

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22676

研究課題名（和文）膜小胞分泌に基づいた骨細胞による骨質維持機構の解析

研究課題名（英文）Analysis on the physiological role of osteocytic small extracellular vesicles in the bone remodeling

研究代表者

池淵 祐樹（Ikebuchi, Yuki）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20645725

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）：マウス骨細胞様IDG-SW3、MLO-Y4細胞に関して、種々の培養条件下でのRANKLの発現量プロファイルを検証した。その結果、IDG-SW3を通常の酸素濃度20%で培養すると細胞老化の複数の指標が上昇し、さらに、培養上清中へのRANKL分泌量が増加することが確認された。RANKLは膜小胞を豊富に含む分画に認められ、細胞老化の結果として膜小胞分泌が変化し、RANKL搭載膜小胞が破骨細胞形成を制御している可能性が考えられた。また、MLO-Y4細胞では、アポトーシスと共に放出されるATPがRANKLの誘導作用を示すことも確認され、これら複合的な作用機構の解析のため、遺伝子改変マウスを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨代謝回転の起点となる破骨細胞形成が、時間的・空間的にどのように制御されているのかは未解明な点が多い。本研究から、高酸素濃度への曝露による細胞老化誘導と、アポトーシスに伴うATP放出という2つの異なるメカニズムで、破骨細胞形成の中心因子であるRANKLの発現制御が行われる可能性が見出された。これは、骨代謝回転の全体像を理解する上で重要な知見を得られたと考えている。さらに、これら骨細胞からのRANKL提示は細胞外膜小胞に搭載されて起こりうることも示唆され、将来的に、これらを標的とした抗体分子の投与によって骨代謝回転の制御が可能になることを期待している。

研究成果の概要（英文）：IDG-SW3 and MLO-Y4 cells, which are osteocyte-like cell lines, were cultured in several conditions to examine the profile of RANKL expression. As a result, typical features of the cellular senescence were observed in IDG-SW3 cells under normal concentration of oxygen, at 20%. Furthermore, RANKL secretion to culturing media was increased in the senescence cells, and most of RANKL molecules were detected in the fraction of small extracellular vesicles. These results indicated that cellular senescence in osteocytes, induced by oxidative stress, may be involved in the osteoclasts formation via RANKL-containing small extracellular vesicles. On the other hand, apoptosis in MLO-Y4 cells resulted in ATP release and it induced RANKL expression in surrounding MLO-Y4 cells. Further analysis will be needed to reveal these multi-factors mechanism, therefore several gene-manipulated mice was established.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨細胞 細胞外膜小胞 アポトーシス小体 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の進展に伴い、健康寿命短縮の要因の一つとしてロコモティブ症候群が挙げられ、特に、脆弱性骨折の原因となる骨粗鬆症の適切な治療法の確立は臨床的に重要な課題である。近年、画像診断解析技術の進歩とも相俟って、骨強度の正確な評価には骨密度など骨量を反映する指標のみでは不十分であり、骨質の重要性が指摘されるようになった。日常の動作程度でも生じ得る微小な損傷(マイクロクラック)は、通常は発生が常時モニタリングされ、骨リモデリング(破骨細胞による骨吸収と、それに続く骨芽細胞による骨形成の一連のプロセス)によって直ちに修復されると考えられている。一方、加齢に伴い骨リモデリングが強く抑制されると、マイクロクラックが蓄積し、骨強度の脆弱化・骨質の低下に繋がると示唆されている。

骨基質中に包埋されて存在する骨細胞は、骨小腔を通じて細胞突起を張り巡らすことで複雑な細胞ネットワークを構築しており、破骨細胞の分化に必須である RANKL 分子の主な供給源であることが示されている。しかしながら、常に新陳代謝を繰り返している骨組織内のいつ、どこで、またどの様に破骨細胞による骨吸収が起こるのか、詳細な制御機構は依然として不明瞭のままとなっている。運動負荷等でマイクロクラックが発生した場合、周辺の骨細胞でアポトーシスが誘導され、これと同期して破骨細胞の分化・成熟が促進されること、またアポトーシスを抑制すると一連のリモデリングが進行しないことから、アポトーシスを起こした骨細胞からの何らかの細胞間コミュニケーションの存在が想定される。

