

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15819

研究課題名(和文) インビトロ再構築系を用いた骨細胞によるカップリング制御機構の時空間的解明

研究課題名(英文) Spatio-temporal analysis of regulatory mechanisms of coupling by osteocytes using an in vitro reconstitution system.

研究代表者

疋田 温彦(Hikita, Atsuhiko)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：60443397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨が破壊されて再び形成されるリモデリングと呼ばれる過程において、骨の中に多数存在する骨細胞が果たしている役割について検討した。骨組織の維持に関わる細胞のネットワークを体外で再現した実験系において、骨細胞を除去した時の、リモデリングにおける細胞のふるまいの変化を、組織の深部を観察可能な2光子顕微鏡を用いて解析した。その結果、骨細胞の除去は破骨細胞を減少させることで骨の破壊を抑制し、その後起こる骨の再形成を減少させた。このことから、骨細胞は破骨細胞による骨の破壊を促進することでリモデリングを開始させていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the role of osteocytes, which exist in the bone abundantly, in the process called remodeling in which bone is destroyed and reformed. In an assay system which reconstitutes the network of cells involved in the maintenance of bone tissue, the change of the cell behavior in the remodeling process when osteocytes were removed was analyzed using two-photon microscopy by which the depths of the tissues can be observed. As a result, removal of osteocytes resulted in the suppression of bone destruction by the reduction of osteoclasts and decreased the following bone reformation. These results implied that osteocytes induce the remodeling by promoting bone destruction by osteoclasts.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨リモデリング 骨細胞

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞による骨吸収窩において骨芽細胞が基質を産生する、いわゆるカップリングは、骨リモデリングを司る重要な機構であり、骨量の維持のみならず、古い骨基質の新生基質への置換による骨量の維持にも必須である。口腔外科領域においては歯周病に伴う歯槽骨の骨量減少の予防や、外傷や腫瘍に伴う顎骨欠損に対する再生・再建は临床上重要な課題であり、カップリングの解明はその病因の解明や新規治療の開発に重要な情報を提供する。近年、骨基質内にネットワークを形成して存在する骨細胞が、sclerostinを分泌して骨芽細胞の機能を抑制する一方、receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)を発現して破骨細胞分化を支持することで骨代謝を制御していることが明らかになっている。また、骨細胞の特異的な除去は骨量を減少させることも報告されている。しかし、カップリングにおいて骨細胞が骨芽細胞、破骨細胞の両者への作用を質的、量的にどのように変化させ、この機構を制御しているのかは不明である。骨細胞によるカップリング制御機構の理解は、骨量および骨質を改善可能な治療法の確立に必須であるが、その解明に必要な、カップリングを細胞レベルで解析する方法はこれまで存在しなかった。

申請者はこれまでに、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞および基質からなる骨代謝細胞ネットワークを *in vitro* で再構築し、2光子顕微鏡によりカップリングを含むリモデリング過程を細胞レベルで経時的に観察することに成功している。申請者は、自ら開発した極めて独自性の高い手法を利用し、骨細胞のカップリング制御機構における役割を細胞レベルで時空間的に解明することが可能であると考へた。

2. 研究の目的

骨細胞が骨芽細胞、破骨細胞の分化・活性の時空間的調節を通じてカップリングを制御する機構を解明し、骨量、骨質共に改善する治療法の確立に繋がる基礎的な知見を得ること。

3. 研究の方法

骨モデリング、リモデリング過程を *in vitro* で再現し、2光子顕微鏡を用いた解析が可能な系を用いた機能解析を行う。全身に緑色蛍光タンパク EGFPを発現する EGFP マウスと、骨細胞特異的な Dmp1 プロモーターの活性化によりジフテリアトキシン受容体を発現する Dmp1-HBEGF マウスを掛け合わせたマウスより頭蓋骨を採取し、コラゲナーゼ処理を行う。骨を細切してできた骨片を播種し、数日間 *Migrate* してきた骨芽細胞を採取する。

これを 60 mm ディッシュに播種したのち、コンフルエントに達した時点でアスコルビン酸、 β -Glycerophosphate、BMP-2 を含んだ培地に切り替え、分化培養を行う。コラーゲン基質からなる石灰化結節が形成されたのちに、マクロファージ、破骨細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する RANK-Cre マウスと、Cre が発現した細胞特異的にストップ配列が除去されて赤色蛍光タンパク tdTomato を発現する flox-tdTomato マウスを掛け合わせたマウス由来の骨髄マクロファージを播種し、prostaglandin E2、1,25-dihydroxyvitamin D3 存在下に共存培養を行う。3 週間の共存培養の後に、再び骨芽細胞分化培養条件に戻して培養する(図1)。この間1週間ごとに2光子顕微鏡を用いて同一の部位を観察することで、第二次高調波発生(second harmonic generation: SHG)により検出される基質の破壊および再充填が観察される。この過程において、ジフテリアトキシン投与を投与し、石灰化結節内の骨細胞が特異的に除去される条件を検討する。この検討を基に時期特異的な骨細胞除去を行い、カップリングにおける細胞動態や基質の変化に与える影響を時空間的に解析する。

