

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11613

研究課題名(和文) 単一細胞解析による骨芽細胞の運命制御機構の解明と新規骨形成促進剤の標的分子探索

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of osteoblast fate regulation by single cell analysis and search for target molecules of novel osteogenesis-promoting agents

研究代表者

吉岡 広陽 (Yoshioka, Hirota)

国際医療福祉大学・医学部・講師

研究者番号：50523411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞が辿る運命過程を遺伝子発現の変化から追い求め、運命決定の鍵となる制御機構を見出すことを目的として、個々の骨芽細胞からトランスクリプトームを取得した。機械学習による解析から、骨芽細胞の不均一性を見出すとともに、骨芽細胞から幼若骨細胞への分化に伴う遺伝子発現プロファイルを明らかにした。また、幹細胞・前駆細胞の性質を保持または再獲得したと考えられる骨芽細胞を見出した。以上の結果から、骨芽細胞の不均一性は、骨芽細胞の機能と発生運命の多様性の根底にあるものと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により明らかとなった「骨芽細胞の分化に伴う遺伝子発現プロファイル」は、骨芽細胞の次なる運命を決定する制御機構の解明に向けた分子基盤となる。近年、遺伝子の発現をコントロールできる小分子化合物が見出され、転写制御からアプローチする創薬が注目されている。同様の原理に基づき、「骨芽細胞の運命を制御することにより骨代謝を改善し、骨形成を促進できる」と考えている。本研究により得られた知見が、骨の再生および骨関連疾患への臨床応用を見越したゲノム創薬や分子標的療法への足がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：Transcriptomes were obtained from single osteoblasts in order to follow the fluctuations in gene expression during osteoblast differentiation and to identify key regulatory mechanisms that determine the fate of osteoblasts. Machine learning analysis revealed heterogeneity of osteoblasts, and gene expression profiles during differentiation of osteoblasts into young osteocytes. We also found osteoblasts that may have retained or reacquired stem/progenitor cell characteristics. Taken together, the heterogeneity of osteoblasts may underlie the diversity of their function and developmental fate.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨芽細胞 単一細胞解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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た日本では、医療・介護に依存しない自立した生活を送り、健康寿命を延伸することが重要な社会的課題となっている。特にロコモティブシンドロームと呼ばれる骨・筋肉・関節などの運動器障害は健康寿命に大きく影響する因子であり、骨粗鬆症や歯周病といった骨関連疾患の予防・治療法の確立が期待される。

#### (2) 骨芽細胞の分化とその多様性

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、骨形成を担ったのち、骨代謝の維持に重要な細胞へとさらに分化していく。骨芽細胞の約半数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休止期骨芽細胞となる。また、加齢や病態に伴って脂肪細胞へと分化転換する例が報告されている。骨細胞は機械的刺激に应答して骨質の維持に働き、休止期骨芽細胞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考えられている。つまり、骨芽細胞の分化が適切に進行し、適切に骨細胞・休止期骨芽細胞へと分化すること、また脂肪細胞への分化転換を抑制することが、正常で健康な骨を維持する上で重要な鍵となっている。しかし、間葉系幹細胞から骨芽細胞へと分化する機構は詳細に解明されているにも関わらず、骨芽細胞の次なる運命を決定し、さらに分化していく過程にどのような分子機構が存在するのか不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

骨芽細胞は骨形成を担った後、アポトーシスにより死滅するほか、骨表面にとどまり休止期骨芽細胞となる、あるいは骨基質に埋もれて骨細胞へと最終分化する。また、加齢や病態に伴い脂肪細胞へと分化転換する例も報告されている。本研究では、骨芽細胞が辿る運命過程を遺伝子発現ネットワークの変化から追い求め、運命決定の鍵となる制御機構を見出し、骨形成を促進するゲノム創薬の基盤とする。具体的には、以下の3点について解明することを目的とする。

- ・ 骨芽細胞の分化に伴う遺伝子発現プロファイルを構築する
- ・ 骨芽細胞の運命を制御する主要な分子を見出す
- ・ 骨形成を促進するゲノム創薬や分子標的療法に向けた分子基盤を創出する

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨芽細胞の可視化を目的としたレポーターマウスの樹立

2.3 kb I型コラーゲンプロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (Col1a1-Cre) と R26R-Lyn-Venus マウス (RIKEN Center for Life Science Technologies, CDB0219K) を交配させ、骨芽細胞特異的に黄色蛍光タンパク質 Venus を発現するレポーターマウス (Col1a1-Cre; R26R-Lyn-Venus) を樹立した。

