

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18943

研究課題名（和文）骨恒常性を制御する新規間葉系細胞とその機能分子の同定

研究課題名（英文）Identification of novel mesenchymal cells regulating bone homeostasis

研究代表者

塚崎 雅之（Tsukasaki, Masayuki）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任助教

研究者番号：20829527

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）：新たな骨代謝制御因子を探索する過程で、骨組織に高発現するタンパク質翻訳後修飾酵素Hmtfを見出した。Hmtfのfloxマウスを作成し、骨代謝システムにおけるHmtfの機能を解析した。現在までに、Hmtfが骨膜に存在する骨格幹細胞の維持に必須の因子であることを見出している。骨代謝制御の中心分子であるOPGのfloxマウスを作成し、OPGは骨では骨芽細胞、腸では腸管M細胞、胸腺では胸腺髄質上皮細胞が主な産生源であることを明らかにした。骨吸収の実行役である破骨細胞の分化経路をシングルセルRNA-seqにより解析し、破骨細胞の運命決定機構を担う生物学的イベント及び遺伝子発現の変動を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において我々は、骨を保護するタンパクを産生する細胞の同定と、骨を破壊する細胞が作られる仕組みの解明に成功した。骨の恒常性を制御する細胞の多様性や機能を詳細に解明することは、骨粗鬆症、関節リウマチ、歯周病、がん骨転移といった様々な骨疾患の病態理解や、新しい治療法開発につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：While exploring novel regulators of bone metabolism, we found a protein post-translational modification enzyme Hmtf, which is highly expressed in bone tissue. We have found that Hmtf is an essential factor for the maintenance of skeletal stem cells in the periosteum. We also focused on OPG, a central molecule in the regulation of bone metabolism. We generated OPG-floxed mice and found that OPG is mainly produced by osteoblasts in the bone, intestinal M cells in the intestine, and thymic medullary epithelial cells in the thymus. In addition, we analyzed the differentiation pathway of osteoclasts by using single-cell RNA-seq, and clarified the biological events that take place during the fate determination of osteoclasts.

研究分野：骨免疫学

キーワード：骨免疫 骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

世界一の長寿国である本邦において、骨粗鬆症やロコモティブ症候群といった運動器障害は健康寿命の主要な阻害要因となっており、骨恒常性の維持とその破綻機構の理解が必須である。骨は生体を支持し運動を可能とするのみならず、カルシウムやリンなどのミネラル貯蔵庫としての役割や、造血幹細胞・免疫系前駆細胞を維持し必要に応じて生体に動員する「一次リンパ組織」としての免疫機能も果たしている。骨の恒常性は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって維持されている。試験管内の実験結果に基づき、骨芽細胞は破骨細胞分化誘導因子 RANKL およびそのデコイ受容体である OPG を産生することで、破骨細胞の分化と機能発現を厳密に制御すると考えられている。しかしながら、生体内における骨保護因子 OPG の産生源は未だ不明である。また、破骨細胞分化の詳細なメカニズムに関しても未だ不明な点が多い。