本研究代表者らはこれまで、RANKL による骨代謝制御機構の解明を目標に研究を行い、成熟破骨細胞から放出される RANK 搭載膜小胞が骨芽細胞の RANKL に受容され、骨形成を促進するカップリング因子として機能することを明らかにしている(Ikebuchi Y, Nature. 2018)。膜小胞に発現する「受容体」が標的の細胞膜上の「リガンド」に作用する初めての例として注目を集めており、骨吸収から骨形成へのカップリング機構の新たな一面を明らかにしている。しかしながら、起点となる骨細胞からのシグナル入力に関しては、直接的な接触が困難な、骨基質に深く包埋された骨細胞で RANKL を欠損させた遺伝子改変マウスにおいても骨吸収が大きく抑制されるとの報告(Xiong J, PLoS One. 2015)がなされ、未だ不明瞭となっていた。細胞間の直接接触による RANKL の提示が制限されると仮定した場合、細胞外領域が切断された可溶性 RANKL (sRANKL) の関与が考慮されるが、切断部位に変異が導入され sRANKL の生成を低下させたマウスにおいては骨吸収にほぼ影響が認められない(Xiong J, Nat Commun. 2018)。また、RANKL によるシグナル入力は三量体の時により効率的に行われることから、単量体である sRANKL としてではなく、何らかの膜小胞に搭載された RANKL が破骨前駆細胞へと提示されているものと想定される。さらに、研究代表者らが骨細胞と破骨前駆細胞の *in vitro* 共培養系を構築した際に、生理的環境を模して細胞間を隔てる多孔性のフィルターのポアサイズを様々に変更すると、1 μ m 以下に狭めた場合に著しく破骨細胞の形成が抑制されることを確認している。膜小胞の平均的な粒子径を踏まえると、100~500nm 程度のエクソソームやエクトソームではなく、1~5 μ m のアポトーシス小体に RANKL が搭載され、直接接触が困難な破骨前駆細胞へと提示されている可能性も考えられ、本研究を実施した。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究は、骨細胞から放出されるアポトーシス小体を始めとする膜小胞が破骨細胞の分化制御に関与している可能性を検証することで、一連の骨品質制御機構を明らかにすることを目標とした。具体的には、以下の3点の検証を主目的とした。

- (1) 骨細胞が分泌する膜小胞のキャラクタリゼーション
- (2) 骨細胞由来膜小胞の *in vivo* での可視化および機能解析
- (3) 骨細胞の老化に伴う膜小胞分泌への影響評価

従来の骨粗鬆症治療薬は、主に破骨細胞による骨吸収を抑制して骨量を増大させることが意図されているが、長期的な骨リモデリング抑制は骨質の低下を引き起こし、予後不良な非定型性の骨折頻度を増加させることが問題となっている。本研究の進展により、骨リモデリングのバランスを制御する分子機構が解明されることで、新たな治療薬・治療法の開発にも繋がることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞の機能評価が可能な *in vitro* 培養系の構築

骨細胞は生理的な環境では骨基質中にネットワークを形成して存在しており、マウスの頭蓋骨等から酵素消化によって回収・単離して通常の細胞株と同様に平面培養を行うと、その形態や遺伝子発現といった骨細胞の形質を短時間で消失してしまう。コラーゲンを主成分とするゲル包埋法で三次元培養とすることである程度の改善が認められるが(Honma M, JBMR. 2013, 2015)、解析に供する十分な細胞・膜小胞を得ることは困難である。また、本研究では細胞老化

の影響に関しても解析を計画しており、初代骨細胞を用いた場合には、マウスの個体差や骨細胞調製に伴う種々のストレス応答、また培養による分化状態の変化などの影響を否定できず、将来的な解析に困難が予測された。そこで、不死化マウス骨細胞である IDG-SW3、および MLO-Y4 細胞を使用し、種々の培養条件・ストレス刺激下での応答性を検証した。

(2) 骨細胞由来膜小胞のキャラクタリゼーション

IDG-SW3、および MLO-Y4 細胞を用いて、生理的に破骨細胞分化・骨吸収が促進される条件として、メカニカルストレスとそれに伴うアポトーシス、また細胞老化を誘導して、それぞれの状態で放出される膜小胞を回収した。密度勾配による段階遠心によって小胞サイズ毎に分画し、それぞれに含まれる RANKL 量を ELISA 法で測定した。また、エクソソーム・エクソソーム・アポトーシス小体の各小胞分子に認められる、一般的なマーカー分子の発現を確認することで、いずれの小胞構造が破骨細胞への RANKL 提示に強く関わっている可能性があるのか検証した。同時に、破骨前駆細胞へとこれら単離した小胞分子を暴露し、実際に分化促進作用を有するか確認した。

また、これらの骨細胞由来膜小胞が、実際に生体内で形成され、破骨前駆細胞へと取り込まれているのかを検証するため、SOST プロモーター下流にそれぞれのマーカー分子を組み込み、骨細胞特異的 Tg マウスを作成した。この際に、アポトーシス検出用蛍光プローブ SCAT3 (蛍光分子 ECFP 及び Venus が Caspase-3 認識配列で繋がれ、通常は FRET が起こり Venus 由来の 530nm の蛍光を、アポトーシス時にはリンカー部位で切断され ECFP 由来の 475nm の蛍光を発する) を付与することで、アポトーシスを起こした骨細胞由来の膜小胞であるか否かを蛍光によって分離することを計画した。

