

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860183

研究課題名(和文)骨の質・量・形状変化に依存して生体応答を調節する骨由来因子の探索と解析

研究課題名(英文)Bone-derived factors that act in accordance to bone condition

研究代表者

住谷 瑛理子(Sumiya, Eriko)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：50724754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は骨から分泌される因子が身体に及ぼす作用、またその作用が性別や年齢、健康状態等と連関するかを調べることを目指した。その結果、骨を構成する細胞の一つである骨芽細胞が産生するIgf1タンパク質が、培養細胞に神経突起を伸ばす作用を示すことを見出した。次にIgf1がマウスの身体の中で神経系に影響を及ぼすかどうかを調べるために、骨芽細胞からIgf1を産生できない遺伝子改変マウスの作成と、骨の中の神経走行を蛍光タンパク質により可視化する実験系の確立を進めた。今後の研究で生体内の骨芽細胞が分泌するIgf1が神経系へ作用するかを調べ、その作用が性別や年齢、健康状態等と関係するかを明らかにする必要がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify bone-derived factor(s) that affect the body and to examine whether the effect was related to the condition of the bone (e.g. sex, age, health condition etc.). First, Igf1 was identified as an osteoblast lineage cell-secreted protein that induces neurite-like structures in cultured cells. Next, to study the physiological effect of Igf1, a genetically-modified mouse that do not produce Igf1 in osteoblasts was generated. Furthermore, a method to estimate bone innervation using mice that express fluorescent proteins in neurons was established. Further studies combining the Igf1 conditional knockout mice and the neuron-labeled mice are required to examine whether the loss of osteoblast-derived Igf1 affects bone innervation.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨分泌因子 骨芽細胞

### 1. 研究開始当初の背景

白骨を調べるだけでその骨の持ち主の性別や年齢を推定できるなど、骨格や骨量に性差や年齢の差がみられることはよく知られている。骨の形状に差や変化が生じることは、生殖器など各性に特有の臓器の保持、成長に応じた身体構造の物理的支持という観点から合理的であると考えられる。また、成長に伴う骨の変化により骨に貯蔵されるカルシウムの量が増えることは、筋収縮や神経伝達などカルシウムを必要とする重要な生命現象の恒常性を維持することに貢献していると考えられる。一方、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスの破綻により大理石骨病や骨粗鬆症を代表とする骨組織の変容を呈する疾患が発症することが知られている。このように、性別や年齢、健康状態によって骨の質・量・形状に差異が生じ、この差異は細胞レベルでの質や量に依存すると考えられるが、骨組織を構成する細胞の質や数、比率が変動することが身体の生理機能に及ぼす影響は不明である。一方、近年の研究から、骨は身体の支持組織として働くだけでなく、骨以外の組織や臓器の制御に関わることが明らかになりつつある。一例として、骨芽細胞により産生、分泌されるオステオカルシンがすい臓や脂肪細胞に作用し糖脂質代謝に関わることや、精巣に作用してテストステロンの産生を促進すること、脳に移行して神経細胞に作用することが報告された (*Cell*, **130**, 456-469, 2007 & *Cell*, **144**, 796-809, 2011 & *Cell*, **155**, 228-241, 2013)。これらの知見は、骨組織を構成する細胞が他臓器を標的とする因子を放出し、その制御に働くことを示す。雌雄や老若で骨組織に差があることと骨から分泌される因子が他臓器の制御に関与することとを併せて考え「骨組織の差異は骨分泌因子を介した全身の恒常性維持や生体応答に影響する」という仮説を立てた。骨組織を構成する細胞の数や比率に違いがあれば、そこから放出される骨分泌因子の量も変わると考えられる。したがって雌雄や老若の骨組織の差、骨疾患などに起因する骨組織の変化が骨分泌因子の発現パターンを変化させ、その結果、骨分泌因子に制御される生体機能に影響がおよび、アウトプットとして表現型に違いが生じるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、骨組織の差異に依存して発現変動がみられる骨分泌因子を同定し、その変動が全身の機能調節にどのような影響を及ぼすかを解析することを目指した。さらに、同定した骨分泌因子が骨の質・量・形状の違いによって生体の恒常性維持や環境刺激応答に与えるか否かを調べることを目的とした。骨疾患に伴う骨組織の異常が骨分泌因子のバランスに異変をもたらし、これが身体機能の調節に影響を及ぼすことが示されれば、骨

疾患に付随して起こる身体への影響、さらには性別や年齢に依存する症状に対して新たな認識を与える可能性がある。

### 3. 研究の方法

本研究では以下の3点を明らかにすることを計画した。(i)骨組織構成細胞から分泌され、他組織に作用する液性因子(以後Xとする)は存在するか。(ii)Xの生理的意義は何か。どのような分子メカニズムで作用するか。(iii)Xは骨の質・量・形状の違いによって発現量が変動するか。その変動によって生体応答に差が生じるか。

上記の3点を明らかにするために以下の研究方法をとることを計画した。まず、骨構成細胞、具体的には骨芽細胞の培養上清を用いた *in vitro* でのスクリーニングを行い、骨以外の組織由来の細胞に作用する骨芽細胞培養上清中の分泌因子Xを精製・同定する。Xが同定されたのち、Xをコードする遺伝子を骨芽細胞特異的に欠損したマウスを作成し、表現型を解析することで骨分泌因子Xの生理的意義を明らかにする。Xを欠損したマウスにXを投与することにより表現型が回復するかを検討するとともに表現型を導く分子メカニズムの解析を行う。さらに、Xがマウスの性別、週齢、健康状態に応じて発現変動するか、その変動が身体機能調節の差の原因となるかを調べる。

