

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19554

研究課題名(和文)骨細胞における新規力学感知分子の探索を基盤にした骨恒常性の解明

研究課題名(英文) Identification of novel mechano-sensing molecule for osteocyte

研究代表者

中島 友紀(Nakashima, Tomoki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00346959

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)：骨基質内に埋め込まれた骨細胞は骨を構成する細胞の大多数を占め、その細胞突起で骨内の骨細胞同士、そして、骨表面の破骨細胞や骨芽細胞とも密接な細胞間ネットワークを形成している。従って、骨細胞が力学的刺激やホルモンなど生理活性物質の感知と応答を担う“司令細胞”と考えられている。しかし、骨細胞が如何にして力学的な環境変化を感知し応答反応へと繋げ、骨恒常性を制御しているか、その全貌解明にはいまだ至っていない。本研究提案では、骨細胞の力学的刺激の感知機構を解き明かすことで、動的な骨恒常性の学問的な理解の深化から、骨疾患制御法の分子基盤の確立へ道をつける。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動など力学的刺激が骨を強くする一方で、宇宙空間や寝たきり状態では速やかに骨は脆弱になることを、我々は経験的に理解している。しかし、骨がどのように力学的刺激を感知し応答反応に繋げ、骨の動的な恒常性を維持しているのか？いまだ不明な点が多い。骨細胞は力学的な環境変化やホルモン刺激を感知し、相反する機能である骨破壊と骨形成の双方を応答分子の発現により制御している。従って、力学感知分子の同定が必須であるにも関わらず、いまだ未開拓の研究領域である。この重要な問題の解決を試みる本研究は、世界レベルで先駆的で挑戦的な取り組みであり、その成果は骨の恒常性とその破綻機構の統合的な理解に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Osteocytes embedded in the bone matrix account for the majority of the cells that constitute the bone tissue, and their cell projections form a close intercellular network between osteocytes in the bone and osteoclasts and osteoblasts on the surface of the bone. Therefore, osteocytes are considered to be “Commander cells” responsible for sensing and responding to physiologically active substances such as mechanical stimuli and hormones. However, how osteocytes perceive mechanical environmental changes, link them to responses, and control bone homeostasis has not yet been elucidated. In this research proposal, to elucidating the mechanism of mechano-sensing in osteocytes, we will deepen the academic understanding of dynamic bone homeostasis and establish a molecular basis for treatment strategies of bone disease.

研究分野：骨生物学、運動器科学

キーワード：骨細胞 力学感知分子 網羅的機能スクリーニング 骨細胞特異的ラベリングマウス シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

19世紀に「骨は力学的環境に適した量と形状に調節される; Wolffの法則」と提唱されて以来、運動など力学的な負荷刺激が骨を強くする一方で、宇宙空間や寝たきり状態では速やかに骨は脆弱になることを、我々人類は経験的に理解している。しかし、骨がどの様に力学的刺激を感知し応答反応に繋げ、骨の動的な恒常性を維持しているのか? いまだ不明な点が多い。

骨細胞は、力学的な環境変化やホルモン刺激を感知し、相反する機能である骨破壊と骨形成の双方を応答分子の発現により制御している。PTH やエストロゲンなどのホルモンとその受容体の研究から骨恒常性の研究は著しく前進し、治療戦略としても実装されている。しかし、環境変化に伴いそれを感知し、骨恒常性を司る力学感知分子の同定および研究が必須であるにも関わらず、いまだ未開拓の研究領域である。さらに、骨研究領域において、これまで骨細胞に特異的な発現分子と考えられてきた *Dmpl* や *Sost* が、筋肉、脳、腸管など多臓器への発現が報告され、これら遺伝子のプロモーターを用いた遺伝子改変マウスの研究成果に世界レベルで重大な意義が生じている。

2. 研究の目的

生体支持の基軸である骨は、動的な恒常性を保ちながら生涯を通じて生れ変わっている。骨の恒常性は、骨表面の“実行細胞”である破骨細胞の骨破壊で古い骨が除去した後、骨芽細胞によって新たな骨形成で充填され維持されている。骨基質内に埋め込まれた骨細胞は骨を構成する細胞の90%の大多数を占め、その細胞突起で骨内の骨細胞同士、そして、骨表面の破骨細胞や骨芽細胞とも密接な細胞間ネットワークを形成している。従って、骨細胞が力学的刺激やホルモンなど生理活性物質の感知と応答を担う“司令細胞”として、骨の恒常性を制御していると考えられている。実際、力学的な環境変化やホルモン刺激に骨細胞が応答し発現する骨破壊分子 *RANKL* や骨形成抑制分子 *SOST* を標的とした抗体医療は、骨粗鬆症など骨疾患治療に福音を齎している。しかし、骨細胞が如何にして力学的な環境変化を感知し応答反応へと繋げ、骨恒常性を制御しているのか? その全貌解明にはいまだ至っていない。本研究提案では、骨細胞の力学的刺激の感知機構を解き明かすことで動的な骨恒常性の学問的な理解の深化を試みることを目標とした。

