

令和元年6月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19695

研究課題名(和文)ヒト破骨細胞学

研究課題名(英文)Human osteoclast biology

研究代表者

林 幹人(Hayashi, Mikihiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50581914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生命科学はマウスを含むモデル動物から非常に多くの知見を得てきたが、マウスで研究された治療標的がヒトにおいては効果が確認できないことも多く、重要なヒト特異的遺伝子を見落としている可能性がある。本研究ではヒト骨構成細胞における遺伝子発現解析・プロファイリングにより、ヒト特異的機能未知遺伝子を絞り込み、マウスには存在しない因子Xを発見した。このXは液性因子で、その標的分子Yはヒトでもマウスでも高い相同性で発現する破骨細胞分化促進性因子であり、XはYの機能を特異的に抑制することで破骨細胞分化を著明に抑制することを見出した。すなわち、Xはヒト破骨細胞分化を特徴づける因子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、骨代謝学領域に限らず、マウスで同定・開発された治療標的の多くがヒトの疾患において効果が確認されない事実が問題視されている。骨生物学領域のほとんどの研究でもマウス細胞が用いられており、骨構成細胞のヒトとマウスの明らかな違いから、重要なヒト遺伝子を見落としている可能性が示唆されていた。

本研究で構築したヒト骨構成細胞遺伝子発現プロファイリングにより、ヒト特異的機能未知遺伝子が解明され、ヒト骨構成細胞特異的な分子メカニズムの解明につながる可能性がある。さらに、より確実な治療戦略への道筋となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Although much knowledge has been obtained from animal models, therapeutic targets studied in mice often fail to confirm their effects in humans. Therefore, it is possible that we have overlooked an important part of human-specific genes. In this study, we performed gene expression analysis of human bone cells to examine specific functional genes and identified the human-specific factor X. X is a soluble factor, and its target molecule Y has the ability to promote osteoclast differentiation both in human and mouse cells. We found that X significantly suppresses osteoclast differentiation by specifically suppressing the function of Y. Thus, X may be a factor characterizing human osteoclast differentiation.

研究分野：骨生物学

キーワード：破骨細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々人類は実験用マウスモデルから非常に多くの知見を得てきたが、マウスとヒトでは遺伝学的相違、環境要因の差異、進化的な距離の遠さなどから、根本的に重大な点を見落としている可能性があるのも事実である。また近年、骨代謝学領域に限らず、マウスで効果が確認された治療ターゲットの多くが、ヒトの疾患においては効果が見られなかったという報告が相次いでおり、広く問題視されているのが現状である。破骨細胞研究においては、*in vitro* で分化させたマウス破骨細胞とヒト破骨細胞では明らかな差異があることを確認されており、その遺伝子発現制御機構や細胞分化機構等は大いに異なっていることが予想されるにも関わらず、網羅的解析手段が広く一般化した今日においても、ヒト破骨細胞分化過程の網羅的解析はほとんど行われて来なかった。

申請者は NFATc1 の破骨細胞特異的コンディショナル欠損マウス(未発表データ)を作製し、当該マウスにおいては、歯牙萌出の欠損など非常に重篤な大理石骨病様の病態を呈することを確認している。さらに、これらのマウスより得られた細胞を用い、破骨細胞分化過程における遺伝子発現変化の挙動を網羅的に解析したところ、現在までに全く機能未知で NFATc1 によって転写制御を受けていると考えられる候補遺伝子が多数同定された。しかしながら、それらの中にはヒトには存在しない遺伝子が含まれていたり、複数の遺伝子発現を破骨細胞においてノックダウンしても、遺伝子発現が十分に低下しているにも関わらず、破骨細胞分化における機能がみとめられないことが確認された。すなわち、マウス破骨細胞だけを用いて新規に重要因子を発見・研究するのは困難な状況下にあるということが考えられる。また、後述の通り、我々は偶然にもヒト特異的遺伝子 X を発見・機能同定しており、最終的な目標地点がヒト疾患治療応用であるにも関わらず、実験材料にマウスを用いてきたことが足枷となっていたことも示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究ではこれまでマウス細胞のみを用いて行われてきた破骨細胞分化解析をヒト細胞に展開・発展させ、ヒト破骨細胞の網羅的解析のプロファイリングを遂行することによって未知の遺伝子を絞り込み、その分子機能をヒト破骨前駆細胞株の構築、ヒト遺伝子ノックイン/コンディショナル欠損マウス作製を通じて解析することを目的とした。

本研究では我々がこれまでに用いてきた技術、特に RNA-Seq や iTRAQ 法等による網羅的解析によって、ヒト破骨細胞分化過程における網羅的な遺伝子・タンパク質発現データベースの構築・プロファイリングとヒト特異的遺伝子の絞り込み、それらの *in vitro* における機能、ノックイン/コンディショナルマウス作製と破骨細胞特異的欠損マウスの解析を通じて *in vivo* で機能解析を試みた。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の3点の研究計画を実施した。

