

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16688

研究課題名（和文）若年女性アスリートのエストロゲン分泌異常による骨代謝障害の機序解明

研究課題名（英文）Elucidating the mechanisms of bone metabolism disorders caused by abnormal estrogen secretion in young female athletes

研究代表者

池戸 葵（Ikedo, Aoi）

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・特定研究員

研究者番号：60834520

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨折修復への寄与率が高く、エストロゲン受容体（ER α ）の発現量が高い、骨髄間葉系幹細胞であるCxcl12abundantreticular cells（CAR細胞）に着目し、骨折治癒制御に対するエストロゲン作用を明らかにすることを目的とした。まず、CAR細胞特異的ER α 欠損マウス（cKO）を作出し、骨折治癒過程を観察したが、骨折後10日および14日の仮骨形成量に群間差を認めなかった。他方で、23週齢の無処置で採取した脛骨及び大腿骨において、cKOでは、CONと比較して、骨密度が有意に低く、骨髄脂肪量は有意に増加した。今後はこの表現型について詳細な検討を行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、CAR細胞特異的にER α 欠損させた時の骨折治癒への影響を検出することができなかった。しかし、骨折治癒に関わる間葉系幹細胞は、骨膜や成長板にも存在するため、これらの細胞がCAR細胞におけるER α 欠損の影響をマスクしている可能性も考えられた。一方で、cKOマウスの無処置の脛骨および大腿骨において、骨密度の低下及び骨髄脂肪の増加が見られたことは、閉経後骨粗鬆に見られる骨髄脂肪の増加の機序を明らかにし、治療標的を発見できる可能性がある。従って、今後はこの表現型について詳細な検証を行い、治療法の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：We focused on Cxcl12 abundant reticular cells (CAR cells), which are bone marrow mesenchymal stem cells with a high contribution to fracture repair and high expression of estrogen receptor alpha (ER α), and the aim of this study was to clarify estrogen effects on the regulation of fracture healing by CAR cells. First, CAR cell-specific ER α -deficient mice (cKO) were generated and observed during the fracture healing process. However, no group differences were found in the callus volume at 10 and 14 days after fracture. On the other hand, bone mineral density was significantly lower and bone marrow fat volume was significantly increased in cKO compared with CON in intact tibias and femurs collected at 23 weeks of age. We will perform studies of this phenotype in detail in the future.

研究分野：スポーツ健康科学

キーワード：エストロゲン CAR細胞 骨折治癒

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エストロゲン (E2) は、主に卵巣においてテストステロン (T) から Aromatase の作用により合成され、エストロゲン受容体 (ER) α/β を介して各標的組織に作用するステロイドホルモンである。中でも、骨組織の恒常性維持において極めて重要な役割を担う。近年、骨量増加に重要な時期にある思春期女性やアスリートにおいて、エストロゲン分泌異常が問題視されている。彼女らは、閉経後女性と同様に低骨量を呈し、骨折リスクが高い (Nattiv et al., *Med Sci Sports Exerc.* 2007)。さらに大きな問題は、このようなエストロゲン欠乏状態では骨折治癒が遷延することであった (He et al., *Bone.* 2011)。

一方、エストロゲン欠乏は骨折治癒を遷延させるものの、その標的因子の解明に迫る報告は無い。そこで申請者は、治療標的を明確にするために骨折治癒を遷延させる細胞種の探索を行ってきた。骨折部の修復を担う骨芽細胞に着目し、4 系統の骨芽細胞の各分化段階特異的な ER α 遺伝子欠損マウスをそれぞれ作出し、骨折治癒過程を評価したところ、前骨芽細胞特異的 ER α 欠損マウス (*Osterix-Cre;ER α ^{L2/L2}; cKO*) において、仮骨形成量の低下を認めた。また、このマウスの骨髄から間葉系間質細胞を単離し、石灰化能を評価したところ、cKO 細胞では、石灰化能の低下が観察された。すなわち、骨折治癒過程において、Osterix (Osx) 陽性の前骨芽細胞におけるエストロゲン作用が重要であることが示された。