(3) 骨細胞の老化に伴う膜小胞分泌への影響評価

骨リモデリングは絶えず繰り返され、年間 10% ほどの骨が新陳代謝されるが、骨基質中に包埋された骨細胞は数年に渡って存在し、骨代謝の恒常性を維持する司令塔としての役割を果たしている。近年の研究から、ROS 産生等で徐々に DNA 損傷が蓄積された細胞は形質が変化し、アポトーシス経路の不活性化やサイトカイン・膜小胞等の分泌パターンの変化が起こることが明らかにされつつある。この「細胞老化」は高齢のマウスでは骨細胞において顕著に認められ、さらに老化細胞のみを選択的に除去することで骨代謝回転が早まり、最終的には骨量が増加することが示されている (Farr JN, Nat Med. 2017)。老人性骨粗鬆症では骨吸収・骨形成が共に低下することで骨の脆弱化に繋がり、骨折のリスクを高めることが問題となっており、本研究で着目するアポトーシスに伴う骨細胞からの膜小胞分泌が細胞老化によって影響を受け、正常な骨代謝回転が妨げられている可能性を想定した。

IDG-SW3、および MLO-Y4 細胞において、Ras 遺伝子の導入やドキシソルピシン等の薬剤処理によって細胞老化が誘導されることが報告されているため、(1)と同様の条件下で回収される膜小胞中の RANKL や搭載分子が老化処理によって変化するか検証した。特に、アポトーシス経路の不活性化によってアポトーシス小体の放出自体が変化する可能性が高く、破骨前駆細胞との共培養系での分化・骨吸収促進能への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 骨細胞の機能評価が可能な in vitro 培養系の構築

マウス骨細胞様の形質を示す細胞株として頻用される MLO-Y4 細胞、および IFN ガンマの添加と培養温度条件によって細胞の分化状態をコントロール可能な IDG-SW3 細胞を用いて、Dmp-1、Sost 等の骨細胞マーカー遺伝子の発現プロファイルを指標に培養条件を決定した。初代培養骨細胞と同様に、I 型コラーゲン及びマトリゲルの混合ゲルに包埋すると、これらの細胞でも多数の細胞突起を伸展して細胞間ネットワークを形成する様子が観察された。

続いて、種々のストレス条件に暴露したところ、IDG-SW3 細胞を通常の酸素濃度 (20%) で培養すると細胞老化が誘導されることが、細胞老化の指標である ガラクトシダーゼ活性の誘導や p16、p21、p53 とした遺伝子の発現量から示唆された。一方で、IDG-SW3 を低酸素濃度 (3%) で培養すると、一連の細胞老化を示唆する変動は観察されなかった。さらに、20% 酸素濃度で培養し、細胞老化の進んだ IDG-SW3 の培養上清に含まれる RANKL 量の上昇が認められ、段階遠心によって分画するとエクソソーム等の膜小胞を豊富に含む分画で特に RANKL の上昇が確かめられた。骨細胞が存在する生理的な環境では、周囲の酸素濃度は 3~5% 程度であることが報告されており、HIF-1 の発現調節に伴って細胞老化がコントロールされている可能性が考えられる。マイクロクラック等が形成されると、VEGF の発現が誘導され、骨組織中の血管走行の増加とともに酸素濃度が増加することも示唆されており、これによる高酸素濃度ストレスが骨細胞に細胞老化を誘導し、破骨細胞形成を促進させるという一連の作業仮説の可能性が考えられる。今後、HIF-1 の阻害剤等も併せて検証することで、骨細胞の細胞老化と破骨細胞形成との関連性を検証することを計画している。

また、MLO-Y4 細胞での検討からは、包埋したゲルを切断することでアポトーシスを起こした細胞から ATP が放出されること、周辺の細胞における RANKL の発現量が上昇することが確認された。モデル細胞は異なるものの、複数のストレス下で骨細胞による破骨細胞分化制御が行