#### (2) フローサイトメトリーによる Venus 陽性骨芽細胞の分離

2~4日齢の Col1a1-Cre; R26R-Lyn-Venus 新生仔マウスから頭蓋冠を無菌的に回収し、コラーゲンナーゼおよび EDTA による連続消化を行い、頭蓋冠細胞を採取した。頭蓋冠細胞を BD FACSAria II フローサイトメーターでソーティングし、Venus 陽性の骨芽細胞を回収した。

### (3) 骨芽細胞のシングルセル RNA シーケンス (RNA-seq)

回収した骨芽細胞を C1 システム (フリーダム社) にて 1 細胞ごとに単離し, シングルセル RNA-seq ライブラリーを構築した。計 285 個のシングルセル RNA-seq ライブラリーは, Illumina HiSeq 2500 または NovaSeq 6000 にて配列決定した。これらの配列データは, DDBJ Sequence Read Archive にアクセス番号 DRA011310 および DRA011348 で登録された。シングルセル RNA-seq データの品質指標は以下の通りである (リード数が非常に少なかった 2 つの細胞を除く): 細胞あたりの平均リード数, 396 万リード/細胞; ゲノムにマッピングされたリードの割合, 平均 80.43%; 検出された全遺伝子, 16408 遺伝子; 細胞あたりの平均検出遺伝子, 3854.13 遺伝子/細胞。

### (4) シングルセル RNA-seq データの解析

UCSC Mus musculus transcriptome (mm10) へのリードのアライメント, およびリードカウントと fragments per kilobase of exon per million reads mapped (FPKM) の算出は, BaseSpace RNA-seq Alignment v1.1.1 を使用して行った。クラスタリングと発現差異解析は Seurat R package v3.0.0 を用いて行った。擬似時間解析には Monocle R パッケージ v2.10.0 を用いた。加重遺伝子共発現ネットワーク解析 (Weighted gene correlation network analysis; WGCNA) は WGCNA R package を用いて行った。Gene Ontology (GO) 解析は PANTHER classification system を用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 骨芽細胞の遺伝子発現プロファイルのクラスタリング解析

計 283 個の骨芽細胞のトランスクリプトームを取得し, 骨芽細胞の特徴づけを行った。機械学習による分析から, 骨芽細胞は 4 つのクラスターに分けられた。各クラスターで特異的に高発現する遺伝子を探索し, GO 解析を行った。クラスター 1 は細胞分化の制御に關与する遺伝子群, クラスター 2 は骨形成に關与する遺伝子群, クラスター 3 は軟骨細胞分化, バイオミネラル組織形成に關与する遺伝子群, クラスター 4 は細胞接着, 細胞外マトリックスに關与する遺伝子群が高発現していた。

### (2) 骨芽細胞の分化経路の推定

Monocle を用いた擬似時間軸の解析から, 分化経路を推定し, 確立された骨髄間葉系幹細胞, 骨芽細胞, 骨細胞のマーカー遺伝子の発現プロファイルと照らし合わせた。骨芽細胞マーカー遺伝子 Col1a1, Col1a2, Sparc および Spp1 は, 解析したすべての細胞で発現していた。一方, 間葉系幹細胞や骨芽細胞前駆細胞に発現する Cd34 と Cxcl12 遺伝子は, クラスター 4 でのみ観察された。クラスター 1~3 は骨芽細胞系譜マーカーと類似した発現プロファイルを示すが, これらのクラスター間で合計 909 遺伝子が異なって発現し, いくつかの異なる特徴が明らかであった。骨芽細胞前駆細胞のマーカーである Dlx5, Sp7 および Satb2 はクラスター 2 で高い発現を示した。成熟骨芽細胞マーカーである Bglap と Bglap2 は, クラスター 1, 2 に比べてクラスター 3 では低い発現を示した。骨芽細胞から骨細胞への移行を示すマーカー Pdpn, Dmp1, Phex は, クラスター 3 で最も高い発現を示した。以上の結果から, クラスター 2 の細胞は比較的成熟度の低い発現プロファイルを示し, 次いでクラスター 1 の細胞, そしてクラスター 3 の細胞の順に分化が進行すると考えられ, 骨芽細胞の限られた時間枠内の分化に伴う遺伝子発現プロファイルの挙

動が明らかとなった。また、Monocle によりクラスター1 からクラスター4 への分化が推測されたことから、クラスター4 は、骨芽細胞から骨細胞への分化が反転し、幹細胞や前駆細胞の性質を再獲得したと考えられた。

### (3) 骨芽細胞トランスクリプトームのネットワーク解析

WGCNA を用いて共発現ネットワークを構築し、11 個の異なる共発現モジュール (M1~M11) を抽出した。これらのモジュールのうち、M1(タンパク質合成に働く遺伝子群)と M2 (ER からゴルジ体への輸送, ゴルジ体から ER への逆行性輸送に働く遺伝子群) がクラスター2 で最も高い相関を示し、クラスター1, クラスター3 と続き、クラスター4 で最も低い相関を示した。一方、M3 (細胞内輸送, 細胞基質の接着, Ras タンパク質のシグナル伝達に関わる遺伝子群), M4 (リン脂質の代謝, 液胞やエンドソームの輸送に関与する遺伝子群), そして M5 (DNA 複製, 細胞周期に関与する遺伝子群) のモジュールは、クラスター4 と正の相関を示した。このように、クラスター4 の細胞は、クラスター1~3 の細胞よりも多くの共発現モジュールと相関性があり、クラスター4 の細胞は潜在的な多機能性を有する状態であるのに対し、クラスター1~3 の細胞はタンパク質合成と輸送を中心とした機能的に均一な状態であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshioka H, Okita S, Nakano M, Minamizaki T, Nubukiyo A, Sotomaru Y, Bonnelye E, Kozai K, Tanimoto K, Aubin JE, Yoshiko Y	4. 巻 5
2. 論文標題 Single Cell RNA Sequencing Reveals the Breadth of Osteoblast Heterogeneity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm4.10496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Minamizaki T, Sakurai K, Hayashi I, Toshishige M, Yoshioka H, Kozai K, Yoshiko Y	4. 巻 517
2. 論文標題 Active sites of human MEPE-ASARM regulating bone matrix mineralization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 110931 ~ 110931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2020.110931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Minamizaki T, Nakao Y, Irie Y, Ahmed F, Itoh S, Sarmin N, Yoshioka H, Nobukiyo A, Fujimoto C, Niida S, Sotomaru Y, Tanimoto K, Kozai K, Sugiyama T, Bonnelye E, Takei Y, Yoshiko Y	4. 巻 3
2. 論文標題 The matrix vesicle cargo miR-125b accumulates in the bone matrix, inhibiting bone resorption in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0754-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Minamizaki T, Konishi Y, Sakurai K, Yoshioka H, Aubin JE, Kozai K, Yoshiko Y	4. 巻 237
2. 論文標題 Soluble Klotho causes hypomineralization in Klotho-deficient mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 285-300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-17-0683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshioka H, Yoshiko Y	4. 巻 18
2. 論文標題 The Roles of Long Non-Protein-Coding RNAs in Osteo-Adipogenic Lineage Commitment	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1236 ~ 1236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18061236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Minamizaki T, Toshishige M, Yoshioka H, Ahmed F, Mine Y, Yoshiko Y
2. 発表標題 A synthetic peptide derived from the SIBLING protein MEPE inhibits ectopic mineralization but not bone formation.
3. 学会等名 World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshioka H, Nakano M, Minamizaki T, Kozai K, Yoshiko Y
2. 発表標題 Plasticity of osteoblasts and their adipogenic potential dissected by single cell RNA-sequencing.
3. 学会等名 The American Society of Bone and Mineral Research 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野将志, 吉岡広陽, 南崎朋子, 香西克之, 吉子裕二
2. 発表標題 シングルセル解析から見た骨芽細胞の多様性と脂肪細胞分化転換能
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okita S, Yoshioka H, Minamizaki T, Tanimoto K, Yoshiko Y
2. 発表標題 Single-cell RNA-sequencing shows the adipogenic potential in osteoblasts.
3. 学会等名 2017 ANZBMS-IFMRS Joint Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 沖田紗季, 吉岡広陽, 南崎朋子, 吉子裕二
2. 発表標題 シングルセルRNA-seqによる骨芽細胞の多様性と脂肪細胞分化能の解析
3. 学会等名 第35回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakano M, Yoshioka H, Okita S, Tanimoto K, Kozai K, Minamizaki T, Yoshiko Y
2. 発表標題 Single-cell RNA sequencing provides molecular dissection of osteoblasts and their adipogenic potential.
3. 学会等名 2017 Annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	吉子 裕二  (Yoshiko Yuji)  (20263709)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授    (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	University of Toronto			
フランス	Institut de Cancerologie de l'Ouest			