3. 研究の方法

骨細胞の応答分子は、発現プロファイルの変化(上昇や低下)を基盤に探索されてきた。一方、感知分子(チャネル、受容体、接着因子など想定)は、発現変動が観られない可能性があるため、その探索には網羅的な機能スクリーニング系の確立が鍵となる。骨細胞の応答分子 *RANKL* や *SOST* は、力学的な環境変化で発現制御されていることが生体レベルでも明らかにされている。従って、本研究提案では、*RANKL* や *SOST* 遺伝子に蛍光および発光タグを融合させた新規骨細胞株をゲノム編集技術で樹立し、力学的な環境変化に伴う応答分子発現の可視化・定量化を実現する。さらに、レンチウイルスを用いた *siRNA* ライブラリーによる全遺伝子ノックダウン実験から、力学的な環境変化に伴う標識応答分子の挙動変化を指標に感知分子の同定に繋げる。

申請者は、以前、大規模な細胞リミテイングダイリューション法を用いて新規骨細胞細胞株の樹立(*IDG-SW3/1G9*)を樹立し、力学的な感知受容体のゲノムワイドな発現遺伝子データベース解析を展開した。そして、骨芽細胞における力学的刺激を *Piezo1* が感知し、*Sost* の発現制御をしていることを見出した(*BBRC2020*)。上記、網羅的機能スクリーニングに加え、これまでの網羅的な骨細胞遺伝子発現プロファイリング情報を統合することで、世界に類をみない“骨細胞の力学感知・応答分子データベース”の構築を試みた。

4. 研究成果

機能的な大規模スクリーニングを実現するため、本研究提案では、骨細胞応答遺伝子に蛍光および発光タグを融合させた新規骨細胞株をゲノム編集技術で樹立し、力学的な環境変化に伴う応答分子発現の可視化・定量化を実現した。*Sost* 遺伝子に蛍光タグ(*DsRed*)をノックインした骨細胞をゲノム編集技術で樹立した。これまでに、力学的刺激下に応答し、*Sost* 発現は低下することが知られている。本研究で構築した *Sost-DsRed* 遺伝子を持つ骨細胞は、力学的な刺激に伴い、その蛍光強度を低下させることを見出された。この蛍光強度の変化を *FACS* 解析で鋭敏に検出および細胞分画の分離ができるため、*siRNA* ライブラリーによる全遺伝子ノックダウン実験の1次スクリーニングの基盤が確立された(未発表データ: 図1)。さらに、*Sost* に *HiBiT* 発光タグをノックインした骨細胞も樹立された。*Sost-HiBiT* 細胞は、骨細胞への分化に伴い培養液中に *Sost-HiBiT* タンパク質を分泌することが確認された。さらに、力学的負荷に伴い、そのタンパク質レベルでの発現低下が見出された(未発表データ: 図2)。この2次スクリーニング系の樹立から、

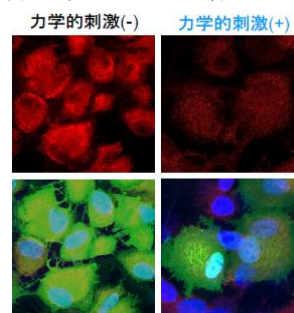


図1: 骨細胞のSost-DsRed発現変化

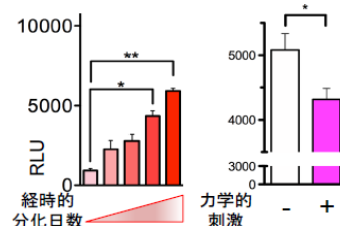


図2: 骨細胞のSost-HiBiT発現変化

力学的な環境変化に伴う標識応答分子の挙動変化を指標に感知分子の同定戦略が確立されたと言える。さらに、新規マルチウェルプレート伸展培養およびライブセルイメージングシステムの開発も完成した（未発表データ）。