われている可能性が示唆され、今後のさらなる検証が必要である。

(2) 骨細胞由来膜小胞のキャラクタリゼーション

(1)のそれぞれの細胞由来膜小胞に搭載されている RANKL 以外の分子についても解析を進めており、将来的に、これらを標的とした抗体分子の投与によって骨代謝回転の制御が可能になることを期待している。また、骨細胞の膜小胞選択的に蛍光プローブを発現させることを計画した Tg マウスに関して、受託サービスでの作出を依頼し、研究室内で繁殖・維持を行なっている。十分な数が確保され次第、RANKL 投与や卵巣摘出などの骨代謝回転を促進させた環境で、骨組織中で膜小胞の放出が増加するのか、また分泌された膜小胞は破骨細胞や骨芽細胞など、周辺の骨組織を形成する細胞群にどのように作用しているのかを観察する。一連の解析により、骨リモデリングの起点となる破骨細胞形成が時間的、また空間的にどのような制御を受けているのかに関して、重要な知見を得ることが可能と考えている。

(3) 骨細胞の老化に伴う膜小胞分泌への影響評価

(1)での *in vitro* での解析に加えて、Sost プロモータおよび細胞老化特異的なプロモータ (p16) を組み合わせ、細胞老化を生じた骨細胞を選択的に除去できるマウスモデルの構築を試みた。具体的には、低分子基質 AP20187 依存的にヘテロ二量体を形成する DmrA/C を利用し、p16 プロモータで DmrA-Casp8 を発現する Tg マウス、及び Sost プロモータで DmrC-Casp8 を発現する Tg マウスをそれぞれ作出し、交配によってダブル Tg マウスを得る。このマウスでは AP21967 の投与によって、DmrA-Casp8 および DmrC-Casp8 の双方を発現している老化骨細胞のみにアポトーシスを誘導可能と考えられ、培養細胞においては両遺伝子を共導入した細胞のみ、AP21967 依存的に細胞死の誘導が可能であることを既に確認している。既にこのダブル Tg マウスの作出は完了しており、今後、このマウスで骨形態計測を行い、骨リモデリングにおける老化骨細胞の役割を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 本間雅、池淵祐樹、鈴木洋史	4. 巻 91
2. 論文標題 RANKL逆シグナルによる骨代謝制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 529-532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 本間雅、池淵祐樹、鈴木洋史	4. 巻 33
2. 論文標題 カップリング・シグナル受容分子としてのRANKL	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 THE BONE	6. 最初と最後の頁 57-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 本間雅、池淵祐樹、鈴木洋史	4. 巻 71
2. 論文標題 骨吸収と骨形成のカップリングにおけるRANKL逆シグナルの関与	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 608-614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 池淵祐樹、本間雅、鈴木洋史	4. 巻 79
2. 論文標題 骨形成・吸収におけるRANKリガンドシグナルの新たな役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 100-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 本間雅、池淵祐樹、鈴木洋史	4. 巻 34
2. 論文標題 RANKL逆シグナル経路を標的とした新たな創薬の可能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 773-777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Honma Masashi、Ikebuchi Yuki、Suzuki Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Mechanisms of RANKL delivery to the osteoclast precursor cell surface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 27 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01157-3	査読の有無 無
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 Honma Masashi、Ikebuchi Yuki、Suzuki Hiroshi	4. 巻 218
2. 論文標題 RANKL as a key figure in bridging between the bone and immune system: Its physiological functions and potential as a pharmacological target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacology & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 107682 ~ 107682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2020.107682	査読の有無 無
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6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Honma M., Kurata R., Ikebuchi Y., Kariya Y., Suzuki H.
2. 発表標題 Development of a novel biologic agent for treating RA
3. 学会等名 European Calcified Tissue Society Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池淵祐樹
2. 発表標題 骨吸収と骨形成のカップリングにおけるRANKL逆シグナルの寄与
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池淵祐樹
2. 発表標題 RANK-RANKLを介したカップリング制御機構と新たな創薬の可能性
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池淵祐樹
2. 発表標題 RANK-RANKLによる骨代謝制御機構の解析と新たな骨粗鬆症治療薬の可能性
3. 学会等名 埼玉医科大学 卒後教育委員会後援学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木和広, 清水優里, Lu Wei, 廣橋優奈, 曾根絵梨, 池淵祐樹, Masud Khan, Fatma Rashed, 田村幸彦, 菅森泰隆, 寺坂尚紘, 宇田川信之, 依田哲也, 本間雅, 菅裕明
2. 発表標題 RANKL-RANK-OPGシグナル研究の最前線 膜型RANKLを標的にした骨形成促進薬の開発
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青木和広, 池淵祐樹, Masud Khan, 菅森泰隆, 田村幸彦, 本間雅
2. 発表標題 骨形態計測法からシグナル伝達研究への発展
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 抗RANKL抗体の改変抗体	発明者 本間雅、池淵祐樹、 中村圭佑、藏田玲 美、苅谷嘉顕、鈴木	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-025481	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

東京大学医学部附属病院薬剤部試験研究室 / 臨床薬物動態学教室 https://plaza.umin.ac.jp/~todayak/
--

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