

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15540

研究課題名(和文)骨細胞による新たな骨芽細胞制御機構の解明

研究課題名(英文)A novel mechanism for osteoblastic bone formation regulated by osteocytes

研究代表者

篠原 正浩(Shinohara, Masahiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：60345733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：加齢等の要因により骨量が低下すると骨粗鬆症を発症し、骨折しやすい状態となる。現在、骨の形成を促進する科学的根拠に基づいた有効な手段はほとんど存在しないことから、本研究では新たな骨形成の分子メカニズムを明らかにし、骨形成促進を可能にする新規手法の分子基盤の確立を目指した。骨代謝を制御する細胞の一つである骨細胞においてシグナル伝達因子PI3Kを欠損したマウスでは骨を形成する骨芽細胞の分化が抑制されるという知見を基に、骨細胞による骨芽細胞分化のメカニズムを分子レベルで明らかにすることに成功した。従って、本研究結果で明らかにしたメカニズムに立脚した将来的な新規骨形成促進薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Osteoporosis is a disease with a high risk of bone fracture, in which bone mass decreases owing to various factors such as ageing. Since currently there is no method or drug for osteoporosis therapy to stimulate bone formation, the aim of this study is to establish a molecular basis for a novel strategy of regulating the stimulation of bone formation through understanding a mechanism of bone formation mediated by osteoblasts. Based on the analysis of mice, in which the PI3K gene is ablated specifically in osteocytes that regulate bone homeostasis, we revealed a novel mechanism by which osteocytes regulate osteoblastic bone formation. The results in this study will lead to develop a novel strategy for osteoporosis therapy by stimulation of bone formation in the future.

研究分野：骨代謝学、細胞生物学

キーワード：骨粗鬆症 骨代謝 骨細胞 骨芽細胞 骨形成

1. 研究開始当初の背景

骨組織は身体を支え、運動機能に重要であるばかりではなく、臓器や組織を保護する役割を果たしている。また、カルシウムやリンといった生命活動に必要な無機物などを貯蔵するほか、骨内部の骨髄における造血やホルモン・増殖因子の産生を担うなど、生命活動に欠かせない重要な組織である。骨組織では、骨を破壊する細胞である破骨細胞による古い骨の破壊と、骨を形成する細胞である骨芽細胞による新しい骨の形成が行われており、この骨の破壊と形成のバランスが骨組織恒常性の維持に必須である。骨細胞は骨基質に埋もれた細胞であり、様々なメカニズムにより骨芽細胞や破骨細胞の分化・機能の制御を行う重要な細胞である。

これまで、骨細胞による骨芽細胞制御に関しては、Gap junction を介した骨細胞と骨芽細胞同士の細胞間コミュニケーションによる制御や液性の骨芽細胞分化制御因子である Sost を介した制御などが報告されている。しかし、これら以外にも骨細胞による骨芽細胞分化制御メカニズムが存在する可能性も考えられる。

これまで、研究代表者は骨代謝細胞における IA 型 PI3K の機能を解明する目的で、破骨細胞特異的な IA 型 PI3K ノックアウトマウスの作成・解析を行ってきたが (J Bone Miner Res, 2012)、今回は骨細胞特異的な IA 型 PI3K の作成・解析を行った。予備的データから、骨細胞特異的な IA 型 PI3K ノックアウトマウスでは、骨芽細胞分化が著しく障害され、重度の骨粗鬆症を発症することが判明し、骨細胞において IA 型 PI3K は骨芽細胞分化制御に重要であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では骨細胞における IA 型 PI3K が骨芽細胞分化を制御する分子メカニズムを明らかにすることを主たる目的とした。

骨細胞-骨芽細胞間の gap junction 形成には PI3K-Akt 経路が重要であることが報告されているから、はじめに骨細胞特異的な IA 型 PI3K ノックアウトマウスの骨組織における gap junction 形成に異常が認められるかどうかについて評価を行い、さらにノックアウトマウスの骨細胞における遺伝子発現解析を実施することで、gap junction 形成関連因子の遺伝子発現の異常について解析を行うこととした。

