

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18514

研究課題名（和文）マクロファージが産生するEmilin2の骨代謝における機能解明と臨床応用の可能性

研究課題名（英文）Functional elucidation of Emilin2 secreted by macrophages in bone metabolism and its potential for clinical application

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々の体を細菌などの病原微生物から守ってくれるマクロファージという免疫細胞が、微生物から守ってくれるだけでなく、骨が折れたときに骨の再生自体もサポートしてくれることが長年わかってきたが、そのメカニズムについて不明であった。研究代表者はマクロファージが骨を再生してくれる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

骨は、破骨細胞によって常に吸収され、骨芽細胞によって再生され、生理的条件下で新しい骨を作っている。骨折後の骨再生も通常は速やかに行われるが、骨折患者の約5～10%には、遅発性の癒合や非癒合が生じることがある。このような骨修復の細胞・分子メカニズムを解明することは、骨再生医療の発展に大きく寄与すると考えられている。マクロファージも骨折後の骨再生に関与していると提唱されているが、そのメカニズムは不明であった。今回、研究代表者はマクロファージによる骨再生メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：It has long been known that macrophages, immune cells that protect our bodies from bacteria and other pathogenic microbes, not only protect us from microbes but also support bone regeneration itself when bones are broken. The principal investigator has revealed one aspect of the mechanism by which macrophages regenerate bone.

研究分野：分子生物学

キーワード：マクロファージ 骨再生 RNA-seq 老化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、マクロファージは骨芽細胞による骨形成をサポートする役割があると考えられている。Macrophage Fas-Induced Apoptosis (MAFIA)マウスは CSF1R 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 CSF1R を発現する細胞、すなわちマクロファージ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形成マーカーであるオステオカルシン陽性の成熟骨芽細胞が顕著に減少することが報告された [1]。また、破骨細胞を死滅させるビスフォスフォネート製剤の一種であるクロドロネートをリポソーム化することでマクロファージでの取り込みを促進させたマクロファージ枯渇薬クロドロネート・リポソームの投与や、骨髄中の造血幹細胞に作用し、その増殖分化と末梢血への動員を促す granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)の投与によっても同様に骨髄中のマクロファージが除去され、骨形成の低下が引き起こされる [2, 3]。したがって、マクロファージは骨芽細胞による骨形成を支持することで骨代謝を制御していることが示唆されるが、そのメカニズムについては不明である。

研究代表者はマクロファージが産生・分泌する分子が骨髄間質細胞/未成熟骨芽細胞の遊走を刺激することで骨リモデリングを制御し、骨形成を維持しているのではないかと考え、Boyden Chamber 法によって、マウス骨髄由来マクロファージの培養上清中に骨髄間質細胞株 ST2 の遊走活性を見出すことに成功し、その原因分子として Elastin microfibril interface located protein 2 (Emilin2)を同定した。Emilin2 は約 120kDa の分泌性タンパク質であり、当研究室で骨吸収から骨形成へのカップリング因子として同定・実証した Collagen triple helix repeat containing 1 [4]と同じ C1q ファミリーに属し、血管形成 [5, 6]、血小板凝集 [7]、心臓発生 [8] に関与することが報告されているが、Emilin2 の骨代謝における機能については全くの不明である。研究代表者は Emilin2 の骨代謝における機能を解明し、骨粗鬆症の治療法の開発や骨再生医療への応用を目指している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は Emilin2 の骨代謝における機能を解明し、骨粗鬆症の治療あるいは骨再生医療への応用の可能性を探ることである。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、骨の脆弱性が増大し、骨折の危険性が増大する疾患と定義されており、患者数は、我が国では約 1,300 万人 (総人口の 10%)、欧州連合 (EU) で約 2,800 万人 (6%)、アメリカで約 3,400 万人 (11%) と推測され、患者の QOL を著しく損なうことから世界的にも骨粗鬆症は大きな社会問題となっている。現行では骨粗鬆症の治療はビスフォスフォネート製剤が第一選択薬であり、骨吸収を抑制することで骨折のリスクを軽減することが可能であるが、ビスフォスフォネート製剤の副作用として骨形成の抑制による骨質の低下や顎骨壊死の発症などが認められることから、副作用の少ない新しい治療薬の開発が求められている。研究代表者は既に、骨芽細胞に Emilin2 をレトロウイルスで強発現させると 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および石灰化の亢進が起こることを確認している。また、骨を破壊する破骨細胞の前駆細胞である骨髄マクロファージに、同様に Emilin2 を強発現させると破骨細胞への分化が抑制された。したがって、Emilin2 の投与は骨形成を刺激するとともに、骨吸収を抑制し、骨粗鬆症の病態を回復させる可能性が期待される。

