

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22698

研究課題名(和文)新骨芽細胞膜チャネルPannexin 3が制御する造血幹細胞ニッチの解明

研究課題名(英文)Pannexin 3 provides bone marrow niche for B- and T cell differentiation.

研究代表者

石河 真幸(Ishikawa, Masaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60432936

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):骨は内分泌組織として定義され様々な生理機構へ関与する。骨髄幹細胞ニッチが造血幹細胞や前駆細胞の維持および分化に関与することは知られているが、その詳細なメカニズムは謎が多い。Gap junction 膜タンパクであるpannexin 3 (Pann3)は、歯、骨および軟骨を含む硬組織特異的発現を示し、そのチャネル機能により細胞増殖を抑制し分化を促進するが、Pann3の骨髄における機能に関しては未だ明らかではない。本研究でPann3遺伝子欠損マウスに骨変異に加え、胸腺肥大、脾臓萎縮およびBおよびT細胞の成熟異常が認められることより、Pann3が全身免疫機能維持に深く関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で硬組織特異的Gap junction 膜タンパクPann3が形成する骨髄微小環境、ニッチがB細胞およびT細胞の分化を制御することを明らかにした。この結果は新しい骨髄ニッチの存在を示し、骨環境に新たな免疫細胞形成機構があることを示唆するもので、学術的に新しい扉を開けるものとなった。また、Gap junctionによる骨髄ニッチは初の報告であり、細胞生物学的にも新しい発見と言える。今回の発見は骨生理“骨を中心とした全身の恒常性維持機構”をより解明するものであり、今後さらなる免疫細胞の維持および分化機構を明らかにすることで新治療法開発にも波及する可能性を示した。

研究成果の概要(英文): Bone has been defined as an endocrine organ to regulate physiological functions in many tissues. Bone marrow stem cell niche plays important roles for hematopoietic cell differentiation and maintenance. However, the mechanisms and component of bone marrow niche are not fully understood. Pannexin 3 (Pann3), a member of gap junction protein family is predominately expressed in hard tissue such as bone, cartilage and tooth. Pann3 inhibits precursor cell proliferation and promotes differentiation by its small molecule permeable channel functions. Still, Pann3 functions in bone marrow, especially as bone marrow niche is not known. Here, we describe that Pann3 KO mice revealed the skeletal dysplasia, enlarged thymus and shrunken spleen. Further, B- and T cell maturation in Pann3 KO mice were insufficient. Thus, our findings suggest that Pann3 regulates B- and T cell differentiation by Pann3-provided bone marrow niche.

研究分野: 歯科保存学

キーワード: 骨髄幹細胞 骨髄ニッチ 免疫細胞分化 Gap junction Pannexin

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた現代で、健康長寿には歯、軟骨および骨を含む硬組織機能の維持は欠かせない。近年、骨は支持組織だけではなく内分泌組織としても定義され人体における様々な生理機構に影響を与えることが報告されている。骨髄は免疫細胞の生産工場であり、骨髄内の微小環境(stem cell niche)が造血幹細胞(HSC)や前駆細胞の維持および分化に関与することは報告されているが、その詳細なメカニズムはまだ謎が多い。特に骨髄での骨芽細胞が作り出す微小環境の働きおよび存在に関して議論がなされている(図1)。

我々は新規 gap junction protein である pannexin family (1-3)に属する pannexin 3 (Panx3)の機能解析を行ってきた。Panx3は歯、骨および軟骨を含む硬組織に特異的に発現し、それぞれの構成細胞の細胞増殖を抑制し分化を促進するスイッチ機能を持つ。さらに、Panx3は細胞膜において細胞内ATPを細胞外に放出する Hemichannel、小胞体膜で細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を調節するER Ca<sup>2+</sup> channel、そしてCa<sup>2+</sup>の細胞間透過を行う gap junction の3つの機能を持つ。さらにPanx3 knockout (KO) mouseは軟骨細胞分化および骨芽細胞分化の抑制により骨成長および形成に異常を示したことから、Panx3は新骨形成制御因子であることを明らかにした。

我々の最近の研究においてPanx3 hemichannelが炎症を惹起し、Panx3 KO mouseに対して創傷部位の治癒遅延が認められ、かつ炎症部位における自然免疫の機能不全が認められた。このようにPanx3 KO mouseには骨形成異常だけでなく免疫機構にも異常が確認されたため、Panx3が全身の免疫機能維持に大きく関わっていることが推測された。さらにPanx3 KO mouseの胸腺、脾臓およびリンパ節を観察した結果、胸腺の肥大化、脾臓の萎縮が認められた。また、表面分化マーカーによる解析から各組織においてT細胞の成熟に大きな障害があることが示唆された。そこで、Panx3 KO mouseの大腿骨からRNAを抽出しCAGE(Cap Analysis Gene Expression)法により網羅的に候補遺伝子を選出した結果、HSCおよび前駆細胞の機能維持に重要なケモカインであるCxcl12の転写活性が優位に抑制されていた。これらの結果よりPanx3 KO mouseには明らかにリンパ球の分化異常が認められ、Panx3はその膜チャンネル機能によって骨髄の環境を整え、リンパ球の産生、維持を制御していることが示唆された。