一方で、既に報告されている gap junction に重要なコネクシン 43 の骨細胞特異的なノックアウトマウスにおける骨粗鬆症の重篤度は、IA 型 PI3K ノックアウトマウスにおける骨量減少と比較して軽いことから、gap junction 以外の制御法の存在も視野に入れた。このため、骨細胞に発現する骨芽細胞制御因子の遺伝子発現等に関する解析を実施し、IA 型 PI3K を介する骨細胞による骨芽細胞制御のメカニズム解明の分子基盤確立も狙いとした。

3. 研究の方法

骨細胞と骨芽細胞間の gap junction 形成に関する解析では、骨細胞特異的な IA 型 PI3K ノックアウトマウスと EGFP を発現するトランスジェニックマウスを交配し、ノックアウトマウスの骨細胞で EGFP を発現するような新規遺伝子改変マウスを作成した。このマウスの骨組織をサンプリングし、4%パラホルムアルデヒドで組織固定後、EGFP の蛍光を指標とした骨細胞-骨芽細胞間の gap junction について共焦点レーザー顕微鏡による解析を実施した。

並行してノックアウトマウスの血中骨代謝マーカーについて ELISA 法による測定を実施し、骨形成マーカーの評価を行った。骨代謝マーカーとして、①骨破壊を担う破骨細胞の分化因子であるサイトカイン (receptor activator of NF- κ B ligand: RANKL)、②破骨細胞から特異的に分泌されるホスファターゼ (tartrate acid phosphatase: TRAP)、③破骨細胞による骨破壊時に産生される骨基質タンパク分解物 (collagen type I cross-linked C-telopeptide: CTx)、④ RANKL の機能を阻害する分泌タンパク (osteoprotegerin: OPG)、⑤骨形成を担う骨芽細胞から特異的に産生されるホルモン用タンパク (Osteocalcin: OCN)、⑥骨形成時に骨芽細胞から産生されるコラーゲン前駆体 (N-terminal propeptide of type I procollagen: P1NP)、⑦骨芽細胞の分化抑制因子 (sclerostin: Sost) の7種類について解析を行った。

また、ノックアウトマウスの骨組織より骨髄細胞を除去し、酵素的に細胞表面に存在する破骨細胞や骨芽細胞を除去した骨組織より Trizol を用いて RNA を抽出、qPCR による遺伝子発現解析を実施した。解析遺伝子は骨細胞に特異的な遺伝子であることが報告

されている *Screlostin* (*Sost*)、*Dentin matrix protein1* (*DMP1*)、*matrix extracellular phosphoglycoprotein with ASARM motif (bone)* (*Mepe*) などの遺伝子、骨芽細胞に発現する *Osteocalcin* (*Ocn*)、*Collagen, type I, $\alpha 1$* (*Col1a1*)、*Sp7 transcription factor* (*Osx*)、*Runt related transcription factor 2* (*Runx2*) などの遺伝子について行った。

さらに、骨組織より抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を実施し、網羅的な遺伝子発現情報を取得した。同時に、ノックアウトマウス由来の骨髄間葉系幹細胞を骨芽細胞分化培地 (α MEM、10%FBS、50 mg/ml ascorbic acid、10 mM β -glycerophosphate、10 nM dexamethasone) で 21 日間培養することで骨芽細胞へ分化誘導し、RNA 抽出後、骨組織と同様の遺伝子発現解析を実施した。DNA マイクロアレイ解析は、Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array (約 39,000 transcript) を用いて実施した。

この網羅的な遺伝子発現情報から、野生型マウスとノックアウトマウス間で有意に発現が変動する遺伝子群を抽出した。その後、バイオインマティクス解析を実施し、骨芽細胞による骨形成に関連すると想定される遺伝子の絞り込みを行った。

さらに、これら遺伝子の骨芽細胞における機能を解析するため、野生型マウス新生児頭蓋冠由来の骨芽細胞前駆細胞にレトロウイルスを用いて過剰発現した後、骨芽細胞分化の誘導を行い、最終的には骨芽細胞が産生するアルカリホスファターゼを指標としたアッセイ、および骨芽細胞による石灰化能を指標にしたアッセイを実施した。