事故による開放骨折時や骨腫瘍の切除時などに生じる骨欠損の治療には、骨芽細胞を集積させ、新たな骨の再生を促すことが必要である。研究代表者は Emilin2 が骨芽細胞のプロジェクターである骨髄間質細胞の走化性を刺激することを見出している。したがって、骨欠損部位に Emilin2 を局所投与することで欠損部位へと骨髄間質細胞の遊走を刺激し、骨欠損部位の再生を促す可能性が有る。

以上のことから、本研究課題はマクロファージが産生する新規の骨代謝制御因子である Emilin2 の生体内での機能解明と臨床応用の可能性を提示することを目指した。

### 3. 研究の方法

研究代表者は創傷治癒を制御する M2 マクロファージで Emilin2 の発現が高いことから、マウス大腿骨皮質骨欠損モデルを用いた解析を行った。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 [9]、shRNA 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 [10]、ヘッジホッグシグナル阻害剤と LysM-Cre 制御化でヘッジホッグシグナルトランスドューサーである Smoothed (Smo) を欠損させたマウスの解析を行った。

### 4. 研究成果

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。Emilin2 を高発現するサブタイプを検索するために、骨髄由来マクロファージにインターフェロンガンマ (IFN  $\gamma$ )、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) が Emilin2 を高発現することがわかった。そこで、骨再生中におけるマクロファージの機能を解析するため、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

一カー遺伝子 Arg1 と TGF beta 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。また、骨再生時にマクロファージを排除することを目的にクロドロネートリポソームを投与すると、マイクロ CT 解析では再生骨量が有意に低下することが明らかとなった。このマウスでは骨再生部の血管新生と骨形成をカップリングする H 型血管の新生が阻害されることを明らかにした。さらに、RNA-seq 解析により、マクロファージが分泌する “血管新生” と “創傷治癒” を媒介する因子の遺伝子として、Tgfb1 (TGFB1 をコードする)、Plau (uPA をコードする)、Tgfb1 (TGF- $\beta$ 1 をコードする) を同定した。これらの mRNA は、qRT-PCR により、骨組織中の細胞の中でも骨髄由来のマクロファージに高発現していることがわかった。最後に、uPA 阻害剤 (Amiloride Hydrochloride) や TGF- $\beta$  受容体 I、受容体 II 阻害剤 (LY-364947) を投与すると、損傷後の骨再生が損なわれることを明らかにし、骨再生における uPA と TGF- $\beta$ 1 の重要性を確認した。今回の結果は、マクロファージを介した新しい骨再生のメカニズムを提唱したものである [11]。また、マクロファージが血管新生を制御していたことに関連して、骨形成と血管新生に深く関与する NOTCH シグナリングとの関連性も検討している [12]。

他の研究グループから、マクロファージが産生する可溶性 LRP1 が骨再生を制御することが報告されたことから [9]、shRNA レンチウイルスベクター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 (KD) した細胞株を作成した。LRP1 KD 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。マクロファージの生存・増殖に必須である 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、予想外にコントロール 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 KD 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 [13]。

研究代表者は、骨髄マクロファージを用いた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、LysM-Cre マウスと Smo floxed マウスをかけ合わせ、破骨細胞特異的 Smo KO マウスを作製した。興味深いことに、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、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 [14]。

#### < 引用文献 >

- [1] M.K. Chang, L.J. Raggatt, K.A. Alexander, J.S. Kuliwaba, N.L. Fazzalari, K. Schroder, E.R. Maylin, V.M. Ripoll, D.A. Hume, A.R. Pettit, Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo, *J Immunol* 181(2) (2008) 1232-44.
- [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. Levesque, 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] S. Takeshita, T. Fumoto, K. Matsuoka, K.A. Park, H. Aburatani, S. Kato, M. Ito, K. Ikeda, Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation, *J Clin Invest* 123(9) (2013) 3914-24.
- [5] M. Mongiat, S. Marastoni, G. Ligresti, E. Lorenzon, M. Schiappacassi, R. Perris, S. Frustaci, A. Colombatti, The extracellular matrix glycoprotein elastin microfibril interface