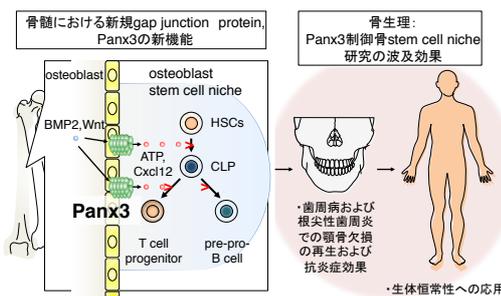


図1: 骨整理, Panx3 制御 stem cell niche 研究とその波及効果.

## 2. 研究の目的

この度の研究目的は、Panx3が制御するリンパ球成熟環境を解明し、Panx3が制御する stem cell nicheの知見を造血系疾患の発症メカニズムの解明につなげていくことである(図1)。ひいてはgap junction proteinが創造する骨生理“骨を中心とした全身の恒常性維持機構”をより解明する。そして、その応用は歯周病および根尖性歯周炎での顎骨欠損の再生および抗炎症に対する新治療法開発にも波及する。

## 3. 研究の方法

(1) Panx3 null KO mouseの免疫器官における表現型の解析: 新生児および4週齢のPanx3 null KO mouseの免疫器官(骨髄、胸腺、脾臓およびリンパ節)を野生型(WT)またはヘテロ(HT) mouseと解剖学的および組織学的解析を用いて比較する。また、各組織のmRNAおよびタンパクを抽出しPanx3発現をそれぞれquantitative PCR(qPCR)およびwestern blottingで確認する。

(2) Panx3 null KO mouseの免疫器官におけるT細胞およびB細胞の成熟度の解析: Panx3 KOおよびWTまたはHT mouseの各組織を摘出、ホモジナイズした後、FACS解析により細胞表面マーカーを用いて免疫細胞の成熟度を比較検討する。また、Panx3 cKO mouse (Prx1-cre mouse)を用いて骨芽細胞特異的にPanx3発現を欠失させ上記の1.2の解析を行う。

(3) 特異抗原に対するPanx3 KO mouseの獲得免疫機能の評価: Panx3 null KOおよびcKO mouseをペプチド等の特異抗原で免疫した後、血清を採取して抗原特異的な抗体価をELISA法で評価する。

(4) **Panx3 の免疫細胞分化機構の解析**: Panx3 null KO および cKO mouse (Prx1-cre) の骨髄を摘出し T 細胞および B 細胞を持たない Rag1 欠損マウスに骨髄移植する (図 4)。その後、免疫器官における T 細胞、B 細胞の成熟度を FACS にて解析する。さらに Panx3 強発現および抑制された骨芽細胞株とマウスより抽出精製した primary B 細胞の共培養を行い、B 細胞の細胞増殖やクラススイッチを評価する (図 5)。さらに、ATP が stem cell niche からの細胞離脱または維持を行うという報告から ATP を放出する Panx3 hemichannel 機能と免疫細胞分化の関連性を調べる。Panx3 強制発現および欠失した骨芽細胞を用いて primary B 細胞または bone marrow stromal cell との共培養を行う。BMP2 により Panx3 hemichannel の活性を行い、B 細胞および bone marrow stromal cell の分化度を解析する。また、Panx3 hemichannel 特異的 blocker を用いて細胞の分化度を評価する。

(5) **候補因子 Cxcl12 を介した Panx3 制御の HSC 維持シグナル解析**: Panx3 KO mouse の大腿骨から RNA を抽出し CAGE 法により網羅的に候補遺伝子を選出する。予備実験より HSC および前駆細胞の機能維持に重要なケモカイン、Cxcl12 が候補に挙がった。Panx3 KO mouse から抽出した骨芽細胞および Panx3 強制発現骨芽細胞株を用いて Panx3 と Cxcl12 発現を qPCR および western blot で調べる。Cxcl12 の promoter 領域を同定し、luciferase reporter assay および chip assay により Panx3 による Cxcl12 発現制御機構を解析する。また、同定した Panx3 promoter を基に Panx3-Cre mouse を作製し、Cxcl12 cKO mouse (Panx3-Cre mouse) の免疫細胞分化を FACS にて評価する。

