

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18438

研究課題名(和文) マクロファージが産生・分泌する骨芽細胞遊走因子の同定と機能解明

研究課題名(英文) The identification of osteoblast migration factors secreted by macrophages

研究代表者

小原 幸弘 (Kohara, Yukihiro)

愛媛大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50792214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージが骨芽細胞による骨形成を支持することが示唆されているが、その機序はわかっていない。研究代表者はマクロファージの培養上清が骨髄間質細胞株ST2の走化性を刺激することを見出し、その原因因子Emilin2を同定した。マクロファージはEmilin2を産生することで、骨髄間質細胞の遊走を制御していることが示唆された。マクロファージによる骨代謝制御のメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症は、低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨折の危険性が増大する疾患である。患者数は、我が国では約1,300万人と推測され、患者の生活の質を著しく損なうこと、現行のビスフォスフォネート製剤では副作用が強いことから新しい治療法の開発が求められている。研究代表者が新規に骨代謝制御因子として同定したEmilin2が骨粗鬆症に対する新規の創薬シーズとなる可能性がある。また、マクロファージ/破骨細胞系におけるヘッジホッグシグナルが加齢性の骨量減少を制御していることを明らかにしたことから、ヘッジホッグシグナルに対する介入もまた、新規の治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It was suggested that macrophages have the potential to support bone formation by osteoblasts and contribute to bone metabolism. However, the molecular mechanisms underlying how macrophages stimulate osteogenesis and regulate bone remodeling have not been characterized. Here, we found that bone marrow macrophage-conditioned medium stimulated chemotaxis in bone marrow stromal ST2 cells. To purify the chemotactic activity from the macrophage-conditioned medium, we performed successive anion-exchange column chromatography by monitoring the chemotactic activity of ST2 cells and identified Emilin2 by LC-MS/MS analysis. Then we provide evidence that macrophages regulate the migration of bone marrow stromal cells through the production of Emilin2.

研究分野：代謝学

キーワード：骨代謝 マクロファージ 骨リモデリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨リモデリングは、破骨細胞の活性化により始まり、逆転相を経て、骨芽細胞により一定量の骨基質が形成され、静止相で終結する一連のサイクルにより、古い骨が新しい骨へと置き換わる。その中でも破骨細胞による骨吸収から骨芽細胞による骨形成へのカップリング(共役)機構は骨の恒常性維持に必須な仕組みの一つであり、近年その実態が少しずつ明らかにされつつある。20世紀末に骨芽細胞が分泌する M-CSF と RANKL が破骨細胞の増殖・分化に必須であることが明らかとなり、今世紀には逆に破骨細胞による骨芽細胞の分化制御機構が注目されるようになった。

破骨細胞は貪食細胞であるマクロファージから分化・成熟するが、骨代謝におけるマクロファージ自身の機能については不明な点が多い。骨リモデリングサイクルの中で骨吸収から骨形成への逆転相には必ずマクロファージが出現することは古くから知られているが、その詳細な意義やカップリング機構におけるマクロファージの機能については全くわかっていない。生体におけるマクロファージの主要な機能は、障害した細胞や異物を貪食し生体内から取り除き、異物を細胞膜表面に提示することにより免疫機能を高める働きを有するが、この細胞は各組織において可塑性に多種多様に機能分化することが知られている。すなわち、LPS や IFN などの刺激を受け炎症性サイトカインや活性酸素、活性窒素を産生し、Th1 型の免疫応答を誘導する M1 マクロファージ(Classically activated macrophage)、IL-4 や IL-13 による刺激を受け組織修復、血管新生や腫瘍増殖の促進に働く M2 マクロファージ(Wound-healing macrophage)が知られている。さらに近年、各組織に様々な性質や起源(卵黄嚢、胎児肝、骨髄由来など)を持つ組織常在型マクロファージの存在が明らかとなりつつあるが、マクロファージの種類と機能の多様性については不明な点も多く残されている [1]。

骨組織におけるマクロファージの機能解析は主に MAFIA (Macrophage Fas-Induced Apoptosis) マウスを用いて試みられている。すなわち MAFIA マウスは c-fms のプロモーターを利用し、Fas 受容体の三量体形成を誘導する B/B Homodimerizer を投与することで、可逆的にこれらの細胞のアポトーシスを誘導することができ、このマウスで骨髄中のマクロファージを死滅させると骨芽細胞が減少することから骨形成におけるマクロファージの重要性が示唆された [2, 3]。しかしながら、このシステムではマクロファージのみならず破骨細胞も障害されることから、骨組織におけるマクロファージ本来の機能については依然として不明である。