4. 研究成果

骨細胞特異的 IA 型 PI3K ノックアウトマウスにおける骨芽細胞-骨細胞間の gap junction の観察を行ったところ、野生型マウスにおける gap junction と形態的な変化は認められなかった。さらに、gap junction の形成に重要な役割を果たす *connexin43* (*Cx43*) の細胞内局在について *Cx43* の特異的抗体を用いた蛍光免疫染色による解析したが、野生型マウスと比較して局在や蛍光強度に違いは認められなかった。並行して、骨組織やマウス由来骨芽細胞における *Cx43* の発現について qPCR による解析を行ったが、野生型と

ノックアウトマウス間で発現に有意な差は認めなかった。この結果は、骨細胞における *Cx43* の発現や gap junction の形成は IA 型 PI3K の活性を必須としないこと、ノックアウトマウスにおける骨芽細胞分化抑制は骨細胞-骨芽細胞間の gap junction 非依存的に起こることを示唆している。また、この結果から液性因子等を介した細胞間情報伝達による骨細胞の骨芽細胞制御が考えられた。

全身における血中骨代謝マーカーの解析では、*RANKL* や *OPG*、*TRAP*、*CTx* といった骨破壊と関連する血中マーカー濃度に異常はない一方、*PINP* や *Ocn* の血中濃度は低下していた。しかし、骨芽細胞分化を負に制御する *Sost* については野生型マウスと同レベルであった。従って、ノックアウトマウスにおける骨芽細胞分化抑制は、既知の *Sost* による制御ではないことが想定された。実際に骨組織における *Sost* の発現を qPCR で確認したところ、ノックアウトマウスにおける *Sost* の発現上昇は認められなかった。この他、骨細胞による骨芽細胞分化制御に関わることが知られている *Dkk1* の発現も変化は認められず、未知なる因子による制御が示唆された。

そこで、ノックアウトマウスの骨組織における網羅的遺伝子発現解析を実施した。野生型マウスの骨組織で発現が比較的高い遺伝子 (average difference 300 以上) のうち、細胞外もしくは細胞膜に局在するタンパク質をコードする 283 遺伝子を抽出した。さらにこれら遺伝子のうち、ノックアウトマウスの骨組織において発現が 50%未未満まで低下する遺伝子として 5 遺伝子まで絞り込んだ。これら 5 遺伝子は骨芽細胞分化を正に制御する可能性がある遺伝子として、さらなる in vitro 解析を実施した。

一方、野生型と比較してノックアウトマウスの骨組織で 2 倍以上発現が上昇し、比較的高い発現が高い遺伝子として 5 遺伝子を抽出した。これらの遺伝子は骨芽細胞分化を負に制御する可能性がある遺伝子として、さらなる解析を実施した。

骨組織における網羅的遺伝子発現解析と並行し、骨髄由来間葉系幹細胞から分化誘導をかけた骨芽細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析も実施した。この解析では、骨芽細胞特異的な遺伝子や骨細胞特異的な遺伝子に注目した解析を実施したが、野生型とノックアウトマウス由来の骨芽細胞における顕著な発現変動は認められず、ノックアウトマウス由来の骨芽細胞はほぼ正常に分化する能

力を保っていることが判明した。

骨芽細胞分化促進・抑制に関与することが想定された計 10 遺伝子について、培養骨芽細胞を用いた過剰発現実験および発現抑制実験を実施した。クローニングした全遺伝子の cDNA をレトロウイルスで発現させるため、レトロウイルスベクター pMXs-IRES-Puro にそれぞれクローニングした。これらのベクターをパッケージング細胞に導入し、各遺伝子を過剰発現することが可能なレトロウイルスを作成した。一方、発現抑制実験では、各遺伝子の発現を抑制する shRNA を発現することが可能なレトロウイルスベクターを作成した。これらのレトロウイルスをマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞前駆細胞に感染させ、遺伝子の過剰発現および発現抑制を行い、その後骨芽細胞分化培地で 7 日間もしくは 21 日間の培養を行ったところ、分化促進が期待される 5 遺伝子のうち 3 遺伝子が骨芽細胞分化 7 日目におけるアルカリホスファターゼ発現ならびに 21 日目における石灰化を顕著に促進した。また、分化抑制が期待される 5 遺伝子のうち 2 遺伝子がアルカリホスファターゼの発現および石灰化を抑制することが明らかとなった。