また、重要なことに、以前同定した骨細胞の力学感知受容体 *Piezo1* の発現が、骨の部位によって異なることも見出された（未発表データ：図3）。頭蓋骨および四肢の骨に存在するほとんどの骨細胞が *Sost* を発現していた。しかしながら、力学感知分子 *Piezo1* は力学的刺激が大きく骨量や強度が必要とされる大腿骨などに発現が限局され、力学的刺激が小さい頭蓋骨では、その発現がほとんど認められていない（未発表データ：図3）。従って、上流の感知分子の選択的な発現局在が、骨形成を誘導する骨細胞を規定し骨恒常性を決定している可能性が強く示唆された。実際、宇宙空間など力学的な刺激がない状態では、大腿骨など四肢の骨量や構造は低下する一方で、頭蓋骨はほとんど影響を受けないことが知られている。そこで、以前プロファイリングした骨細胞に発現する *Piezo1* 以外の力学感知に関する候補遺伝子をゲノム編集で遺伝子ノックアウト(KO)細胞を樹立し、解析をしたところ、*Piezo1* と異なる力学感知分子として *P2x4* 遺伝子の重要性が見出されてきた。*P2x4* を KO した骨細胞では、力学シグナル経路の分子として知られる *COX2* (*Ptgs2* 遺伝子) の発現誘導が生じないことが明らかになった（未発表データ：図4）。この結果は、*P2x4* が骨細胞における新たな力学感知受容体として、*Piezo1* と異なる力学シグナリング経路を形成し、骨恒常性を制御している可能性を示唆している。

申請者は世界に先駆け構築した骨細胞の高純度単離・培養系（*Nat Med* 2011, *Nature* 2012, *Cell Metab* 2019, *Endocrinology* 2022）をプラットフォームに、単離骨細胞のゲノムワイドな遺伝子発現と全身臓器の発現遺伝子データベースから、新たな骨細胞特異的な遺伝子を同定した。この遺伝子特異性を活用した次世代 Cre マウスを樹立し、dTomato レポーターマウスとの交配による骨細胞特異的ラベリングマウスの作出から、骨細胞シングルセル解析の予備実験にも成功した（未発表データ）。そして、細胞の力学的な感知分子のゲノムワイドな発現遺伝子発現情報も集積している（*BBRC* 2020）。本研究で基盤を構築した上記、網羅的機能スクリーニングの情報を、これまでの網羅的な骨細胞遺伝子発現のプロファイリング情報に統合することで、世界に類をみない“骨細胞の力学感知・応答分子データベース”構築が実現することに期待が持たれる。