しかし、卵巣摘出によりエストロゲン欠乏状態にしたマウスで見られる骨折修復時の大幅な仮骨量の減少を、Osx 陽性細胞へのエストロゲン作用だけでは説明しきれなかった。そこで申請者は、骨折修復部では、間葉系間質細胞が増殖し骨芽細胞へ分化していくことから、Osx 陽性細胞より未分化な間葉系間質細胞に着目した。最近、間葉系間質細胞である CXCL12-abundant reticular cells (CAR 細胞) は、Osx 陽性細胞より骨折治癒への寄与率が高いことが報告された (Matsushita Y et al., *Nat Commun.* 2020)。CAR 細胞は、骨髄で造血幹細胞のニッチを構成する細胞として同定されたが、軟骨細胞、骨芽細胞や脂肪細胞の前駆細胞でもあり、骨折治癒に強く関与することが明らかにされつつある。そこで申請者は、CAR 細胞へのエストロゲン作用を理解するため、CAR 細胞の ER α (Esr1) 発現量を解析した。その結果、骨髄間葉系間質細胞を 4 つの型に分けた時、CAR 細胞は ER α 発現量が最も高いことが判明した。したがって、CAR 細胞は ER α を介したエストロゲン作用により骨折治癒を制御する可能性が高いと考えられるが、CAR 細胞に対するエストロゲン作用は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、間葉系間質細胞の 1 つである CAR 細胞の骨恒常性維持および骨折治癒制御機構に対するエストロゲンの作用メカニズムを解明し、新規骨折治癒促進法を開発することとした。

3. 研究の方法

(1) マウスの作出

CAR 細胞特異的にタモキシフェン誘導型の Cre を発現するマウス (*Ebf3-CreERT2*) と ER α flox (*ER α ^{L2/L2}*) マウスを交配し、CAR 細胞特異的 ER α 欠損マウス (*Ebf3-CreERT2;ER α ^{L2/L2}; cKO*) を作出した。そして、このマウスの 6 週齢時にタモキシフェン (TMX) を腹腔内投与し、ER α 遺伝子欠損を誘導した。

(2) 骨恒常性の評価

(1) のマウスの脛骨および大腿骨を採取し、DXA による骨密度測定、 μ CT による骨構造解析を実施した。

(3) 骨折治癒過程の評価

(1) のマウスの脛骨に骨折処置を行い、10 日後及び 14 日後に脛骨を回収し、骨折治癒過程の変化を μ CT による骨構造解析にて評価した。

(4) 免疫染色

骨髄や骨折部位の CAR 細胞の局在を観察するために免疫蛍光組織化学染色を行なった。*Ebf3-CreERT2;ROSA-EGFP* マウスの骨折処置を施した脛骨を採取し、4%PFA で一晩固定した後、0.5 MEDTA で 2 週間脱灰を行ない、パラフィン切片を作成した。切片は賦活化溶液を用いて 90°C、45 分間の賦活化を行い、1 時間のブロッキング後、1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。翌日、2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、観察を行なった。抗体は、Anti-GFP (598, MBL) を使用した。

(5) CAR 細胞の単理

(1) と同様のマウスの無処置の脛骨からフローサイトメトリー法を用いて CAR 細胞 (CD31⁻, CD45⁻, Sca1⁻, PDGFR β ⁺) を単離した。抗体は、CD31 (102406, BioLegend)、CD45 (103108, BioLegend)、Sca1 (122508, BioLegend)、PDGFR β (BAF1042, R&D Systems) を用いた。

(6) 遺伝子発現解析

単離した CAR 細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成した。この cDNA を用いて RT-qPCR を行ない、遺伝子発現量を評価した。ハウスキーピング遺伝子として *Rpl13a* を使用した。

4. 研究成果

骨折部位へのCAR細胞の動員を確認するために、完全骨折処置を施した *Ebf3-CreERT2;ROSA-EGFP* マウスの脛骨の免疫染色にて、GFP陽性細胞の局在を確認した(図1)。その結果、GFP陽性細胞は骨髄だけでなく、骨膜側にも広がり、CAR細胞が仮骨の形成に寄与していることが考えられた。