逆に shRNA により発現を低下させた場合、実際に分化促進効果が認められた 3 遺伝子中 1 遺伝子の発現低下で、石灰化能の抑制が認められた。しかし、過剰発現により分化抑制効果が認められた 2 遺伝子については、いずれも発現低下による骨芽細胞分化への影響は認められなかった。

以上の *in vitro* における機能解析の結果から、分化促進効果が認められる 1 遺伝子についてはノックアウトマウスの作成を行なっている。これに対して、分化抑制の可能性が残る 2 遺伝子については、野生型マウスの骨芽細胞では発現が低いことから、発現抑制時の骨芽細胞分化に対する影響が認められないことが判明したため、*in vitro* の機能解析は終了し、骨細胞で過剰発現するトランスジェニックマウスの作成を開始した。

本研究では、骨細胞特異的 IA 型 PI3K ノックアウトマウスの骨組織解析から、新規骨芽細胞制御因子の候補遺伝子を同定することに成功した。実際の生体内における機能解析並びに遺伝子の骨代謝における重要性・必須性を明らかにすることは今後の課題ではあるが、この研究を基盤として骨形成を促進させる新規戦略の開発に結びつけることが可能となる。

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 6 件)

1. Ohmae S, Noma N, Toyomoto M, Shinohara M, Takeiri M, Fuji H, Takemoto K, Iwaisako K, Fujita T, Takeda N, Kawatani M, Aoyama M, Hagiwara M, Ishihama Y, Asagiri M. Actin-binding protein coronin 1A controls osteoclastic bone resorption by regulating lysosomal secretion of cathepsin K. *Sci Rep* (査読あり), doi: 10.1038/srep41710, 2017
2. Koda N, Sato T, Shinohara M, Ichinose S, Ito Y, Nakamichi R, Kayama T, Kataoka K, Suzuki H, Moriyama K, Asahara H. Mohawk transcription factor regulates homeostasis of the periodontal ligament. *Development* (査読あり), 144: 313-320, 2017
3. Suzuki H, Ito Y, Shinohara M, Yamashita S, Ichinose S, Kishida A, Oyaizu T, Kayama T, Nakamichi R, Koda N, Yagishita K, Lotz MK, Okawa A, Asahara H. Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotropic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* (査読あり), 113, 7840-7845, 2016
4. Shimbo M, Kudo T, Hamada M, Jeon H, Imamura Y, Asano K, Okada R, Tsunakawa Y, Mizuno S, Yagami K, Ishikawa C, Li H, Shiga T, Ishida J, Hamada J, Murata K, Ishimaru T, Hashimoto M, Fukamizu A, Yamane M, Ikawa M, Morita H, Shinohara M, Asahara H, Akiyama T, Akiyama N, Sasanuma H, Yoshida N, Zhou R, Wang YY, Ito T, Kokubu Y, Noguchi TK, Ishimine H, Kurisaki A, Shiba D, Mizuno H, Shirakawa M, Ito N, Takeda S and Takahashi S*. Ground-based assessment of JAXA mouse habitat cage unit by mouse phenotypic studies. *Exp Anim* (査読あり), 65, 175-187, 2016
5. Tateishi R, Akiyama N, Miyauchi M, Yoshinaga R, Sasanuma H, Kudo T, Shimbo M, Shinohara M, Obata K, Inoue J, Shirakawa M, Shiba D,

- Asahara H, Yoshida N, Takahashi S, Morita H, Akiyama T*. Hypergravity provokes a temporary reduction in CD4+CD8+ thymocyte number and a persistent decrease in medullary thymic epithelial cell frequency in mice. *PLoS One* (査読あり), 10, e0141650, 2015
6. Sumiya E, Negishi-Koga T, Nagai Y, Suematsu A, Suda T, Shinohara M, Sato K, Sanjo H, Akira S, Takayanagi H*. Phosphoproteomic analysis of kinase-deficient mice reveals multiple TAK1 targets in osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* (査読あり), 463, 1284-1290, 2015