骨髄内には、造血幹細胞 (HSC: hematopoietic stem cell) を支持する微小環境 (ニッチ) が存在し、間葉系前駆細胞や血管内皮細胞など様々な細胞種が HSC の制御に重要な役割を果たすことが知られている (Crane et al. *Nat Rev Immunol* 2017)。CXCL12(chemokine [C-X-C motif] ligand 12)や SCF(stem cell factor)といった造血支持因子のコンディショナルノックアウトマウスの解析や細胞系譜解析から、骨髄内の洞様毛細血管周囲に局在する CAR(CXCL12-abundant reticular)細胞やレプチン受容体 (LepR) 陽性細胞は HSC 支持能を有すると同時に、成体期における骨髄内の骨芽細胞や脂肪細胞の主要な供給源である事が示されている (Omatsu et al. *Immunity* 2010, Mizoguchi et al. *Dev Cell* 2014, Zhou et al. *Cell Stem Cell* 2014)。このように、骨髄内の海綿骨上に存在する骨芽細胞や、その由来である間葉系前駆細胞の機能や性質に関しては過去に多くの研究が為されてきた一方で、骨の外膜に存在する細胞に関しては、これまで殆ど注目されてこなかった。骨外膜における骨代謝制御は、骨の横軸成長や皮質骨の恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられる。皮質骨は末梢骨強度や骨折リスクの主要な決定因子であり、皮質骨代謝制御機構の解明は極めて重要な課題である (Skrtic et al. *Nat Med* 2014, Zabaze et al. *Lancet* 2010, Holzer et al. *J Bone Miner Res* 2009)。申請者は骨代謝の新たなメカニズムを探索する過程で、皮質骨の外側に存在する骨膜で高発現する遺伝子 Hmtf を同定した。しかしながら、骨恒常性における Hmtf の機能に関しては全く不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、1) Hmtf の骨代謝における役割の解明 2) 骨保護因子 OPG の産生源の同定 3) 破骨細胞分化機構の全容解明 を目指す。

## 3. 研究の方法

Hmtf の flox マウスを樹立し、様々な骨構成細胞特異的な Cre マウスと交配し、その表現型を解析する。OPG-flox マウスを樹立し、骨、胸腺、腸管における OPG の産生源を探索する。シングルセル解析により、破骨細胞分化過程を 1 細胞解像度で解明する。

## 4. 研究成果

Hmtf flox マウスを作成し、Hmtf の破骨細胞における機能を解析するために Hmtf f/ Cathepsin K(Ctsk)- Cre マウスを作成したところ、著名な骨量減少と、骨幅の短縮が認められた。低骨量の表現型から、Hmtf を欠損した破骨細胞は分化や機能が亢進していると仮説を立てた。しかしながら予想に反し、骨組織における破骨細胞数や、in vitro における破骨細胞分化及び機能は Hmtf f/ Ctsk-Cre マウスにおいて全く正常であった。さらに、骨髄キメラマウスの作成により、非血球系細胞で Hmtf が欠損することが、骨量減少と骨幅短縮の原因であることが明らかとなった。過去に、骨外膜で Ctsk を発現する細胞が間葉系多分化能を有し、軟骨腫瘍に関与することが報告されている (Yang et al., *Nature* 2013)。さらにごく最近、骨外膜で Ctsk を発現する細胞に間葉系前駆細胞が含まれており、膜性骨化に寄与することが示されている (Debnath et al., *Nature* 2018)。そこで Ctsk-Cre を CAG-CAT-EGFP マウスと交配し Ctsk 発現細胞を詳細に探索したところ、骨外膜の一部の間葉系細胞で Ctsk 発現が認められた。Hmtf f/ Ctsk-Cre CAG-CAT-EGFP マウスでは、骨外膜に存在する間葉系幹細胞の数が著名に減少していた。以上から、Hmtf は骨外膜幹細胞の維持に必要な遺伝子であることが明らかとなった (論文投稿中)。

また、骨代謝制御の中心機構である RANKL/RANK/OPG の中で、未だ flox マウスが存在しなかった OPG に着目し、OPG-flox マウスを作成した。OPG は骨だけでなく腸管粘膜、胸腺でも重要な役割を持つため、骨に限らず免疫組織における OPG の供給源も探索した。シングルセル解析による OPG 発現細胞の探索と、コンディショナルノックアウトマウスを用いた機能解析により、OPG は骨では骨芽細胞、腸では腸管 M 細胞、胸腺では胸腺髄質上皮細胞が主な産生源であり、局所的に作用するパラクライン因子であることが明らかとなった (Tsukasaki et al., *Cell Rep* 2020)。さらに、骨吸収の実行役である破骨細胞の分化経路をシングルセル RNA-seq により解析し、破骨細胞の運命決定機構を担う生物学的イベント及び遺伝子発現の変動を、これまでにない解像度で明らかにした (Tsukasaki et al., *Nature Metab* 2020)。