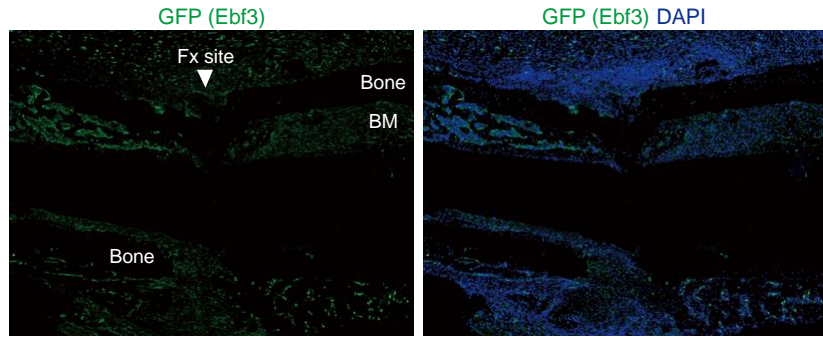


図1. *Ebf3-CreERT2;ROSA-EGFP* マウスの脛骨骨折部位の免疫染色

次に、CAR細胞特異的な $ER\alpha$ の欠損が、骨折治癒に及ぼす影響を調べるために、10週齢でTMXを投与した *Ebf3-CreERT2;ER\alpha^{lox/lox}* マウス及びコントロールマウスに完全骨折処置を施し、仮骨量の比較を行なった(図2A)。骨折処置後10日及び14日の仮骨量は、いずれにおいても群間で差を認めなかった(図2B, C)。

