

令和 4 年 4 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22973

研究課題名（和文）1細胞レベルかつ3次元遺伝子構造解析で解き明かす破骨細胞の新たな分化メカニズム

研究課題名（英文）Differentiation Mechanism of Osteoclast revealed by single cell and 3D structure analysis

研究代表者

岡田 寛之（Okada, Hiroyuki）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：10883481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨をこわす破骨細胞分化は、従来の研究手法では平均値しか理解できなかった。そこで我々は細胞ごとの多様性を理解するため、1細胞解析を行った。特に、破骨細胞の生物種間差に着目した破骨細胞分化の検証を行った。また、先端ゲノム支援の支援をいただき、従来法では捉え切れなかった真の破骨細胞の1細胞解析プラットフォームを構築した。さらには公共データを利活用して、骨の1細胞アトラスの樹立に成功した。  
ご支援のおかげで、新たな骨粗しょう症治療開発につながる重要な知見を複数得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢社会日本において、骨粗しょう症に起因する脆弱性骨折患者の生命および機能予後改善は、医療・介護の重要課題である。現存する骨粗鬆症治療薬では、全ての高齢者を安全に治療できないため、「速やかに」かつ「安全に」骨密度を改善する新規薬剤の開発が求められている。  
本研究の研究成果は、新たな骨粗しょう症創薬ターゲット探索に寄与するものである。スタートアップ支援で得た知見をもとに、臨床応用を見据え研究を加速させる所存である。

研究成果の概要（英文）：With traditional method of gene expression, we can only obtain the average value of gene expression. Single cell analysis reveals the diversity of gene expression cell by cell. We adapt single cell technology to researches of osteoclast. With commercially available method, we cannot capture giant mature osteoclast. We fortunately got support from advanced genome platform in Japan, we have developed the platform to catch and detect mature osteoclast. In addition, we built mouse bone atlas with public dataset of single cell analysis on bone and bone marrow. Taken together, we got key factors involving bone remodeling process. These findings will clarify the novel target of osteoporosis and skeletal diseases.

研究分野：骨代謝学、整形外科

キーワード：破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

高齢社会日本において、骨粗鬆症に起因する脆弱性骨折患者の生命および機能予後改善は、医療・介護の重要課題である。平成30年度国民生活基礎調査(厚生労働省)によると、骨折・転倒は要介護となる原因の13.3%であり、その割合は増加傾向にあり、脆弱性骨折に対する治療法の革新は焦眉の課題である。入院後早期の手術、術後早期のリハビリに加え、切れ目のない再骨折予防が必須であり、骨粗鬆症リエゾンサービスの普及が進んでいる。

しかし二次骨折予防の治療目標のハードルは高い。骨折後半年以内にYAM (Young Adult Mean) 70%以上に回復させる骨粗鬆症治療が推奨されているが、既存の骨粗鬆症治療による目標達成は困難である。2019年より使用可能となったロモソズマブは、既存薬の中では最も速やかな骨形成を期待できるが、高度骨粗鬆症例では目標達成に及ばない。また高齢者に多い心血管リスク例には、合併症の懸念から使用に注意が必要である。

骨吸収を担う破骨細胞は、骨粗鬆症の主な治療標的である。破骨細胞の分化誘導因子RANKLの中和抗体であるデノスマブは、強力な骨吸収抑制薬であり、10年以上の長期使用例でも継続した骨密度上昇が期待できる。しかし過剰な骨吸収抑制は、低カルシウム血症などの副反応、顎骨壊死など懸念も多い。このように、現存する治療薬では、全ての高齢者を安全に治療できないため、「速やかに」かつ「安全に」骨密度を改善する新規薬剤の開発が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、破骨細胞分化における転写制御ネットワークの多様性を明らかにし、前例のない転写制御による創薬ターゲットを探索することを目的とする。これまで破骨細胞分化研究では例のない「シングルセル」レベルで、遺伝子上の転写制御機構を解明する点が独創的である。

我々は、破骨細胞分化におけるエピジェネティクスを解明するため、ChIP (chromatin immunoprecipitation)-seqを行い、破骨細胞らしさがいかに生まれるのか明らかにしてきた。しかしChIP-seqで得られた結果はあくまで細胞集団の平均値に過ぎず、集団内の細胞ごとの多様性は無視せざるをえなかった。同じ生理的環境下であっても、破骨細胞による骨吸収活性になぜ多寡が生まれるのか、メカニズムを明らかにする必要があった。