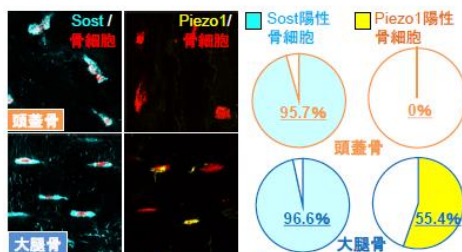


図3: 骨部位特異的な骨細胞応答・感知分子の差異

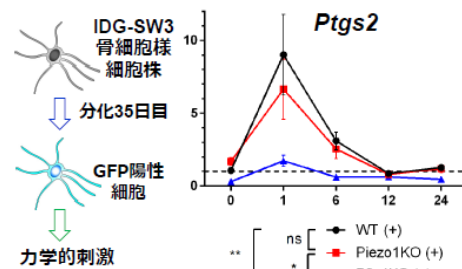


図4: 新たな骨細胞感知分子の同定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liu Lin, Koike Hiroyuki, Ono Takehito, Hayashi Shinichiro, Kudo Fujimi, Kaneda Atsushi, Kagechika Hiroyuki, Manabe Ichiro, Nakashima Tomoki, Oishi Yumiko	4. 巻 118
2. 論文標題 Identification of a KLF5-dependent program and drug development for skeletal muscle atrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2102895118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2102895118	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 e150274
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 Guo L, Iida A, Bhavani G, Gowrishankar K, Wang Z, Xue J, Wang J, Miyake N, Matsumoto N, Hasegawa T, Iizuka Y, Matsuda M, Nakashima T, Takechi M, Iseki S, Yambe S, Nishimura G, Koseki H, Shukunami C, Girisha K, Ikegawa S	4. 巻 12
2. 論文標題 Deficiency of TMEM53 causes a previously unknown sclerosing bone disorder by dysregulation of BMP-SMAD signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22340-8	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 該当する
1. 著者名 Ono Takehito, Nakashima Tomoki	4. 巻 64
2. 論文標題 Oral bone biology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 8~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.01.008	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, Komatsu Noriko, Negishi-Koga Takako, Huynh Nam Cong-Nhat, Muro Ryunosuke, Ando Yutaro, Seki Yuka, Terashima Asuka, Pluemsakunthai Warunee, Nitta Takeshi, Nakamura Takashi, Nakashima Tomoki, Ohba Shinsuke, Akiyama Haruhiko, Okamoto Kazuo, Baron Roland, Takayanagi Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Periosteal stem cells control growth plate stem cells during postnatal skeletal growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-31592-x	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 Ono Takehito, Denda Ryosuke, Tsukahara Yuta, Nakamura Takashi, Okamoto Kazuo, Takayanagi Hiroshi, Nakashima Tomoki	4. 巻 10
2. 論文標題 Simultaneous augmentation of muscle and bone by locomimimeticism through calcium-PGC-1 signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone Research	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41413-022-00225-w	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 Yamashita Yu, Hayashi Mikihiro, Saito Mitsuru, Nakashima Tomoki	4. 巻 163
2. 論文標題 Osteoblast Lineage Cell-derived Sema3A Regulates Bone Homeostasis Independently of Androgens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqac126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endocr/bqac126	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 Dong Bingzi, Hiasa Masahiro, Higa Yoshiki, Ohnishi Yukiyo, Endo Itsuro, Kondo Takeshi, Takashi Yuichi, Tsoumpra Maria, Kainuma Risa, Sawatsubashi Shun, Kiyonari Hiroshi, Shioi Go, Sakaue Hiroshi, Nakashima Tomoki, Kato Shigeaki, Abe Masahiro, Fukumoto Seiji, Matsumoto Toshio	4. 巻 13
2. 論文標題 Osteoblast/osteocyte-derived interleukin-11 regulates osteogenesis and systemic adipogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34869-3	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 該当する

1. 著者名 小野岳人、中島友紀	4. 巻 25
2. 論文標題 骨による心身の健康の維持	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FOOD STYLE21	6. 最初と最後の頁 34-37
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 小野岳人、中島友紀	4. 巻 81
2. 論文標題 骨粗鬆症における骨代謝回転	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 58-63
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 小野岳人、中島友紀	4. 巻 38
2. 論文標題 骨のメカノバイオロジー	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BIO Clinca	6. 最初と最後の頁 21-25
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 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 14件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨リモデリングの制御機構の解明
3. 学会等名 第10回県央骨粗鬆症研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨恒常性の制御機構の解明
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会・第5回国際会議（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨リモデリングの制御機構
3. 学会等名 第36回日本整形外科学基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨細胞が、力を感じて応える仕組み
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 性ホルモン欠乏性骨粗鬆症の発症メカニズムと最先端治療戦略の確立
3. 学会等名 第23回日本骨粗鬆症学会・第39回日本骨代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨恒常性の制御機構
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林幹人、土谷洋輔、中島友紀
2. 発表標題 ロイヤルゼリーに含まれる10H2DAIはFFAR4を介してNF-kB活性化と破骨細胞を抑制することで閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける骨量を維持する
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨細胞と骨リモデリング
3. 学会等名 第41回日本骨形態計測学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下祐、林幹人、中島友紀
2. 発表標題 骨芽細胞由来Sema3Aはアンドロゲン非依存的に骨恒常性を制御する
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 中島友紀
2. 発表標題 運動器の基軸である骨と筋肉による臓器連環
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 サイトカインによる骨リモデリングの制御機構
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨恒常性の制御機構の解明
3. 学会等名 徳島大学大学院骨・Caクラスター・ミニリトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松紀子、Stephanie Win、Minglu Yan、Nam Cong-Nhat Huyn、塚崎雅之、寺島明日香、中島友紀、高柳広
2. 発表標題 自己免疫性関節炎における傍関節性骨粗鬆症のメカニズム
3. 学会等名 第7回日本骨免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 劉 安豪、林幹人、土谷洋輔、岩田隆紀、中島 友紀
2. 発表標題 新規マウス歯周炎モデルによる歯周炎発病過程の時空間解析
3. 学会等名 第7回日本骨免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨リモデリングの制御機構の解明
3. 学会等名 第28回城北リウマチ膠原病医会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨と筋肉の連環制御機構の解明
3. 学会等名 第21回運動器科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 運動器恒常性と運動ベネフィットの制御法の開発
3. 学会等名 2022年度生理学研究所研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 筋肉と骨の両方を強くし運動機能を向上させる運動模倣療法の創成
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨リモデリングの制御機構の解明
3. 学会等名 第32回日本リウマチ学会関東支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 骨リモデリングの制御機構の解明
3. 学会等名 第48回長崎骨粗鬆症研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島友紀
2. 発表標題 運動器リモデリングの制御機構
3. 学会等名 第3回SAMURAI研究会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------