2. 研究の目的

本研究では、マクロファージによる骨代謝制御機構を解明することを企図する。マクロファージによる骨代謝制御機構は破骨細胞の前駆細胞としての役割とマクロファージ自身の役割とが複雑に絡まり合っていることが考えられ、これらの総括的な解析によって、骨粗鬆症・関節リウマチ・癌の骨転移などの破骨細胞による骨吸収が増悪の要因となる疾患の病態解明や、新規の治療法の開発の糸口となる可能性がある。

3. 研究の方法

研究代表者は逆転相に現れるマクロファージが破骨細胞による骨表面の清掃を担うだけでなく、吸収された骨表面に骨芽細胞を引き寄せさせる役割を担うのではないかと考え、マクロファージの培養上清を用いて骨芽細胞の遊走活性を調べた。その結果、マウス骨髄マクロファージの培養上清中に骨芽細胞の遊走を促進する活性を見出すことに成功した。そこで、骨髄マクロファージの培養上清から骨芽細胞の遊走を促進する活性画分をカラムクロマトグラフィーにより分離・精製し、質量分析機(マススペクトル解析)を用いて因子の同定を行った。候補因子をレトロウイルスベクターで骨芽細胞に過剰発現し、候補因子の骨芽細胞への影響を解析した。骨芽細胞の起源である間葉系幹細胞は脂肪細胞にも分化することが知られている。候補因子をレトロウイルスベクターで脂肪前駆細胞株 3T3-L1 細胞に過剰発現し、脂肪細胞分化に対する影響を解析した。マクロファージは可塑的に機能分化することが知られている。どのマクロファージの極性で候補因子の発現が高いのかを検索した。その結果、創傷治癒を制御する M2 マクロファージで候補因子の発現が高いことから、皮質骨欠損モデルにおける発現解析を行った。また、近年マクロファージが発現する膜タンパク質 LRP1 の一部が分泌され、骨折治癒を制御することが報告されたことから [4]、short hairpin RNA を用いてマクロファージ細胞株 RAW264 細胞で Lrp1 発現をノックダウンし、その影響を解析した。ヘッジホッグシグナルがマクロファージの動態及び破骨細胞への分化に関与することが報告されたことから [5]、ヘッジホッグシグナル阻害剤とヘッジホッグシグナルトランスドューサーである Smoothed (Smo) を LysM-Cre 制御で欠損させたマウスの解析を行った。

4. 研究成果

研究代表者は、骨髄由来マクロファージを大量培養して得られた 500 mL の培養上清から陰イオン交換カラムを用いて骨髄間質細胞株 ST2 の走化性を指標に活性成分を分離・濃縮した。活性画分を Sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)で展開し銀染色により得られたバンドを液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS/MS)で解析し、分泌性タンパクである Elastin microfibril interface 2 (Emilin2) を検出した。Emilin2 は、補体 C1q ファミリーに属し、マクロファージで発現することが報告されていたが、骨代謝にお

る機能は不明であった。そこで、Emilin2がST2の走化性を刺激するかどうかを確かめるために、マウス線維芽細胞株 Ltk-細胞で Emilin2 を強発現させたところ、培養上清中に ST2 の走化性を検出した。また、リコンビナント Emilin2 も同様に ST2 の走化性を刺激することがわかった。次に、Emilin2 が骨芽細胞の分化を制御するかどうかを確かめるために、レトロウイルスベクターを用いて新生仔マウス頭蓋冠由来骨芽細胞で Emilin2 を強発現させたところ、Runx2 やオステオカルシンなどの骨芽細胞マーカー遺伝子の発現上昇、及び石灰化の亢進が認められた。さらに、前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞で Emilin2 を強発現させたところ、aP2 や Adiponectin などの脂肪細胞マーカー遺伝子の発現抑制、及び脂肪滴形成が抑制されることがわかった。以上のことから、マクロファージは Emilin2 を産生・分泌し、間質細胞の走化性と骨芽細胞への分化を刺激するとともに脂肪細胞分化を抑制することが示唆された。また、マクロファージはいくつかのサブタイプに機能分化することが知られている。どのサブタイプのマクロファージが Emilin2 を発現するかを検索するために、骨髄由来マクロファージにインターフェロンガンマ (IFN γ)、インターロイキン 4 (IL-4)、インターロイキン 10 (IL-10) を添加したところ、IL-4 で Emilin2 の発現が増加した。すなわち組織修復型マクロファージ (M2 マクロファージ) で高発現することがわかった。そこで、マウス大腿骨皮質骨欠損モデルを作製したところ、Emilin2 は M2 マクロファージマーカー遺伝子 Arg1 と TGF β とともに一過性に発現上昇したことから、骨折の治癒過程に関与している可能性が示唆された (論文準備中)。

