

令和 5 年 6 月 14 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：21K19555

研究課題名（和文）骨細胞による養育制御

研究課題名（英文）Regulation of nurturing by osteocytes

研究代表者

林 幹人（HAYASHI, Mikihiro）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：50581914

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）：近年、骨細胞が他臓器制御に関わることが明らかになってきたが、それらの実態は不明な点が多く残されているのが現状である。本研究では、新たに作製した骨細胞特異的Cre発現マウスを用いて骨細胞を欠失させた。予備的実験においては母性行動への影響が観察されていたが、レトリビング試験や内側視索前野を含む領域におけるFos発現、さらに予備的検討で観察されていた母性行動異常についてもNを増やすと有意差が観察されなくなった。また、in vivo代謝ラベリングにより脳における骨細胞由来分子の同定を行ったところ、多数のサイトカイン・増殖因子を含む骨細胞由来液性因子が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、骨細胞や骨芽細胞が産生し他臓器に作用する複数の分子が同定されているが、in vivoでの網羅的なスクリーニングによるものではなく、in vitroでの発現プロファイルや機能既知分子であることに依るものであった。本研究では真に骨細胞特異的に、in vivoでしかも代謝ラベリングによるタンパク質レベルでの特定臓器における網羅的・誘導性発現解析・同定を行うことができる方法を確立した。このことにより、さらなる骨細胞による他臓器制御メカニズムに迫ることが可能となった。

研究成果の概要（英文）：In recent years, it has become clear that osteocytes are involved in the regulation of other organs, but the mechanisms of their regulation remain largely unknown. In this study, osteocytes were inducibly deleted using newly generated osteocyte-specific Cre-expressing mice. Although effects on maternal behavior were observed in preliminary experiments, no significant differences were observed in the retrieval test, Fos expression in the region including the MPOA, and maternal behavioral abnormalities when N was increased. In addition, in vivo metabolic labeling using osteocyte-specific Cre mice identified osteocyte-derived molecules in the brain, including cytokines and growth factors.

研究分野：骨生物学

キーワード：骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨は構造的堅牢性やミネラル代謝恒常性を維持するため、骨吸収と骨形成によってダイナミックに生まれ変わることで力学的刺激に対し組織レベルで適応・修復している。この一連の機構が破綻すると骨の異常だけでなく様々な他臓器での異常が引き起こされることが知られており、骨恒常性の維持が全身性の臓器制御機構に関連すると考えられている。すなわち、骨は単なる運動器の一部として働くだけにとどまらず、全身の臓器・細胞制御に能動的に関わることが明らかになってきた。これらのプロセスに主に関わると考えられる細胞が骨形成を担う骨芽細胞が最終分化し骨基質中に埋まった細胞が骨細胞である。しかしながら、骨細胞による他臓器制御の実態や、それらによる制御メカニズムは不明な点が多く残されているのが現状である。本研究では骨細胞による他臓器制御のうち、予備的実験で有意差のあった母性行動への影響についての研究を進めることとした。

2. 研究の目的

これまで骨細胞特異的 Cre マウスとして世界的に広く用いられてきたがその特異性に問題のある *Dmp1*-Cre ではなく、我々が新たに作製した真に骨細胞特異的な Cre 発現マウス (後述) を用いて、Cre 依存的ジフテリア毒素受容体発現マウス (iDTR マウス) と交配することで骨細胞特異的 DTR 発現マウスを作製し、ジフテリア毒素を投与して誘導性に骨細胞を特異的に欠失させた。その結果、骨細胞欠失母マウスの母性行動への影響が観察されたことから、本研究では骨細胞による母性行動への関与を詳細に検討し、明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞欠失モデル解析による骨細胞の母性行動に対する影響の解明

我々は *Dmp1*-Cre により EGFP を発現させた遺伝子改変マウスの骨から骨細胞を多く含むポピュレーションの分取に成功し、それらの網羅的遺伝子発現プロファイリングや骨の免疫染色、各種データベース等の解析から、真に骨細胞特異的に発現する遺伝子を同定し、その遺伝子座に Cre 遺伝子をノックインすることで、*Dmp1*-Cre マウスに代わる真に骨細胞特異的な Cre ノックインマウスをすでに樹立している。これらのマウスにおいては、*Dmp1*-Cre マウスで観察されるような後期骨芽細胞や骨格筋、小脳、消化管など、調べる限りすべての組織での非特異的な発現は観察されず、骨細胞特異的な loxP 組み換えが誘導できることを確認している。