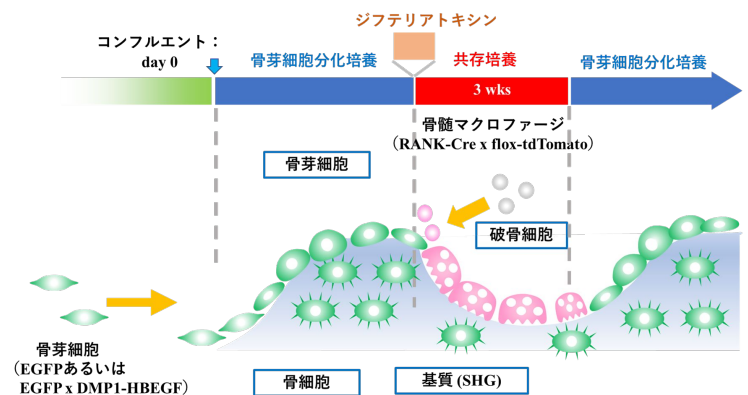


図1：骨代謝関連細胞ネットワーク *in vitro* 再構築系の模式図

4. 研究成果

(1) RANK-Cre x flox-tdTomato マウス骨髄マクロファージを用いた骨代謝関連細胞ネットワーク *in vitro* 再構築系の確認

骨代謝関連細胞ネットワークを *in vitro* で再構築した培養系において、破骨細胞を分化早期から標識可能な RANK-Cre x flox-tdTomato マウスより採取した骨髄マクロファージを導入した。EGFP 発現マウスより骨芽細胞を採取し、60 mm ディッシュに播種した。コンフルエントに達した時点で骨芽細胞分化培養を開始した。分化培養開始4週後に、RANK-Cre x flox-tdTomato マウス骨髄マクロファージを加え、共存培養を行った。さらに3週間後、再び骨芽細胞分化培地に変更した。この一連の過程において、1週間ごと

に2光子顕微鏡を用いて同一部位の解析を行った。その結果、共存培養による破骨細胞の分化と骨破壊の進行、および骨芽細胞分化培養条件に戻すことで骨吸収窩における基質再充填が観察可能であることを確認した。さらに、RANK-Cre x flox-tdTomato マウス骨髄マクロファージを用いた観察は、以前に行った Ctsk-Cre x flox-tdTomato マウス骨髄マクロファージを用いた場合に比べ、単核破骨細胞の描出が可能であり、早期からの破骨細胞の観察が可能であること、野生型マウス骨髄マクロファージを赤色蛍光色素 DiI で標識したものをを用いた場合に比べ、成熟破骨細胞の描出に優れていることを確認した。

(2) Dmp1-HBEGF マウス由来骨芽細胞より分化した骨細胞の特異的除去についての検討

次に、Dmp1-HBEGF マウス由来骨芽細胞より分化した骨細胞の特異的除去について検討した。ジフテリアトキシン投与により骨細胞を特異的に除去可能な Dmp1-HBEGF マウスを理研バイオリソースより入手し、EGFP マウスと掛け合わせて産仔を得た。得られた産仔のうち、両者の遺伝子を持つもの、および EGFP の遺伝子のみ持つものから、上記と同様の方法で採取した骨芽細胞を用いて分化培養を行った。骨芽細胞分化により石灰化結節が形成された状態で、100 ng/mL ジフテリアトキシンを加えたところ、投与前には2光子顕微鏡を用いた観察で検出されていた基質内の骨細胞由来と考えられる緑色蛍光シグナルが、1週間後の観察においては消失していることが確認された。一方、基質上のシグナルには著変がなく、ジフテリアトキシンは骨芽細胞には影響を与えていないと考えられた(図2)。また、EGFP 遺伝子のみを有し、Dmp1-HBEGF 遺伝子を有さない細胞では、骨細胞シグナルの変化は明らかではなかった。このことから、ジフテリアトキシンを投与することで、Dmp1-HBEGF 遺伝子を有する骨細胞のみを特異的に除去することが可能であると考えられた。