他のグループから骨折の治癒過程をマクロファージが産生する可溶性 LRP1 が制御することが報告されたことから [4]、short hairpin RNA を用いてマクロファージ細胞株 RAW264 細胞で LRP1 発現を安定的にノックダウンした細胞株を確立した。これら LRP1 ノックダウン RAW264 細胞は RANKL 誘導性の破骨細胞形成が抑制された。破骨細胞分化のマスターランスクリプション因子として知られている Nfatc1 の発現が有意に低下した。マクロファージの増殖を制御する M-CSF の受容体である Csf1r の発現低下による細胞増殖の抑制が認められた。マクロファージ/破骨細胞による骨芽細胞分化制御を検討するため、これら細胞の培養上清を ST2 細胞に添加したところ、予想に反してコントロール RAW264 細胞の培養上清は ST2 のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を有意に抑制した。一方で LRP1 ノックダウン細胞の培養上清はこの ALP 活性の抑制効果が認められなかった。以上から LRP1 がマクロファージの破骨細胞への分化を制御するとともに、マクロファージ/破骨細胞と骨芽細胞との相互作用を制御している可能性を示した [6]。

ヘッジホッグシグナルは器官形成や細胞の運命決定に関わり、骨代謝領域においては長管骨の内軟骨性骨化を誘導することで知られているが、破骨細胞による骨吸収制御については不明な点が多い。研究代表者は、骨髄由来マクロファージを用いた *in vitro* での破骨細胞形成系にそれぞれターゲットの異なるヘッジホッグシグナル阻害剤、シクロパミン (Smo 阻害剤)、GANT-58 (Gli1 阻害剤)、GANT-61 (Gli1/2 阻害剤) を添加したところ、すべての阻害剤で破骨細胞形成が低下した。また、破骨細胞分化初期 (RANKL 添加 0-2 日)、分化後期 (RANKL 添加 2-4 日) にそれぞれの阻害剤を添加したところ、シクロパミンと GANT-61 は初期、後期ともに、GANT-58 は初期の添加のみ破骨細胞形成が抑制されたことから、ヘッジホッグシグナルの転写アクチベーター Gli1 は破骨細胞分化初期にのみ活性化が必要であることが明らかとなった。マウス生体内でのマクロファージ/破骨細胞系におけるヘッジホッグシグナルの機能を解析するために、Smo floxed マウスと LysM-Cre マウスを掛け合わせ、マクロファージ/破骨細胞特異的 Smo 欠損マウスを作製した。驚くべきことに、マイクロ CT 解析の結果、野生型マウスの海綿骨量は 1 年齢、1.5 年齢と加齢に伴い顕著に低下したのに対し、Smo 欠損マウスではほとんど低下しなかった。以上のことから、マクロファージ/破骨細胞系におけるヘッジホッグシグナルが加齢性の骨量減少に深く関与すると結論づけた [7]。しかしながら、加齢性の海綿骨量の低下に対して抵抗性を示すという現象だけを確認しており、今後、この現象のメカニズムの解明が必要である。

< 引用文献 >

- [1] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nat Rev Immunol* 8(12) (2008) 958-69.
- [2] I.G. Winkler, N.A. Sims, A.R. Pettit, V. Barbier, B. Nowlan, F. Helwani, I.J. Poulton, N. van Rooijen, K.A. Alexander, L.J. Raggatt, J.P. Lévesque, Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs, *Blood* 116(23) (2010) 4815-28.
- [3] S.W. Cho, F.N. Soki, A.J. Koh, M.R. Eber, P. Entezami, S.I. Park, N. van Rooijen, L.K. McCauley, Osteal macrophages support physiologic skeletal remodeling and anabolic actions of parathyroid hormone in bone, *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(4) (2014) 1545-50.