### 4. 研究成果

まず骨分泌因子の候補の探索を行った。骨分泌因子が作用する標的として神経系を想定し、マウス新生仔の頭蓋冠由来の細胞から分化誘導した骨芽細胞系細胞の培養上清をラット副腎褐色細胞腫由来のPC-12細胞に作用させた。その結果、骨芽細胞系細胞の培養上清がPC-12細胞に神経突起様の構造を誘導する活性分子を含むことを見出した。この活性分子は硫酸アンモニウムおよびエタノールにより沈殿し、60 30分処理により失活したことから、タンパク質であると推定した。そこで骨芽細胞系細胞の培養上清からPC-12細胞の突起誘導活性を指標に活性タンパク質の精製を試みた。培養上清の25~60%飽和硫酸沈殿画分をコラゲナーゼ処理したのち、この画分を陰イオン交換カラムDEAEセファロースに通し、素通りした画分を陽イオン交換カラムSPセファロースに吸着させ、500 mM NaClで溶出した。得られた画分は比活性が5倍となった。この部分精製画分に含まれるタンパク質をLC-MS/MSにより同定したところ157個の候補タンパク質を得た。このうち、分泌タンパク質は84個であった。これらの候補のリコンビナントタンパク質のPC-12細胞に対する作用を調べたところ、PC-12細胞に突起構造を誘導する活性を有するタンパク質としてIGF-1とTIMP-2を同定した。IGF-1は骨を含む全身のさまざまな組織から

分泌されることが知られているが、骨芽細胞が産生する IGF-1 が神経系に及ぼす影響については明らかにされていない。生体内において骨芽細胞が分泌する IGF-1 の神経系に対する作用を知る為に、*Igf1-flox* マウスと骨芽細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス系統である *Bglap-Cre* マウスを入手し、*Igf1<sup>flox/-</sup> Bglap-Cre<sup>+</sup>* マウスの作出を進めたが、研究期間内に骨芽細胞の *Igf1* 遺伝子をホモ欠損する個体を得ることができなかった。

一方、骨芽細胞由来の IGF-1 の標的となる可能性のある神経線維として骨髄中の神経線維を想定し、骨髄の神経線維の走行を評価するための実験系の確立に取り組んだ。神経線維に YFP を発現する *Thy1-YFP* マウスを用い、成体大腿骨および胎仔の発生中の大腿骨を経時的に採取し、それぞれに対して連続的な凍結切片を作成した。この骨髄切片中の YFP 陽性神経線維を共焦点顕微鏡により撮像する条件を定めた。骨髄中の YFP 陽性神経線維の長さを測定し、長さの総計により神経線維量を定量することができるようになった。

今後 *Igf1* を骨芽細胞特異的に欠損する *Igf1<sup>flox/-</sup> Bglap-Cre<sup>+</sup>* マウスに *Thy1-YFP* 遺伝子を持たせることで胎仔の発生段階における骨髄中への神経伸長および成体の骨の中の神経走行に異常がないかを調べ、さらにその表現型が雌雄差や年齢差、骨芽細胞が増減する疾病モデルにおいて変化するかを調べていく必要がある。

#### 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3件)

Eriko Sumiya, Takako Negishi-Koga, Yusuke Nagai, Ayako Suematsu, Tomomi Suda, Masahiro Shinohara, Kojiro Sato, Hideki Sanjo, Shizuo Akira, Hiroshi Takayanagi, Phosphoproteomic analysis of kinase-deficient mice reveals multiple TAK1 targets in osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 463, 1284-1290, 2015, 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.105.

Yasuhiko Matsumoto, Masaki Ishii, Yohei Hayashi, Shinya Miyazaki, Takuya Sugita, Eriko Sumiya, Kazuhisa Sekimizu, Diabetic silkworms for evaluation of therapeutically effective drugs against type II diabetes, *Sci Rep*, 5:10722, 2015, 査読有 DOI: 10.1038/srep10722.

Takako Negishi-Koga, Hans-Jürgen Guber, Eriko Sumiya, Noriko Komatsu, Kazuo Okamoto, Shinichiro Sawa, Ayako Suematsu,

Tomomi Suda, Kojiro Sato, Toshiyuki Takai, Hiroshi Takayanagi, Immune complexes regulate bone metabolism through FcRγ signaling, *Nat Commun*, 6:6637, 2015, 査読有, DOI: 10.1038/ncomms7637.

〔学会発表〕(計3件)

Shinichiro Sawa, Eriko Sumiya, Mesenchymal organizer cell-derived RANKL induces terminal differentiation of LTi cell in the lymph node anlagen, 7<sup>th</sup> Conference, 2017年3月16日、芝蘭会館(京都府・京都市)

住谷瑛理子、古賀貴子、篠原正浩、高柳広、破骨細胞特異的 TAK1 キナーゼ欠損マウスの International Workshop of Kyoto T Cell 解析、第33回日本骨代謝学会、2015年7月25日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

住谷瑛理子、古賀貴子、高柳広、神経系の制御に働く骨分泌因子の探索、第35回日本炎症・再生医学会、2014年7月2日、万国津梁館(沖縄県・名護市)

〔図書〕(計1件)

解説記事

住谷瑛理子、高柳広、「オステオネットワークによる全身臓器の制御」、*O.l.i.v.e.*、第5巻第1号、60-62、2015

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

住谷 瑛理子(SUMIYA, Eriko)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：50724754

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし