

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15588

研究課題名(和文) 機能的な骨髄の形成に重要なストロマ細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of cells contributing to bone marrow development

研究代表者

住谷 瑛理子 (Sumiya, Eriko)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：50724754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄は哺乳類の主要な造血の場として重要な役割を担う。骨髄の発生は胎生期に始まるが、詳細な機序は十分に明らかにされていない。本研究では骨髄の構築に寄与する細胞群の同定と機能解析を目指した。マウスを用いた解析から、胎仔軟骨膜に出現するRANKL陽性細胞が、破骨細胞の誘導を介して骨髄腔の形成に寄与することを見出した。さらに、このRANKL陽性細胞が骨芽細胞や骨髄ストロマ細胞を含む、骨と骨髄を構成する複数種類の細胞へ分化する、胎仔特有の細胞群であることを明らかにした。本研究の結果から、骨髄造血が開始する新生仔期の造血環境の構築に重要な新規細胞群として胎仔RANKL陽性細胞を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により新生児期における骨髄造血微小環境が形成されるメカニズムの一端が明らかになったことは学術的に意義がある。また、本研究において胎児の正常な骨髄発生に働く細胞群の同定と性状解析により得られた知見は、今後、がん治療の副作用などにより機能低下した骨髄を再構築するための治療法などの開発の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow is the major site of hematopoiesis in mammals. Bone marrow development initiates during the fetal stage. However, the mechanism is not fully understood. In this study, I aimed to identify cells which contribute to the development of bone marrow. Analysis using mouse embryos revealed that RANKL-positive cells which appear in the fetal perichondrium contribute to bone marrow cavity development by inducing osteoclasts. This RANKL-positive cell population was found specifically in the fetus, and further differentiated into a range of cell types including osteoblasts and bone marrow stromal cells as the bone developed. These results indicate that RANKL-positive fetal perichondrial cells is a novel cell population contributing to the development of the bone marrow hematopoietic environment around the perinatal stage.

研究分野：骨発生

キーワード：骨髄発生 骨髄ストロマ細胞 破骨細胞誘導 RANKL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄は哺乳類の主要な造血の場であり、骨髄機能の低下は重度の貧血や易出血性、免疫不全などの生命に関わる重篤な疾患に結びつく。骨髄は骨の内腔に存在し、造血幹細胞とそこから産生される血球の他、血管や骨髄ストローマ細胞などから構成されるが、機能的な骨髄環境がどのようなプロセスを経て構築されるかは十分に理解されていない。

身体の大部分の骨は内軟骨性骨化により形成される。この骨化様式では、まず将来骨が出来る部位に軟骨から成る骨原基が形成され、やがてその中央部分に存在する肥大軟骨細胞のアポトーシスと並行して周囲の血管や間葉系の細胞が侵入し、軟骨を置き換えるようにして骨と骨髄が形成されていく。マウスにおいては胎生末期に造血幹細胞が幼若骨髄に定着し、骨髄での造血が始まると考えられている。

これまでに軟骨への血管侵入の場には骨吸収を担う細胞である破骨細胞が存在することが報告されているが、破骨細胞を欠損したマウスでも骨髄の形成自体は起こることから、胎児破骨細胞の骨および骨髄発生における意義は不明であった。

一方、成体マウスにおいて造血幹細胞の支持に重要な役割を果たす骨髄ストローマ細胞として Cxcl12、Scf、Pdgfr、Sca-1、Lepr などの発現により定義される複数の細胞集団がみつかり (Morrison & Scadden, 2014, Nature)、骨髄ストローマ細胞の発生学上の上流細胞の一つとして Osterix 陽性細胞が報告されているが (Mizoguchi et al, 2014, Dev Cell)、骨髄が発生するメカニズムには依然として未解明な点が多々ある状況である。

2. 研究の目的

本研究では骨髄造血が開始されるための環境構築に寄与する細胞群を同定することを目的とした。そもそも骨髄が骨の内腔に存在するためには、十分なスペースを有する骨髄腔が形成されることが必要ではないかと考え、骨髄腔の形成における破骨細胞の関与を解析することとした。また、造血幹細胞の定着や支持に働く可能性のある周産期の骨髄ストローマ細胞の起源となる細胞を同定、追跡することで骨髄造血開始期の造血環境が形成されるメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 骨髄腔の形成における破骨細胞の関与の検討。

破骨細胞を可視化できる Tnfrsf11a-IRES-EGFP BAC Tg マウスを用い、胎仔の大腿骨原基における破骨細胞の出現時期と組織学的位置を解析した。同様に、破骨細胞誘導に必須の因子である RANKL を発現する細胞の分布を Tnfsf11^{Cre/+}; R26-tdTomato マウスを用いて調べた。この解析によって見つかった RANKL⁺細胞が生体内で破骨細胞を誘導する機能を有するか否かを検討するために、RANKL を発現する四肢の間葉系細胞をジフテリア毒素投与により時期特異的に除去することのできるマウス (Prx1-Cre; Tnfsf11^{idTR/+}) を作成した。このマウスを用いて胎仔 RANKL 発現細胞を除去し、周産期の幼若骨に対して組織学的解析やフローサイトメトリーを用いた解析を実施した。TRAP 染色による破骨細胞の検出、von Kossa 染色による骨化領域の検出を行った他、骨髄中の CD45.2 陽性の血球数を調べた。

(2) 胎仔 RANKL⁺細胞の細胞運命の追跡

(1) の解析から胎仔の RANKL⁺細胞が骨髄腔の形成に寄与することがわかったので、この細胞の性状をさらに詳しく知るために細胞運命の追跡実験を行うことにした。RANKL 発現細胞をドキシサイクリンの投与により時期特異的に tdTomato で標識できるマウス (Tnfsf11^{tTA/+}; LC1; R26-tdTomato) を作成した。胎仔 RANKL⁺細胞を特異的に標識し、出生後の tdTomato⁺細胞を組織学的な手法やフローサイトメトリーを用いて解析し、幼若骨および骨髄内での tdTomato⁺細胞の分布や既知の細胞マーカー (骨芽細胞マーカー Osterix、骨髄ストローマ細胞マーカー Lepr) と共免疫染色されるかどうかを検討した。

(3) 胎仔 RANKL⁺細胞の遺伝子発現解析

Tnfsf11^{tTA/+}; LC1; R26-tdTomato マウスの胎仔骨原基および成体長管骨を酵素処理して細胞を分散させ、セルソーターを用いて tdTomato⁺細胞を単離し、RNA-seq を実施した。得られたデータから胎仔および成体の tdTomato⁺細胞の遺伝子発現パターンの比較解析を行った。さらに、胎仔 RANKL⁺細胞のヘテロジェナイエティや出生後の RANKL⁺細胞との遺伝子プロファイルの違いを検討するために、同様に Tnfsf11^{tTA/+}; LC1; R26-tdTomato マウスから単離した tdTomato⁺細胞に対して Chromium システム (10x Genomics) を用いてシングルセル RNA-seq を実施した。得られたデータは Seurat を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 胎仔破骨細胞誘導細胞の同定

Tnfrsf11a-EGFP BAC Tg レポーターマウスを用いて胎仔大腿骨を解析した結果、最初の EGFP⁺破骨細胞が E15.5 の一次骨化中心に検出された。一方、破骨細胞誘導の必須因子である RANKL を発現する細胞の組織学的分布を Tnfsf11^{Cre/+}; R26-tdTomato マウスを用いて調べたところ、E14.5 において肥大軟骨細胞に隣接する軟骨膜中に tdTomato⁺細胞が検出された。この胎仔軟骨膜

RANKL⁺細胞が破骨細胞誘導機能を有するか否かを検討するために Prx1-Cre; RANKL^{iDTR/+}を作成し、E13.5 および E14.5 にジフテリア毒素を投与することで胎仔 RANKL⁺細胞を除去した。その結果、E17.5 の幼若骨において TRAP⁺破骨細胞の誘導が阻害されており、骨髓中に異常な小骨片の形成が認められた。また、胎仔期に RANKL⁺細胞を除去した新生仔の骨髓では CD45.2⁺の血球数が低下していることが FACS 解析により明らかになった。これらの結果から胎仔 RANKL⁺細胞は破骨細胞の誘導を介して骨髓腔の形成に働き、新生仔期の骨髓中の造血環境の構築に寄与することが示唆された。

(2)胎仔 RANKL⁺細胞の細胞運命

Tnfsf11^{tTA/+}; LC1; R26-tdTomato マウスを用いて E15.5 までに出現する胎仔 RANKL 発現細胞を tdTomato で特異的に標識したのち、出生直後の骨を解析した。tdTomato⁺細胞は Osterix⁺骨芽細胞や Lepr⁺骨髓ストローマ細胞を含む複数種類の細胞に分化し、骨髓造血開始期の骨と骨髓全体に分布していることが組織学的解析や FACS 解析から明らかになった。この結果から、胎仔軟骨膜 RANKL⁺細胞は未分化な細胞であり、発生の進行に従って骨と骨髓を構成する細胞に分化することで骨髓造血環境の形成に関与していることがわかった。

(3)胎仔 RANKL⁺細胞のシングルセル RNA-seq 解析

Tnfsf11^{tTA/+}; LC1; R26-tdTomato マウスを用いて胎仔および成体の骨から tdTomato⁺細胞を単離し、RNA-seq により遺伝子発現解析を行った。成体の tdTomato⁺細胞は骨芽細胞マーカー (Sp7, Alpl, Col1a1, Bglap) や骨髓ストローマ細胞マーカー (Cxcl12, Lepr, Kitl) を高発現しており、これらの細胞種の混ざった細胞集団であることが考えられた。一方、胎仔 tdTomato⁺細胞に特異的に高発現する遺伝子群がみつき、胎仔 RANKL⁺細胞の新たな分子マーカー候補が得られた。さらに胎仔 RANKL⁺細胞を詳細に解析するために、Tnfsf11^{tTA/+}; LC1; R26-tdTomato マウスから単離した tdTomato⁺細胞の一細胞遺伝子発現解析を行った。その結果、胎仔 tdTomato⁺細胞は異なる遺伝子発現傾向を示す複数のクラスターを形成するヘテロな細胞集団であることが明らかになった他、胎仔 tdTomato⁺細胞は出生後の tdTomato⁺細胞に含まれる分化した骨芽細胞や骨髓ストローマ細胞とは異なるクラスターに存在し、胎仔に特異的な細胞集団であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 住谷瑛理子、中野堅太、岡村匡史、森岡裕香、澤新一郎
2. 発表標題 胎仔期の骨髓腔形成に寄与する破骨細胞誘導細胞の同定
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 The role of fetal osteoclast inducer cells in perinatal bone marrow development
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 Mesenchymal organizer cell-derived RANKL induces terminal differentiation of LTi cell in the lymph node anlagen
3. 学会等名 4th Lymphoid Tissue Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 住谷瑛理子、澤新一郎
2. 発表標題 骨髓空間の発生に寄与する細胞の同定
3. 学会等名 第54回日本生化学会北海道支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 Fate mapping of RANKL-expressing cells in the fetal bone
3. 学会等名 第46回日本免疫学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 住谷瑛理子、澤新一郎
2. 発表標題 骨と骨髄の発生におけるRANKL陽性未分化間葉系細胞の寄与の解明
3. 学会等名 第29回 KTCC
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住谷瑛理子、澤新一郎
2. 発表標題 胎仔破骨細胞誘導細胞の生体内における分化能の解析
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 Transcriptomic characterization of cells involved in fetal bone development
3. 学会等名 The 29th Hot Spring Harbor International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 非ヒト遺伝子改変動物及びその作製方法	発明者 澤 新一郎、住谷 瑛理子	権利者 北海道大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-229876	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----