#### (1) ヒト破骨細胞分化過程における遺伝子・タンパク質発現の網羅的解析と絞り込み

ヒト細胞を研究材料として使用するにあたり、倫理的問題点の観点から、本研究課題においては市販のヒト破骨前駆細胞を使用する。複数のドナー由来ロットを購入し、同一の条件で破骨細胞分化を行い、それぞれの分化段階における遺伝子・タンパク質の網羅的発現解析を行い、これまで本研究代表者らが蓄積してきたマウスの網羅的発現データベースとの比較検討を行ったうえでヒト特異的遺伝子の絞り込みを行う。

#### (2) 分子機能解析のためのヒト破骨前駆細胞株の樹立

現在、*in vitro* 解析に用いられる破骨細胞はマウス骨髄単核細胞由来かマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 由来がほとんどである。稀にヒト末梢血単核球や iPS 細胞由来の破骨前駆細胞が用いられるが、倫理的な観点からヒト破骨細胞研究を推進するためには不死化した細胞株が必要であると考えられる。そこで申請者らは、SV40 large T 抗原、もしくは hTERT を強制発現させることで細胞を不死化し、さらにそれらの細胞が破骨細胞分化能を有するかを検討した上でクローン化することを試みた。

#### (3) ヒト遺伝子のノックイン/コンディショナル欠損マウスの作製

上記(1)、(2)により同定したヒト特異的遺伝子の生体レベルでの骨リモデリングにおける機能を解析するためには、ヒト試料を用いた実験が必要であるが、倫理的制約から生体レベルでの解析にはマウスを使用する。

### 4. 研究成果

現在までに、複数ロット由来のヒト破骨細胞分化過程における遺伝子発現解析・プロファイリングなどを行い、これまで申請者らが蓄積してきたマウスの網羅的発現データベースとの比較検討等によって、マウスには存在せずヒト特異的に存在する遺伝子 X を発見した。この遺伝子 X 由来のタンパク質は液性因子であり、興味深いことに、この遺伝子の全長配列はマウスだけでなく、ヒト上科に属する霊長類にのみ保存されているということがわかった。すなわち、この遺伝子 X は進化の過程でヒト上科が獲得した遺伝子であると考えられる。さらに、因子 X の標的分子 Y はヒトでもマウスでも破骨細胞分化促進機能を有する因子であり、X は Y の機能を特異的に阻害することにより破骨細胞分化を著明に抑制することを見出した。また、遺伝子

X がコードする液性因子はマウス細胞にも *in vitro* で効果を有していたことから、X のリコンビナントタンパク質を作製しマウスに投与することによって、その効果を検討したところ、予想通り *in vivo* でも破骨細胞分化抑制効果を有することがわかった。そこで、現在この遺伝子 X を LoxP 配列で挟んだ断片をマウスゲノム上にノックインすることによる効果を検討し、さらにそれらのマウスを Cre 発現マウスと交配することで生体レベルでの遺伝子獲得・欠損による破骨細胞分化・骨代謝解析を行うことを予定している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Mikihito Hayashi, Tomoki Nakashima, Noriko Yoshimura, Kazuo Okamoto, Sakae Tanaka, Hiroshi Takayanagi. Autoregulation of Osteocyte Sema3A Orchestrates Estrogen Action and Counteracts Bone Aging. *Cell Metabolism*, 29, 627–637 (2019) doi: 10.1016/j.cmet.2018.12.021 (査読あり)
2. Yusoon Kim, Mikihito Hayashi, Takehito Ono, Tetsuya Yoda, Hiroshi Takayanagi, Tomoki Nakashima. Suppression of hematopoietic cell kinase ameliorates the bone destruction associated with inflammation. *Modern Rheumatology*, In press (2019) doi: 10.1080/14397595.2018.1553266 (査読あり)
3. Ayumi Shoji-Matsunaga, Takehito Ono, Mikihito Hayashi, Hiroshi Takayanagi, Keiji Moriyama, Tomoki Nakashima. Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement via RANKL expression. *Scientific Reports* 7, 8753 (2017) doi: 10.1038/s41598-017-09326-7 (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 林幹人、中島友紀：破骨細胞分化と骨芽細胞分化を正に制御し骨代謝回転を決定づける新規因子の同定. 第 4 回日本骨免疫学会、2018 年
2. Mikihito Hayashi, Tomoki Nakashima, Hiroshi Takayanagi : Autoregulation of osteocyte through estrogen-miRNA-Sema3A-Nrp1 axis. ASBMR 2017 Annual Meeting、2017 年
3. 林幹人、中島友紀、高柳広：骨細胞での Estrogen-miRNA-Sema3A 軸による自己調節を介した骨代謝制御. 第 3 回日本骨免疫学会、2017 年
4. 林幹人、中島友紀、高柳広：骨細胞由来 Sema3A による骨代謝制御. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会、2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6．研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。