- located protein 2: a dual role in the tumor microenvironment, *Neoplasia* 12(4) (2010) 294-304.
- [6] A. Paulitti, E. Andreuzzi, D. Bizzotto, R. Pellicani, G. Tarticchio, S. Marastoni, C. Pastrello, I. Jurisica, G. Ligresti, F. Bucciotti, R. Doliana, R. Colladel, P. Braghetta, E. Poletto, A. Di Silvestre, G. Bressan, A. Colombatti, P. Bonaldo, M. Mongiat, The ablation of the matricellular protein EMILIN2 causes defective vascularization due to impaired EGFR-dependent IL-8 production affecting tumor growth, *Oncogene* 37(25) (2018) 3399-3414.
- [7] M. Huang, D. Sannaningaiah, N. Zhao, Y. Gong, J. Grondolsky, J. Hoover-Plow, EMILIN2 regulates platelet activation, thrombus formation, and clot retraction, *PLoS One* 10(2) (2015) e0115284.
- [8] A. Guggilam, D. Sannaningaiah, Y. Gong, J. Grondolsky, Cardiac Malformations in EMILIN2 Deficient Mice, *International Journal of Cardiovascular Research* 5(5) (2016).
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Y. Kohara, R. Kitazawa, R. Haraguchi, Y. Imai, S. Kitazawa, Macrophages are requisite for angiogenesis of type H vessels during bone regeneration in mice, *Bone* 154 (2022) 116200.
- [12] Y. Kohara, S. Kitazawa, R. Kitazawa, R. Haraguchi, K. Arai, H. Amasaki, S. Soeta, Localization of DLL1- and NICD-positive osteoblasts in cortical bone during postnatal growth in rats, *Biochem Biophys Res Commun* 529(2) (2020) 186-190.
- [13] 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* 523(4) (2020) 961-965.
- [14] Y. Kohara, R. Haraguchi, R. Kitazawa, Y. Imai, S. Kitazawa, Hedgehog Inhibitors Suppress Osteoclastogenesis in In Vitro Cultures, and Deletion of Smo in Macrophage/Osteoclast Lineage Prevents Age-Related Bone Loss, *Int J Mol Sci* 21(8) (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yukihiro, Kitazawa Sohei, Kitazawa Riko, Haraguchi Ryuma, Arai Kiyotaka, Amasaki Hajime, Soeta Satoshi	4. 巻 529
2. 論文標題 Localization of DLL1- and NICD-positive osteoblasts in cortical bone during postnatal growth in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 186 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.039	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 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 on line journal
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 Kohara Y (責任共著者), Kitazawa R, Haraguchi R, Imai Y, Kitazawa S.	4. 巻 154
2. 論文標題 Macrophages are requisite for angiogenesis of type H vessels during bone regeneration in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 116200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116200.	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9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、北澤荘平
2. 発表標題 肝臓抽出液からの新規破骨細胞阻害因子の同定
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020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 骨以外の臓器における破骨細胞形成に対する負の制御機構の解明
3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小原幸弘、原口竜摩、今井祐記、北澤理子、北澤荘平
2. 発表標題 肝臓抽出液から分離・同定した新規破骨細胞形成阻害因子Calreticulinの機能解明
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukihiro Kohara, Ryuma Haraguchi, Riko Kitazawa, Sohei Kitazawa
2. 発表標題 Role of Lrp1 in RAW264 cells on osteoclast differentiation
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

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 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukihiro Kohara, Riko Kitazawa, Ryuma Haraguchi, Yuuki Imai, Sohei Kitazawa
2. 発表標題 Recombinant Calreticulin inhibits osteoclast differentiation via suppression of JNK pathway
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukihiro Kohara, Riko Kitazawa, Ryuma Haraguchi, Yuuki Imai, Sohei Kitazawa
2. 発表標題 Macrophages are requisite for angiogenesis of type H vessels during bone regeneration in mice
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小原幸弘、北澤理子、原口竜摩、今井祐記、北澤荘平
2. 発表標題 Calreticulinは破骨細胞分化を直接抑制するだけでなく、骨細胞でのSclerostin発現を抑制する。
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------