- [4] L. Vi, G.S. Baht, E.J. Soderblom, H. Whetstone, Q. Wei, B. Furman, V. Puvindran, P. Nadesan, M. Foster, R. Poon, J.P. White, Y. Yahara, A. Ng, T. Barrientos, M. Grynopas, M.A. Mosely, B.A. Alman, Macrophage cells secrete factors including LRP1 that orchestrate the rejuvenation of bone repair in mice, *Nat Commun* 9(1) (2018) 5191.
- [5] T. Shimo, K. Matsumoto, K. Takabatake, E. Aoyama, Y. Takebe, S. Ibaragi, T. Okui, N. Kurio, H. Takada, K. Obata, P. Pang, M. Iwamoto, H. Nagatsuka, A. Sasaki, The Role of Sonic Hedgehog Signaling in Osteoclastogenesis and Jaw Bone Destruction, *PLoS One* 11(3) (2016) e0151731.
- [6] Y. Kohara, R. Haraguchi, R. Kitazawa, S. Kitazawa, Knockdown of Lrp1 in RAW264 cells inhibits osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast interactions in vitro, *Biochem Biophys Res Commun* (2020).
- [7] Y. Kohara, R. Haraguchi, R. Kitazawa, Y. Imai, S. Kitazawa, Hedgehog Inhibitors Suppress Osteoclastogenesis in In Vitro Cultures, and Deletion of, *Int J Mol Sci* 21(8) (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Kohara Y(責任共著者), Haraguchi R, Kitazawa R, Imai Y, Kitazawa S. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Hedgehog inhibitors suppress osteoclastogenesis in in vitro cultures, and deletion of Smo in macrophage/osteoclast lineage prevents age-related bone loss. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci. | 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) 10.3390/ijms21082745. | 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kohara Y(責任著者), Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S. | 4. 巻 523 |
| 2. 論文標題 Knockdown of Lrp1 in RAW264 cells inhibits osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast interactions in vitro. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun. | 6. 最初と最後の頁 961-965 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.065. | 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 Kazuhiko Matsuoka, Yukihiro Kohara, Yoshinori Naoe, Atsushi Watanabe, Masako Ito, Kyoji Ikeda, Sunao Takeshita | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 WAI1F1 Is a Cell-Surface CTHRC1 Binding Protein Coupling Bone Resorption and Formation | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Bone Miner Res. | 6. 最初と最後の頁 1500-1512 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.3436. | 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 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 小原幸弘, 原口竜摩, 北澤理子, 北澤理子, 北澤荘平 |
| 2. 発表標題 ヘッジホッグシグナルトランスデューサーSmoothenedの阻害は破骨細胞形成を抑制する |
| 3. 学会等名 日本組織細胞化学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小原 幸弘, 原口 竜摩, 北澤 理子, 北澤 荘平 |
| 2. 発表標題 ヘッジホッグシグナル阻害剤であるCyclopamineは破骨細胞形成を抑制する |
| 3. 学会等名 日本骨代謝学会学 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yukihiro Kohara, Atsuchi Watanabe, Noboru Ogiso, Sunao Takeshita |
| 2. 発表標題 Macrophage-secreted Emilin2 Stimulates Chemotaxis and Differentiation in Stromal/Osteoblastic Cells |
| 3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yukihiro Kohara, Kazuhiko Matsuoka, Atsushi Watanabe, Masako Ito, Kyoji Ikeda, Sunao Takeshita |
| 2. 発表標題 Wai1 on osteoblasts functions as a receptor for osteoclast-derived Cthrc1 in bone remodeling |
| 3. 学会等名 Protein Island Matsuyama 2018 International Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yukihiro Kohara, Kazuhiko Matsuoka, Masako Ito, Kyoji Ikeda, Sunao Takeshita |
| 2. 発表標題 Osteoclast-secreted Cthrc1 Regulates Bone Remodeling through Wai1, a Receptor on Stromal/Osteoblastic Cells |
| 3. 学会等名 The 39th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mneral Research 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小原幸弘、松岡和彦、直江吉則、渡邊淳、伊東昌子、池田恭治、竹下淳 |
| 2. 発表標題 Cthrc1はWaif1を介して骨カップリング機構を制御する |
| 3. 学会等名 日本骨代謝学会 The 2nd Skeletal Science Retreat |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yukihiro Kohara, Kazuhiko Matsuoka, Atsushi Watanabe, Masako Ito, Kyoji Ikeda, Sunao Takeshita |
| 2. 発表標題 Waif1 on osteoblasts regulates bone remodeling as a receptor for osteoclast-derived Cthrc1 |
| 3. 学会等名 第10回NAGOYAグローバルリトリート |
| 4. 発表年 2018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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|