#### 4. 研究成果

(1) **Panx3 null KO mouse の免疫器官における表現型の解析 (図 2)**: Panx3 KO mouse は新生児において body size が小さく、また骨の形成不全が認められた。8 週齢の成獣になってもこの表現系は認められた。また、新生児および 4 週齢 Panx3 WT 及び KO mouse の免疫器官 (骨髄、胸腺、脾臓およびリンパ節) を比較した結果、胸腺および脾臓の肥大が認められ、cellularity に関しても増大していた。骨髄に関しても cellularity の減少を認めたが、リンパ節の解析は不完全に終わった。さらに、各組織の mRNA およびタンパクを抽出し Panx3 発現を確認した結果、骨組織で強発現を認めたが、他の組織ではたいへん微量 (ほぼ発現なし) の発現であった。

(2) **Panx3 null KO mouse の免疫器官における T 細胞および B 細胞の成熟度の解析**: マウスの胸腺、脾臓およびリンパ節に対して、FACS 解析により T 細胞及び B 細胞の成熟度を比較検討した結果、胸腺およびリンパ節において明らかな CD4 T cell および CD8 T cell の減少が認められた。

(3) **特異抗原に対する Panx3 KO mouse の獲得免疫機能の評価**: Panx3 WT および KO mouse に対し NP-KLH 抗原で免疫を行い、免疫 7 週および 14 週後に血清を採取して抗原特異的な抗体価を ELISA 法で評価した。結果、Panx3 KO mouse では NP 特異的 IgM, IgA および IgG 抗体価が減少した。

(4) **Panx3 の免疫細胞分化機構の解析**: Panx3 WT および KO mouse の骨髄から LSK (Lineage(-), Sca-1(+), c-Kit(+)) 細胞を FACS sorting 後、SJL マウスに骨髄移植した。移植 3 ヶ月後、骨髄、胸腺、脾臓およびリンパ節における T 細胞、B 細胞の成熟度を FACS にて解析した。結果、移植されそれぞれの LSK 細胞由来の T 細胞および B 細胞の成熟度には差が認められなかった。さらに、SJL mouse から FACS sorting した LSK 細胞を Panx3 WT また KO mouse に骨髄移植後、3 ヶ月後、骨髄、胸腺、脾臓およびリンパ節での移植細胞の T 細胞および B 細胞の分化度を FACS にて解析した。結果、骨髄では B 細胞の分化異常、胸腺およびリンパ節では CD4 T 細胞および CD8 T 細胞の分化異常が認められた。

(5) **候補因子 Cxcl12 を介した Panx3 制御の HSC 維持シグナル解析**: 4 までの結果より T 細胞および B 細胞の分化異常は骨組織から始まっていると示唆された。したがって、この表現系に関与する因子を網羅的に解析して抽出するために、Panx3 KO mouse の大腿骨から RNA を抽出し CAGE 法を用いた。CAGE 法による網羅的解析および Bulk RNA sequence との整合性を調べた結果、HSC および前駆細胞の機能維持に重要なケモカイン、Cxcl12 が Panx3 KO mouse サンプル群では優位に減少していた。さらに、Panx3 KO mouse から抽出した骨芽細胞および Panx3 強制発現骨芽細胞

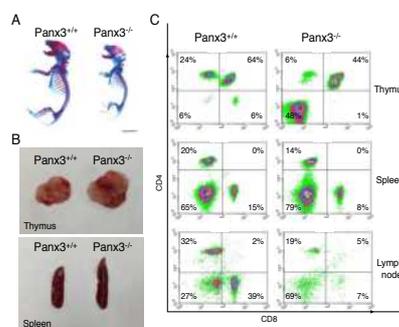


図 2. A; Panx3 KO mouse 新生児骨標本. B; 3 ヶ月齢マウスの胸腺 (上) と脾臓 (下) の比較写真. C. FACS 解析: 3 ヶ月齢マウスの胸腺、脾臓、リンパ節における T 細胞分化度の比較.

胞株を用いて Panx3 と Cxcl12 発現を qPCR および western blot で発現比較した結果、Cxcl12 は Panx3 KO moused では減少し、強制発現細胞株では上昇が認められた。さらに、Cxcl12 の 2kb upstream、promoter 領域をクローニングしたのち Luciferase reporter vector に組み込んで、Cxcl12 promoter reporter vector を作製した。Panx3+および-細胞株に Cxcl12 promoter vector をトランスフェクションし luciferase reporter assay を行った結果、Panx3 依存的に Cxcl12 の promoter 活性が認められた。重要な binding domain の同定はできなかったが、Wnt または BMP のシグナルの関与を疑っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Ishikawa Masaki, Williams Geneva, Forcinito Patricia, Ishikawa Momoko, Petrie Ryan J., Saito Kan, Fukumoto Satoshi, Yamada Yoshihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Pannexin 3 ER Ca <sup>2+</sup> channel gating is regulated by phosphorylation at the Serine 68 residue in osteoblast differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55371-9	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0件

〔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
---------	---------