近年RNA発現を1細胞レベルで網羅的に解析するsc (single cell) RNA-seqが確立し、同じ分化段階と想定されていた細胞集団内でも、遺伝子発現パターンは多様であることが分かってきた。1細胞レベルの網羅的解析は、エピジェネティクスにも応用されつつある。

本研究では、これまで単細胞レベルの解析事例のない破骨細胞において、scRNA-seqを行う。遺伝子発現と転写制御を1細胞レベルにて解析し、詳細な破骨細胞特異的遺伝子の発現調節機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### 1. 破骨細胞分化におけるシングルセル解析 (scRNA-seq)

マウス骨髄由来の破骨細胞分化における遺伝子発現変化の1細胞レベル解析を行う。従来の方法では見えなかった新たな破骨細胞分化標的を探索する。遺伝子発現ネットワーク解析により、破骨細胞分化制御に必須な転写因子および細胞内シグナル因子を絞り込む。

研究開発当初は、オープンクロマチン領域を網羅的に探索するATAC-seqを1細胞レベルで行う予定としていたが、限られた資金の中では実施が困難であり、かつ先端ゲノム支援でのディスクッションでエキスパートの審査委員の先生方から、技術的にも困難であるとの助言をいただき、中止した。代わりに、以下のプロジェクトを立ち上げた。

### 2. 破骨細胞分化における真のシングルセル解析 (scrRNA-seq)

従来の1細胞解析のコア技術は、1細胞レベルに細胞を分離するマイクロ流路技術である。しかし、接着細胞かつ脆弱な細胞は、浮遊させた段階で細胞としての活性を失ってしまう。そこで、細胞を接着させたまま、単離する技術を開発した。さらに先端ゲノム支援の先生方の支援をいただき、単離した1細胞から遺伝子発現の解析に成功した。

### 3. 骨の1細胞解析アトラスの作成

デジタルトランスフォーメーションの重要性が叫ばれるようになって久しい。上述の1細胞解析データも複数公表されてきた。しかし公共データを利活用した論文はまだ少ない。1細胞解析は、研究者内のbatch effectの除去も種々のテクニックが開発されているものの、なお困難である。さらに、研究者間の細胞採取手法及びプラットフォームの相違、ライブラリ調整試薬のバージョンの違い、解析手法の違いなど、種々のバイアスを取り去ることができていなかった。

そこで我々の研究グループは、マウス骨および骨髄の公共データを入手し、統合解析を行った。破骨細胞、骨芽細胞といった骨リモデリング調節細胞集団の遺伝子発現プロファイルを同時に取得すると同時に、単離困難な骨細胞の1細胞レベルでの発現情報も得ることに成功した。

## 4. 研究成果

本研究期間中に、提出した課題を拡張する形で、先端ゲノム解析研究推進プラットフォーム、先端ゲノム支援に採択され、技術支援を得て、研究を前進させた。

研究代表者として本研究支援期間に、英文論文筆頭2編、共著4編を出版することができた。さらに研究終了時点では、本研究課題論文が査読中となっており、近日中に公表される見込みである。また国内・国外の学会にて発表を行い、日本生化学会、日本骨代謝学会ではシンポジスト招聘参加、日本骨免疫学会では優秀演題賞を受賞した。

#### 1. 破骨細胞分化におけるシングルセル解析 (scRNA-seq)

従来の1細胞解析法による破骨細胞分化系譜について、本研究計画採択後に、Tsukasakiらが論文公表した。そこで我々の研究グループでは、生物種間差に着目した破骨細胞分化の検証を行った。現在、論文投稿し審査中であり、近日中に公開される予定である。

#### 2. 破骨細胞分化における真のシングルセル解析 (scRNA-seq)

先端ゲノム支援の先生方の支援をいただき、巨大破骨細胞の単離、及び単離した1細胞から遺伝子発現の解析に成功した。従来法では得られなかった成熟破骨細胞の遺伝子発現プロファイルの世界で初めて明らかにした。この知見は現在論文投稿準備中であり、近日中に投稿する予定である。

#### 3. 骨の1細胞解析アトラスの作成

マウス骨および骨髄の公共データから骨の1細胞アトラスを作成した。遺伝子発現プロファイルから、骨リモデリングに関わる細胞群の細胞間相互作用を明らかにした。また遺伝子発現制御ネットワークも同時に解読することに成功した。