[学会発表] (計 11 件)

国際学会

1. Koda N, Shinohara M, et al., "Roles of transcription factor Mohawk in periodontal ligament", International Association for Dental Research 2016, 2016/6/21, Seoul (Korea)
2. Koda N, Shinohara M, et al., "Roles of transcription factor Mohawk in periodontal ligament", International Bone and Mineral Society Herbert Fleisch Workshop 2016, 2016/2/28, Brygge (Belgium)
3. Koda N, Shinohara M, et al., "Roles of transcription factor Mohawk in periodontal ligament", 25th Annual Scientific meeting of the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society, 2015/11/1, Tasmania (Australia)

国内学会

4. 篠原正浩、中浜健一、浅原弘嗣、「IA型PI3Kを介した骨細胞による骨芽細胞制御」、第2回日本骨免疫学会、2016/7/6、ホテルモンテ沖縄スパ&リゾート (沖縄・恩納村)
5. 幸田直己、篠原正浩ほか、「歯根膜恒常性維持の新たなメカニズム - 転写因子Mohawk homeobox (Mkx)の機能解明-」、2015/12/1、第38回日本分子生物学会年会、ポートピアホテル (兵庫・神戸市)
6. 幸田直己、篠原正浩ほか、「歯根膜恒常性維持の新たなメカニズム - 転写因子Mkxの機能解明-」、第74回日本矯正歯

科学大会、2015/11/18、マリンメッセ福岡 (福岡・博多市)

7. 幸田直己、篠原正浩ほか、「歯根膜における転写因子Mkxの機能解析」、第2回日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス、2015/10/2、東京大学鉄門記念講堂 (東京・文京区)
8. 幸田直己、篠原正浩ほか、「歯根膜における転写因子Mkxの機能解析」、第57回歯科基礎医学会学術大会、2015/9/11、新潟コンベンションセンター (新潟・新潟市)
9. 幸田直己、篠原正浩ほか、「歯根膜における転写因子Mkxの機能解析」、第33回日本骨代謝学会学術集会、2015/7/23、京王プラザホテル (東京・新宿区)
10. 篠原正浩ほか、「力学的荷重変動による骨代謝恒常性維持の新たなメカニズムの解明」、第1回日本骨免疫学会、2015/6/30、ホテルブリーズベイマリーナ (沖縄・宮古市)
11. 幸田直己、篠原正浩ほか、「歯根膜における転写因子Mkxの機能解析」、第1回日本骨免疫学会、2015/6/30、ホテルブリーズベイマリーナ (沖縄・宮古市)

[図書] (計 6 件)

1. 篠原正浩、浅原弘嗣 「骨組織系の表現系解析」、実験医学別冊『マウス表現型解析パーフェクトガイド』(羊土社)、p159-168 (10 ページ)、2016
2. 篠原正浩、「免疫複合体は FcRγシグナルを介して骨代謝を制御する」、THE BONE (メディカルレビュー社)、Vol. 29、p430 (1 ページ)、2016
3. 篠原正浩、「IgG 抗体の糖鎖修飾が破骨細胞分化と骨量減少を決定する」、THE BONE (メディカルレビュー社)、Vol. 29、p430 (1 ページ)、2016
4. 篠原正浩、高柳広、「次世代の分子ターゲット Btk」、分子リウマチ治療 (先端医学社)、Vol. 9、p26-30 (5 ページ)、2016
5. 篠原正浩、「骨免疫学総論」、炎症と免疫 (先端医学社)、Vol. 22、p315-321 (7 ページ)、2015
6. 篠原正浩、「骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典」(羊土社)、「第2部 4章 破骨細胞の分化と機能 Keyword 4 ITAM シグナル」、p138-140 (3 ページ)、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 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 正浩 (SHINOHARA, Masahiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師

研究者番号 : 60345733

(2) 研究分担者

中浜 健一 (NAKAHAMA, Ken-ichi)

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 : 6028515

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

幸田 直己 (KODA, Naoki)