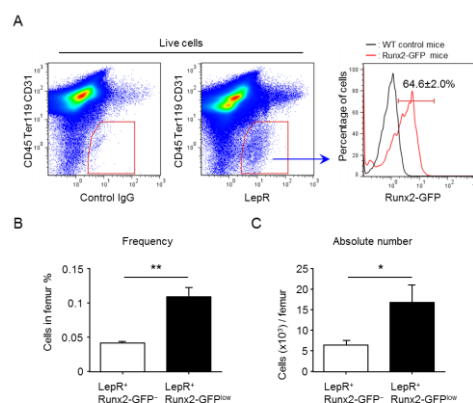


図 2 Runx2-GFPマウスの骨髄細胞フローサイトメーター解析

(3) LepR 陽性細胞のサブポプレーションにおける BM-MSC 能の解析: LepR/Tomato/Runx2-GFP マウスの骨組織を解析した。LepR 陽性細胞の一部は Runx2-GFP を発現することが示された(図 3 A)。Runx2 抗体を用いた免疫染色により、Runx2 はタンパク質レベルで LepR 陽性細胞に発現していることが示された(図 3B)。

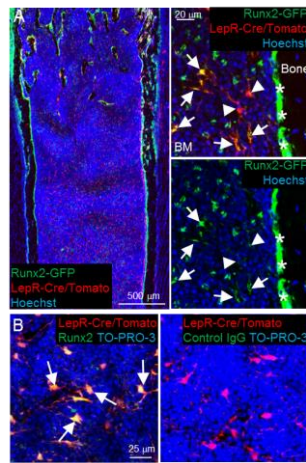


図 3 LepR-Cre/Tomato/Runx2-GFP マウスの骨組織所見

LepR 陽性細胞画分を Runx2-GFP 陰性および (low) の画分にセルソーターを用いて分取し、CFU-F およびスフェロイド形成能を調べた。その結果、LepR⁺Runx2-GFP^{low} 細胞は、LepR⁺Runx2-GFP⁺ よりも CFU-F およびスフェロイド形成能が共に高いことが明らかになった(図 4)。以上より、LepR⁺Runx2-GFP^{low} 細胞が骨髄間葉系細胞の分化系統樹の上流に位置することが示唆された。

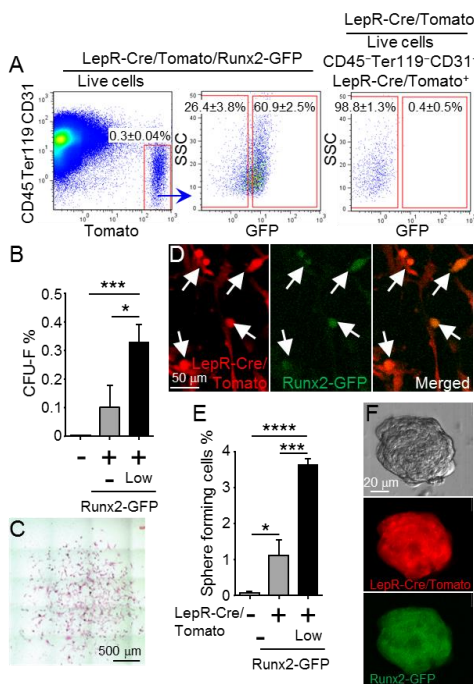


図 4 LepR 陽性細胞サブポピュレーションにおける間葉系幹細胞能の解析

(4) 生体内における骨芽細胞分化誘導実験: PTH(1-34) 投与の LepR⁺Runx2-GFP^{low} 細胞に対する作用を調べた。その結果、PTH(1-34) 投与により、LepR⁺Runx2-GFP^{low} 細胞が成熟骨芽細胞に分化することが明らかになった(図 5)。また、LepR⁺Runx2-GFP^{low} 細胞は、骨芽細胞への分化過程に、骨表面で層状の形態

(multi-layered cells) を経ることが示された(図 5)。

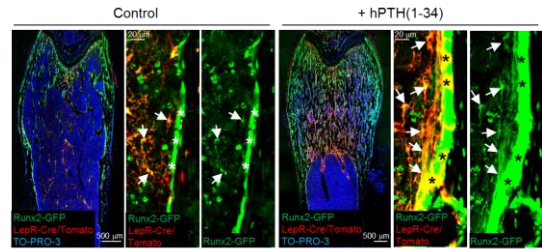


図 5 PTH(1-34) 投与による LepR/Runx2-GFP⁺ 細胞に対する作用

そこで次に我々は、multi-layered cells の詳細を解析するために、PTH(1-34) 投与後の iOsx/Tomato/Runx2-GFP マウスの骨組織を解析した。このマウスでは、Osx 陽性細胞は Tomato、そして Runx2 陽性細胞は GFP で検出できる。その結果、骨組織に近接した multi-layered cells だけが Osx を発現していることが明らかになった(図 6)。

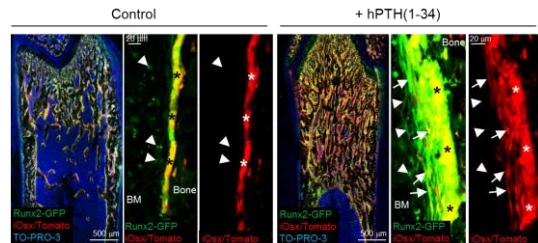


図 6 iOsx/Tomato/Runx2-GFP マウスを用いた Multi-layered cells の解析

次に iOsx/Tomato/Coll1-GFP マウスに PTH(1-34) を投与し、multi-layered cells を観察した。その結果、骨組織に近接した multi-layered cells だけが Coll1 を発現していることが明らかになった(図 7)。

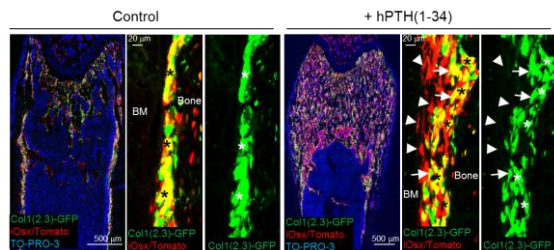


図 7 iOsx/Tomato/Coll1-GFP マウスを用いた Multi-layered cells の解析

以上の研究結果より、BM-MSC は骨芽細胞への分化過程に multi-layered cells を介することが生体内で明らかになった。骨の形成と吸収はカップルしており、過剰な骨形成後には破骨細胞形成が誘導される。今後、QOP と multi-layered cells の関係性を調べていく予定である。

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 7 件)

- (1) Nakamichi Y, Udagawa N, Horibe K, Mizoguchi T, Yamamoto Y, Nakamura T, Hosoya A, Kato S, Suda T, Takahashi N. VDR in osteoblast-lineage cells primarily mediates vitamin D treatment-induced increase in bone mass by

suppressing bone resorption.
J Bone Miner Res (査読有)2017.
(in press) DOI: 10.1002/jbmr.3096

- (2) Ito K, Turcotte R, Cui J, Zimmerman SE, Pinho S, Mizoguchi T, Arai F, Runnels JM, Alt C, Teruya-Feldstein J, Mar JC, Singh R, Suda T, Lin CP, Frenette PS, Ito K. Self-renewal of a purified Tie2+ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science* (査読有)354:1156-1160, 2016. DOI: 10.1126/science.aaf5530
- (3) Thirkonda GJ, Uehara S, Nakayama T, Yamashita T, Nakamura Y, Mizoguchi T, Takahashi N, Yagami K, Udagawa N, Kobayashi Y. The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. *J Bone Miner Metab* (査読有) 34:395-405, 2016. DOI: 10.1007/s00774-015-0683-1
- (4) Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. *J Biochem* (査読有) 159:387-392, 2016. DOI: 10.1093/jb/mvv124
- (5) Zhang Y, Li X, Chihara T, Mizoguchi T, Hori A, Udagawa N, Nakamura H, Hasegawa H, Taguchi A, Shinohara A, Kagami H. Comparing immunocompetent and immunodeficient mice as animal models for bone tissue engineering. *Oral Dis* (査読有)21:583-592, 2015. DOI: 10.1111/odi.12319
- (6) Mizoguchi T, Bone cell biology assessed by microscopic approach. Mechanisms of in vivo osteoclastogenesis. *Clin Calcium* (査読無) 25:1445-1452, 2015. DOI: CliCa151014451452
- (7) Kobayashi Y, Thirukonda GJ, Nakamura Y, Koide M, Yamashita T, Uehara S, Kato H, Udagawa N, Takahashi N. Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun* (査読有) 463:1278-1283, 2015. DOI: 10.1016/J.bbrc.2015.06.102

[学会発表] (計 21件)

- (1) 溝口利英、生体内における骨髄間葉系幹細胞の同定と制御機構の解析、第2回 Craniofacial and Stem Cell Biology Seminar 第153回 ECM Society、2016年10月14日 岡山大学歯学部(岡山県、岡