本研究では、新規骨細胞特異的 Cre 発現マウスと iDTR マウスを交配することで骨細胞特異的 DTR 発現マウスを作製し、ジフテリア毒素を投与して誘導性に骨細胞を特異的に欠失させ、その母性行動に対する影響を詳細に解析する。

(2) 新規骨細胞特異的 Cre 発現マウスを用いた骨細胞特異的代謝ラベリング法による in vivo での骨細胞産生性分子の同定

(1) で骨細胞の母性行動に対する影響の詳細が明らかになれば、Cre 発現細胞でのみ選択的にメチオニル tRNA 合成酵素の変異型を発現するマウスによって代謝ラベリングを行う。この変異酵素を発現する細胞では、タンパク質合成の際メチオニンの代わりに天然には存在しない人工アミノ酸である 6-アジドノルロイシン (An1) が取り込まれることで標識が可能となる。An1 が取り込まれたタンパク質は生体直交性を有しており、生体反応・機能を攪乱しないことがわかっており、骨組織や脳などのタンパク質ホモジネートにクリックケミストリーと呼ばれる手法 (2022 年のノーベル化学賞を受賞した Sharpless 教授らが開発した方法) を用いて An1 のアジド基にビオチンなどのタグを簡便かつ特異的に導入することが可能となる。タグを用いて精製すれば骨細胞産生性分子の選択的な解析・同定も可能で、さらにこの実験系は誘導性であることから、経時的に変化するような分子の網羅解析を経時的に行うことが可能である。

4. 研究成果

新規骨細胞特異的 Cre ノックインマウスにより骨細胞欠失マウスを作製しその特異性を検討したところ、骨芽細胞、骨格筋、消化管、脳などではジフテリア毒素による直接的な影響がなく、骨細胞のみを選択的に欠失させられていることが確認された。これらのマウスを用い出産後の養育行動評価を行ったところ、予備的検討において母性行動異常をみとめた (育児放棄率がコントロールと比較して有意に高かった)。他の養育行動に関連する仔マウスの発生や母マウスの乳腺形成・乳汁分泌には影響がなかった。そこで、さらなる実験条件の検討や母性行動の詳細な解析を行うため、レトリービング試験を行った。しかしながら、スニフティング、レトリービング、グルーピングおよびクラウチングのいずれの評価も有意差が認められなかった。また、内側視索前野を含む領域における Fos 発現にも差がなく、さらに、予備的検討で観察されていた母性行動

異常についても N を増やすと有意差が観察されなくなってしまった。この結果に至ってしまった要因は様々考えられるが、骨細胞欠失により社会性ストレスへの感受性が増加することが一因ではないかと示唆された。実際に、骨細胞も含めた骨芽細胞系列細胞が産生するオステオカルシンが急性ストレス惹起後の情動行動に影響することが報告されており (Berger JM, et al., Cell Metab, 2019)、骨芽細胞系列細胞とストレスの関連が示されている。

また、骨細胞特異的 Cre マウスを用いた *in vivo* 代謝ラベリングのため、骨細胞特異的変異型メチオニル tRNA 合成酵素発現マウスを作製し、An1 投与のスケジュール・回数・解析タイミングについての条件最適化を行った。解析 2 週間前より無メチオニン食に変更し、解析 1 週間前から An1 連日投与を行うことで骨細胞で発現するタンパク質の特異的ラベリングとそれらの全身多臓器への伝播を検出することが可能となった。これらのマウス由来の脳からタンパク質を抽出し、クリックケミストリーを用いて An1 のアジド基にビオチンタグを導入した。さらに、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いて標識タンパク質の濃縮を行い、ウエスタンブロッティングで標識・精製が成功していることを確認した上で、DIA-MS/MS 解析により脳における骨細胞由来分子の同定を行った。その結果、多数のサイトカイン・増殖因子を含む骨細胞由来液性因子が同定された。さらに、妊娠を含めた様々な条件・モデルでの検討を行い、外的環境に応じた骨細胞由来液性因子の脳を含めた多臓器における顕著な変動が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 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/endo/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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林幹人、土谷洋輔、永松剛、中島友紀
2. 発表標題 ロイヤルゼリー構成成分10-ヒドロキシ-2-デセン酸はFFAR4を介したNF-κB抑制により骨量減少を抑制する
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 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10-ヒドロキシ-2-デセン酸はFFAR4を介してNF-κB活性化および破骨細胞分化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

〔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
---------	---------