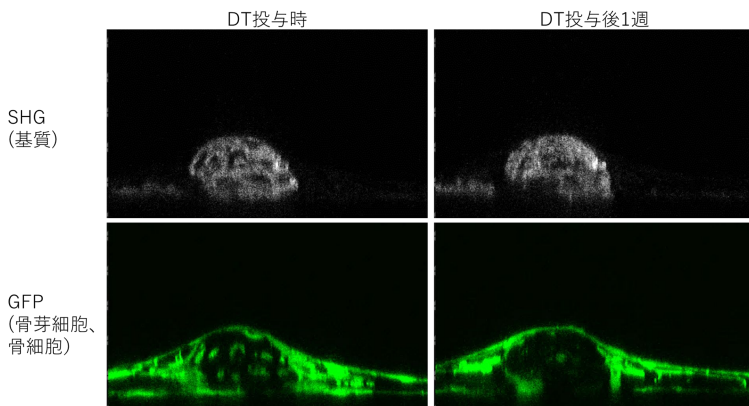


図2: ジフテリアトキシン (DT) 投与による骨細胞除去

(3) 骨細胞の特異的除去による細胞動態や基質変化についての検討

これらの所見を基に、骨細胞の特異的な除去がリモデリングサイクルにおける細胞動態や基質変化に与える影響についての検討を行った。Dmp1-HBEGF マウスと EGFP マウスを掛け合わせたマウス由来の骨芽細胞を用いた培養において、共存培養開始直前にジフテリアトキシンを加えることで骨細胞を特異的に除去したところ、ジフテリアトキシンを加えなかった培養に比べて、共存培養時の破骨細胞のシグナルが減少した。また、1週間ごとの各観察時点における、SHG により描出される基質の体積を画像解析ソフト IMARIS を用いて算出し、その変化について検討した。Dmp1-HBEGF マウスと EGFP マウスを掛け合わせたマウス由来の骨芽細胞を用いた培養においては、ジフテリアトキシンを加えなかった培養と比較して、共存培養時の基質減少が抑制され、その後骨芽細胞分化培養条件に戻した時の基質再充填も抑制された(図3)。これらの現象は、並行して行った、Dmp1-HBEGF 遺伝子を持たない EGFP マウス由来の骨芽細胞を用いた培養においては観察されなかった。このことから、骨細胞は破骨細胞分化を促進することを通じて、リモデリングサイクルを開始させていることが示唆された。

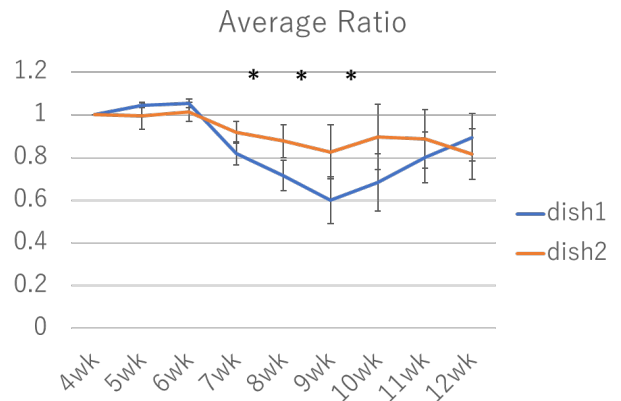


図3: ジフテリアトキシン (DT) 投与による基質の変化。4週目のSHGシグナル領域を1とした時の比。Dish1: DTなし、Dish2: DTあり (4-6週に投与)。*p<0.05 (dish1 vs dish 2)

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)

[学会発表](計3件)

1. In vitro analysis of bone remodeling using two-photon microscopy.

Hikita A.

CIMR-UTokyo Symposium 2017. 2017年9月18日 St Catherine's College, Cambridge, England

2 . Modeling of bone remodeling by three-dimensional co-culture of mouse embryonic stem cell-derived osteoblasts and osteoclast precursors.

Zujur DC, Hikita A, Kanke K, Hojo H, Tei U, Ohba S.

第 35 回日本骨代謝学会学術集会 2017 年 7 月 29 日 ホテル日航福岡、福岡県福岡市

3 . Modeling of bone remodeling by three-dimensional co-culture of mouse embryonic stem cell-derived osteoblasts and osteoclast precursors.

Zujur DC, Hikita A, Kanke K, Hojo H, Chung UI, Ohba S.

ANZBMS-IFMRS-JSBMR meeting 2017 年 6 月 20 日 Brisbane Convention & Exhibition Centre, Queensland, Australia

6 . 研究組織

(1)研究代表者

疋田 温彦 (HIKITA Atsuhiko)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号 : 60443397

(2)研究分担者

西條 英人 (SAIJO Hideto)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号 : 80372390

藤原 夕子 (FUJIHARA Yuko)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号 : 50466744