山市)招待講演

- (2) 溝口利英、細胞系譜解析による生体内における骨髄間葉系幹細胞の解析、第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年8月24日、札幌コンベンションセンター(北海道、札幌市)招待講演
- (3) 溝口利英、破骨細胞と骨芽細胞の起源、第34回日本骨代謝学会、2016年7月22日、大阪国際会議場(大阪府、大阪市)研究奨励賞受賞講演
- (4) 溝口利英、細胞系譜解析による生体内における骨髄間葉系幹細胞の同定と機能解明、第37回日本炎症再生医学会、2016年6月17日、京都市勧業館みやこめっせ(京都府、京都市)招待講演
- (5) 溝口利英、細胞系譜解析による生体内における骨髄間葉系幹細胞の同定と機能解明、第1回口腔医科学フロンティア研究会、2016年2月27日、愛媛大学(愛媛県、松山市)招待講演、研究奨励賞受賞
- (6) 溝口利英、発生過程における骨髄間葉系幹細胞の起源、第29回日本軟骨代謝学会、2016年2月19日、広島大学医学部(広島県、広島市)招待講演
- (7) 溝口利英、細胞系譜解析による生体内における骨髄間葉系幹細胞の同定と機能解明、第26回SKIP(Stem cell Knowledge and Information Portal)セミナー、2016年2月10日、慶應義塾大学医学部(東京都、新宿区)招待講演
- (8) 溝口利英 他、生体内における骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化機構、第1回日本骨免疫学会ウインターセミナー、2016年1月28日、ホテルマロウド軽井沢(長野県、軽井沢町)
- (9) 溝口利英、発生過程における骨髄間葉系幹細胞の起源、第9回骨・軟骨フロンティア、ベルサール八重洲、2015年11月7日(東京都、千代田区)招待講演
- (10) Mizoguchi T, Developmental origin of bone marrow mesenchymal stem cells、第12回 Bone Biology Forum、クロスウェーブ幕張、2015年8月22日(千葉県、千葉市)招待講演
- (11) 溝口利英、発生過程における骨髄間葉系幹細胞の起源、第33回日本骨代謝学会、京王プラザホテル、2015年7月24日(東京都、新宿区)招待講演

- (12) 溝口利英、発生過程における骨髄間葉系幹細胞の起源、第 14 回松本ボーンフォーラム、2015 年 5 月 16 日、信州大学医学部長野県、松本市)招待講演
- (13) 溝口利英、発生過程における骨髄間葉系幹細胞の起源、大学院医歯学合同セミナー、2015 年 5 月 15 日、北海道大学医学部 (北海道、札幌市)招待講演
- (14) 溝口利英、発生過程における骨髄間葉系幹細胞の起源、お茶の水がん学アカデミア第 113 回集会、2015 年 4 月 15 日、順天堂大学医学部 (東京都、文京区)招待講演
- (15) 溝口利英 他、生体内における骨髄間葉系幹細胞の同定、第 80 回松本歯科大学学会 2015 年 7 月 11 日、松本歯科大学 (長野県、塩尻市)
- (16) 溝口利英 他、生体内における骨髄間葉系幹細胞の同定、第 1 回日本骨免疫学会、2015 年 6 月 30 日、ホテルブリーズベイマリーナ (沖縄県、宮古島市) 研究奨励賞受賞
- (17) Mizoguchi T、Analysis of the relationship between bone marrow environment and bone metabolism. 3rd Osteoclast Biology Meeting、2015 年 2 月 20 日、ホテルマロウド軽井沢 (長野県、軽井沢町)
- (18) Mizoguchi T、Osterix⁺ cells in developing bone marrow contain the origin of bone marrow stem and progenitor cells in adult marrow、Joint symposium of KSBMR and BMTRC in the annual fall meeting of KSBMR、2014 年 11 月 15 日、Catholic University (Seoul, Korea) 招待講演
- (19) 溝口利英、発生過程における Osterix 陽性細胞は骨髄間葉系幹細胞に寄与する、第 17 回骨代謝研究会 2014 年 11 月 29 日 慶應義塾大学医学部 (東京都、新宿区)招待講演
- (20) 溝口利英 他、発生過程における骨髄間葉系幹細胞の起源、第 56 回歯科基礎医学学会学術大会、2014 年 9 月 26 日 福岡国際会議場 (福岡県、福岡市)
- (21) Mizoguchi T et al.、Osterix⁺ cells in developing bone marrow contain the origin of bone marrow stem and progenitor cells in adult marrow、第 11 回 Bone Biology Forum、2014 年 8 月 22 日、富士教育研修所 (静岡県、

裾野市)

[図書] (計 1 件)

分担者：溝口利英、分担表題名：骨芽細胞と造血幹細胞、編集者名：日本骨代謝学会、単行本名：骨代謝学 骨疾患・骨代謝キーワード辞典、発行所：羊土社、分担ページ：p166-167

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 利英 (MIZOGUCHI TOSHIHIDE)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：90329475

(2) 研究分担者

小林 泰浩 (KOBAYASHI YASUHIRO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号：20264252

中道 裕子 (NAKAMICHI YUKO)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：20350829