これらの研究成果は、新たな骨粗しょう症創薬ターゲット探索に寄与するものである。スタートアップ支援で得た知見をもとに、臨床応用を見据え研究を加速させる所存である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Okada Hiroyuki, Okabe Koji, Tanaka Sakae	4. 巻 22
2. 論文標題 Finely-Tuned Calcium Oscillations in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 180 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010180	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 Nakamura Satoshi, Sato Yuiko, Kobayashi Tami, Kaneko Yosuke, Ito Eri, Soma Tomoya, Okada Hiroyuki, Miyamoto Kana, Oya Akihito, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Kanaji Arihiko, Miyamoto Takeshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Vitamin D protects against immobilization-induced muscle atrophy via neural crest-derived cells in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69021-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 -

1. 著者名 Tani Shoichiro, Okada Hiroyuki, Chung Ung-il, Ohba Shinsuke, Hojo Hironori	4. 巻 22
2. 論文標題 The Progress of Stem Cell Technology for Skeletal Regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1404 ~ 1404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031404	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 Kanazawa Sanshiro, Okada Hiroyuki, Hojo Hironori, Ohba Shinsuke, Iwata Junichi, Komura Makoto, Hikita Atsuhiko, Hoshi Kazuto	4. 巻 11
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells in the bone marrow niche consist of multi-populations with distinct transcriptional and epigenetic properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94186-5	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 Watanabe S, Okada H, Hirose J, Omata Y, Matsumoto T, Matsumoto M, Nakamura M, Saito T, Miyamoto T, Tanaka S	4. 巻 -
2. 論文標題 Transcription factor Hhex negatively regulates osteoclast differentiation by controlling cyclin-dependent kinase inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Bone Miner Res plus	6. 最初と最後の頁 10608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm4.10608.	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 Okada Hiroyuki, Tanaka Sakae	4. 巻 74
2. 論文標題 Plasmalemmal interface for calcium signaling in osteoclast differentiation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr. Opin. Cell Biol	6. 最初と最後の頁 55-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceb.2022.01.001	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10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hiroyuki Okada, Hiroshi Kajiya, Yasunori Omata, Koji Okabe, Takeshi Miyamoto, Sakae Tanaka
2. 発表標題 Dectin-2, a Fc receptor gamma-harboring receptor, regulates foreign body reaction by interfering with intracellular calcium oscillation.
3. 学会等名 ASBMR 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 破骨細胞分化初期の共刺激-カルシウムオシレーション-NFATc1 軸 -特に共刺激周囲の補因子について
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 シンポジウム「Calcineurin/NFATシグナルのダイバーシティ」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 Dectin-2はFcR と会合し、カルシウム振動に干渉し異物反応を制御する
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、北條宏徳、鄭雄一、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 破骨細胞分化におけるカルシウム振動制御の妙
3. 学会等名 第18回 Osteoimmunology Forum (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyuki Okada, Hiroshi Kajiya, Yasunori Omata, Hironori Hojo, Ung-il Chung, Koji Okabe, Takeshi Miyamoto, Sakae Tanaka
2. 発表標題 Frequency and amplitude analyses of calcium oscillations reveals the harmony regulated by ITAM receptors during RANKL-induced osteoclastogenesis
3. 学会等名 ECTS (european calcified tissue society) 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、北條宏徳、鄭雄一、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 RANKLとITAMが生み出す破骨細胞のカルシウムハーモニー
3. 学会等名 第6回日本骨免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、北條宏徳、鄭雄一、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 数理モデルが解き明かす破骨細胞分化における細胞内カルシウム動態 - CTLA4-Igの骨破壊抑制機序を含めて
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会 日本リウマチ学会合同シンポジウム「関節リウマチにおける関節破壊機序」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、北條宏徳、鄭雄一、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 数理モデルが解き明かす破骨細胞分化に必要な共刺激
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田寛之、鍛冶屋浩、小俣康徳、北條宏徳、鄭雄一、岡部幸司、宮本健史、田中栄
2. 発表標題 1細胞レベルで理解する骨の生理・病理
3. 学会等名 福岡歯科大学口腔医学研究センターシンポジウム「口腔医学研究のRising Sunに出会う」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田寛之、谷彰一郎、小俣康徳、寺島明日香、矢野文子、斎藤琢、田中栄、鄭雄一、北條宏徳
2. 発表標題 single cell Bone Milieu Atlas作成とその利活用
3. 学会等名 第6回日本骨免疫学会ウィンタースクール
4. 発表年 2022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
---------	---------