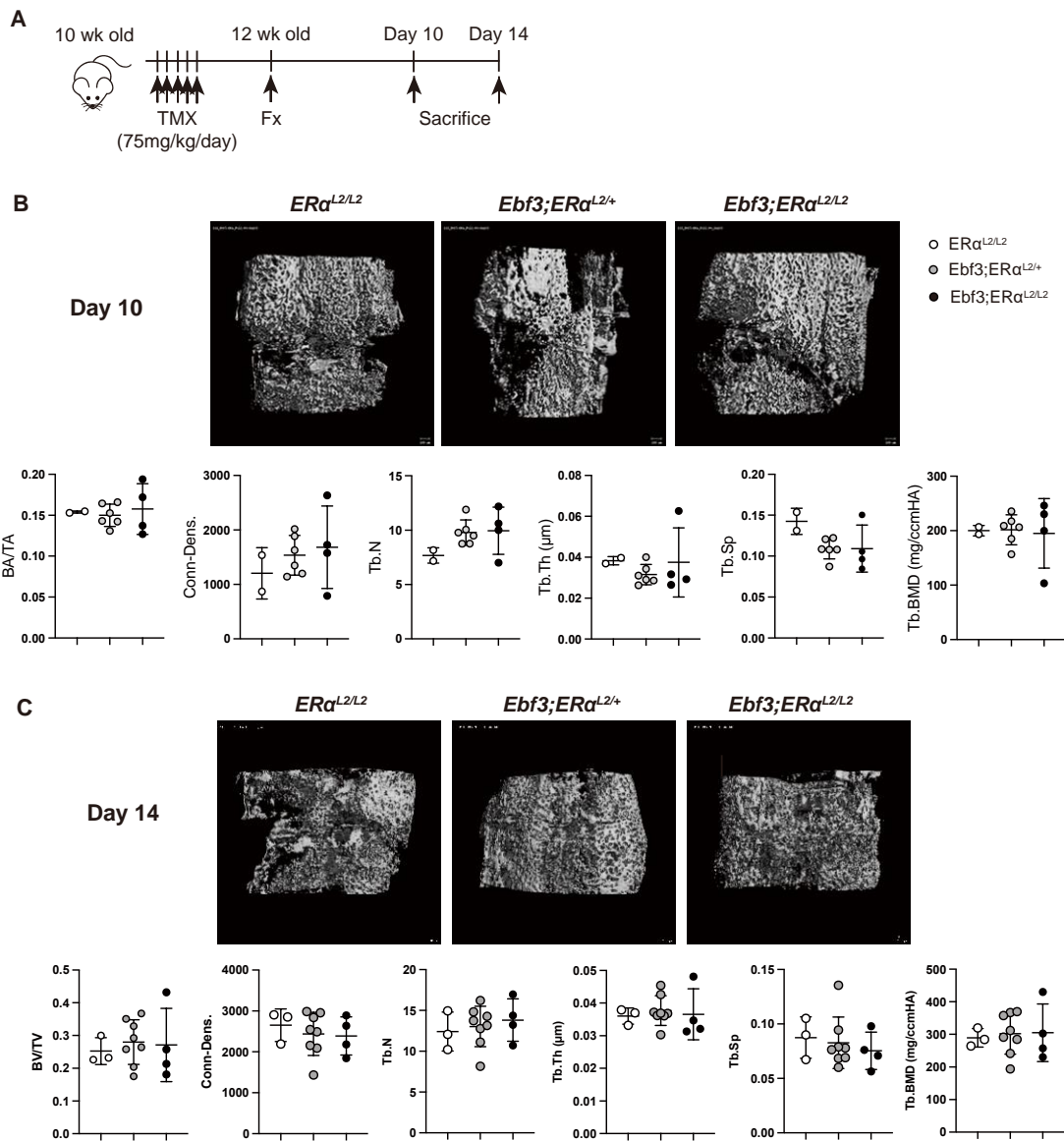


図2. 骨折処置10及び14日後の仮骨量 (A) 実験プロトコル (B) 骨折処置10日後の骨折部位の画像と仮骨量データ (C) 骨折処置14日後の骨折部位の画像と仮骨量データ。仮骨量 (BV/TV)、連結性密度 (Conn-Dens)、Structure model index (SMI)、骨梁数 (Tb.N)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁間隔 (Tb.Sp)、骨密度 (Tb.BMD)

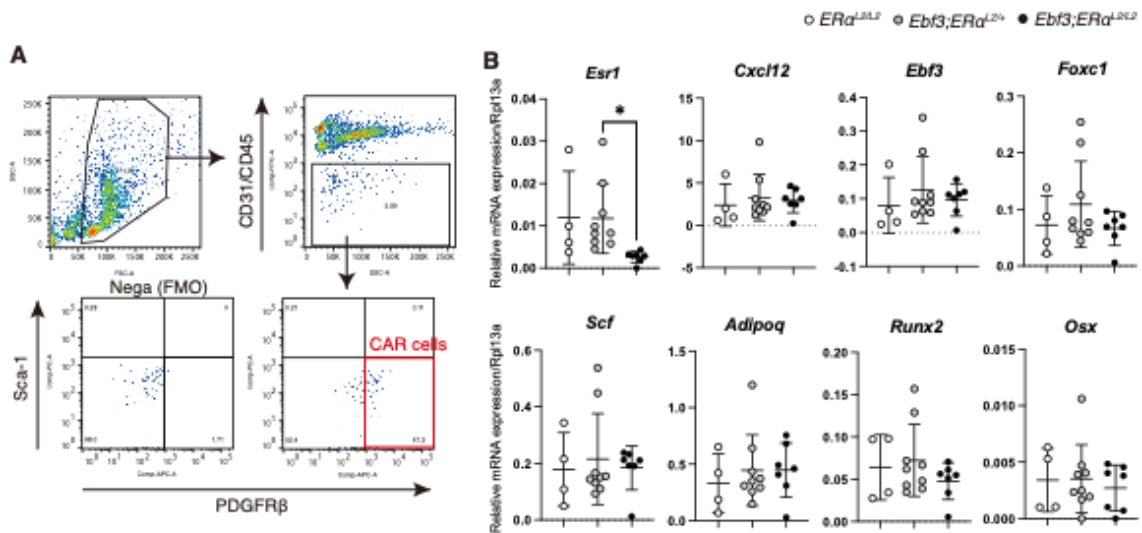


図 3. cKO 及び CON マウスから単離した CAR 細胞の遺伝子発現 (A) セルソーティングゲート (B) CAR 細胞の各遺伝子発現量

さらに、骨折処置をしたマウスの無処置の反体脚の骨から、セルソーターを用いて CAR 細胞を単理し、各遺伝子発現の変化を確認した (図 3 A)。 *Esr1* の発現量は、cKO で有意に低下していることが確認された。一方で、CAR 細胞の主要なマーカー (*Cxcl12*, *Scf*) 及び、骨芽細胞及び脂肪細胞への分化を調節する遺伝子 (*Ebf3*, *Foxc1*, *Adipoq*, *Runx2*, *Osx*) の発現には各群で差を認めなかった (図 3 B)。

以上の結果から、当初計画していたシングルセル RNA シーケンスの実施を見送ることとした。本研究では、CAR 細胞特異的に $ER\alpha$ 欠損させた時の骨折治癒への影響を検出することができなかった。しかし、骨折治癒に関わる間葉系幹細胞は、骨膜や成長板にも存在するため、これらの細胞が CAR 細胞における $ER\alpha$ 欠損の影響をマスクしている可能性も考えられた。

他方で、10 週齢で TMX を投与し、骨折をさせず 23 週齢で脛骨及び大腿骨を採取して解析を行ったところ、cKO マウスでは、CON と比較して、脛骨及び大腿骨の骨密度が有意に低いことが示された。さらに骨髓脂肪量を評価したところ、cKO マウスでは有意な増加が認められた。今後は、この表現型について詳細な検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------