## 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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukasaki Masayuki、Takayanagi Hiroshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Osteoimmunology: evolving concepts in bone-immune interactions in health and disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Reviews Immunology	6. 最初と最後の頁 626 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41577-019-0178-8	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 Komatsu Noriko、Win Stephanie、Yan Minglu、Huynh Nam Cong-Nhat、Sawa Shinichiro、Tsukasaki Masayuki、Terashima Asuka、Pluemsakunthai Warunee、Kollias George、Nakashima Tomoki、Takayanagi Hiroshi	4. 巻 131
2. 論文標題 Plasma cells promote osteoclastogenesis and periarticular bone loss in autoimmune arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci143060	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 Tsukasaki M、Huynh NC、Okamoto K、Muro R、Terashima A、Kurikawa Y、Komatsu N、Pluemsakunthai W、Nitta T、Abe T、Kiyonari H、Okamura T、Sakai M、Matsukawa T、Matsumoto M、Kobayashi Y、Penninger JM、Takayanagi H	4. 巻 2
2. 論文標題 Stepwise cell fate decision pathways during osteoclastogenesis at single-cell resolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 1382 ~ 1390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-020-00318-y	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 Tsukasaki Masayuki	4. 巻 39
2. 論文標題 RANKL and osteoimmunology in periodontitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 82 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01165-3	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 Tsukasaki Masayuki, Asano Tatsuo, Muro Ryunosuke, Huynh Nam Cong-Nhat, Komatsu Noriko, Okamoto Kazuo, Nakano Kenta, Okamura Tadashi, Nitta Takeshi, Takayanagi Hiroshi	4. 巻 32
2. 論文標題 OPG Production Matters Where It Happened	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108124 ~ 108124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108124	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18件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 Host defense against bacterial infection by the osteoimmune dialogue
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 骨免疫相互作用による生体防御
3. 学会等名 東京歯科大学 大学院セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之, 小松 紀子, Warunee Pluemsakuntha, 中島友紀, 高柳 広
2. 発表標題 骨外膜間葉系前駆細胞の機能に必須の遺伝子Hmtfの同定
3. 学会等名 第5回 日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 骨免疫学が紐解くインプラント臨床の分子基盤
3. 学会等名 Club22 特別講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 骨免疫連関による生体防御
3. 学会等名 第20回 運動器科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 口腔バリアにおける骨免疫相互作用と生体防御
3. 学会等名 岡山大学 第19回 BioForum@Dental School（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 骨免疫学の新時代へ向けて
3. 学会等名 第1回東京大学医学部 血清学教室・免疫学教室同窓会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 骨免疫学および感染症の最前線
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会 日本学術会議シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 骨免疫学の新展開
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会 学会奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 歯周炎における骨免疫連関と生体防御
3. 学会等名 第14回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 骨外膜間葉系前駆細胞の機能に必須の遺伝子Hmtfの同定
3. 学会等名 第4回Skeletal Science Retreat
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 骨免疫学が紐解く歯槽骨代謝の分子基盤
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会 サテライトセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 骨免疫学から考える歯の萌出後の「力」と骨代謝
3. 学会等名 Dentistry, Quo Vadis? (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚崎雅之, 小松 紀子, Warunee Pluemsakuntha, 高柳 広
2. 発表標題 骨膜幹細胞による骨成長制御
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会ウィンタースクール
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 先端技術で切り拓く骨免疫・骨代謝学の最前線
3. 学会等名 Implant Tissue engineering Dental Network-Tokyo (招待講演)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 歯科医療従事者のための「骨免疫学」入門と最前線
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度秋季学術大会（第153回） 教育講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 Periodontitis as an “osteimmune” disease
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塚崎雅之
2. 発表標題 骨免疫学の最前線
3. 学会等名 第40回日本骨形態計測学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------