

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20975

研究課題名（和文）細胞外小胞を介した骨芽細胞間ネットワークによる骨代謝制御機構の解明

研究課題名（英文）The communication system of osteoblasts via extracellular vesicles controls bone metabolism

研究代表者

上中 麻希 (Uenaka, Maki)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：90468265

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）：本研究では、細胞外小胞を介した骨芽細胞間ネットワークが、骨形成期を時空間的に制御していると仮説を立て実験を行った。具体的には分化前期と分化後期の骨芽細胞から、それぞれ細胞外小胞を回収し、骨芽細胞の分化や機能にどのような影響があるかを調べ、骨芽細胞の分化と機能に対する影響を調べたところ、分化前期と後期の小胞では違う機能を持つことを明らかにした。また細胞外小胞に含まれるmiRNAとタンパク質について網羅的な解析を行い、その機能のメカニズムを探索した。本研究より骨芽細胞由来細胞外小胞を介した骨芽細胞間ネットワークが、骨形成を制御してい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

この骨代謝サイクルを適切に回すことは健康に生きていく上で重要であり、その制御機構の解明は骨疾患治療法開発において不可欠である。本研究では高解像二光子励起生体イメージング技術を用い、生体内骨組織において細胞外小胞を介した骨芽細胞ネットワークがあることを発見し、このネットワークが骨形成期における骨芽細胞間の時空間的な制御因子となっている可能性について明らかにした。本研究は、これまで局所制御が困難であった骨代謝を時空間的に制御することで、将来的には、外傷を含めた骨代謝関連疾患のオーダーメイド治療へ応用することを目指している。

研究成果の概要（英文）：Bone formation by osteoblasts is a long-lasting phase that may last several months and is tightly regulated during bone remodeling. Although the signaling and transcriptional regulation of osteoblast differentiation have been investigated, the controlling factors of these signaling remain elusive. We hypothesized the osteoblast network via extracellular vesicles regulates bone formation spatiotemporally. In this study, we focused on the function of osteoblast-derived extracellular vesicles and elucidated the different functions of extracellular vesicles between pre-osteoblast and mature osteoblasts. Furthermore, we conducted proteomics and RNA-sequencing analysis of extracellular vesicles from different phases of bone formation to extract the candidates of the controlling mechanism.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨芽細胞 細胞外小胞 骨代謝 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨代謝制御機構の解明は骨関連疾患の治療法開発において不可欠であり、これまで骨吸収から骨形成への移行シグナルや、各々を担う破骨細胞や骨芽細胞の分化メカニズムについては様々な分子が同定されてきた。一方で、骨芽細胞が集団を形成し一丸となって行う骨形成が、時空間的にどのように制御され、次の骨吸収期へ移行するのか未だ不明な点が多い。

また本申請者はこれまで、生体内において「細胞外小胞を介した骨芽細胞間ネットワーク」が存在することを発見し、このネットワークを介して新たな骨形成を抑制し破骨細胞分化を誘導することを明らかとしてきた。そしてこの「細胞外小胞を介した骨芽細胞間ネットワーク」は、骨形成を抑制するのみではなく、数ヶ月にわたる骨形成を、はじまりから終わりまで、時空間的に制御する機能を持つのではと仮説を立てた。

2. 研究の目的

そこで本研究は、「細胞外小胞を介した骨芽細胞間ネットワーク」の骨形成期全体における骨代謝制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞由来細胞外小胞の機能評価：

まず骨芽細胞培養系において、骨芽細胞の分化早期、分化後期の各段階における細胞外小胞を回収する。それぞれ分化早期、分化後期の骨芽細胞と共培養し、骨芽細胞に対する小胞の機能を遺伝子発現、石灰化能、破骨細胞分化誘導能に分けて解析した。この実験により、さまざまな分化段階における骨芽細胞に対する骨芽細胞由来細胞外小胞の機能を明らかにした。

(2) 構成因子の網羅的解析：

一般的に細胞外小胞には様々なタンパク質や脂質、RNA が含まれており、それらが別の細胞に運搬されることによって機能的変化や生理的变化を引き起こすことが知られている。分化早期と分化後期の骨芽細胞からそれぞれ細胞外小胞を単離し、内包されているタンパクや small RNA について網羅的に解析し比較することで、細胞外小胞の機能を担う因子の検索を行った。先行研究において、分化後期の骨芽細胞由来細胞外小胞に含まれる miRNA の網羅的発現解析を既に行なっており (Uenaka et al., Nat Commun, 2022) この結果と分化早期の骨芽細胞由来の細胞外小胞の結果を比較した。

(3) マウスモデルを用いた細胞外小胞の骨代謝への影響の検討：

骨芽細胞由来細胞外小胞の構成因子の解析から明らかとなった候補遺伝子のノックアウトマウスを用意し、骨代謝への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞由来細胞外小胞は分化の時期によって違う機能を持つ。

骨芽細胞分化早期の細胞外小胞は、骨芽細胞分化を促進するのに対し (図 1)、分化後期由来の細胞外小胞は、骨芽細胞分化を抑制した (図 2)。

図 1) 骨芽細胞分化早期由来の細胞外小胞 (SOV F1+F2) は、前骨芽細胞の *Runx2*, *Sp7* の発現を上昇させた。

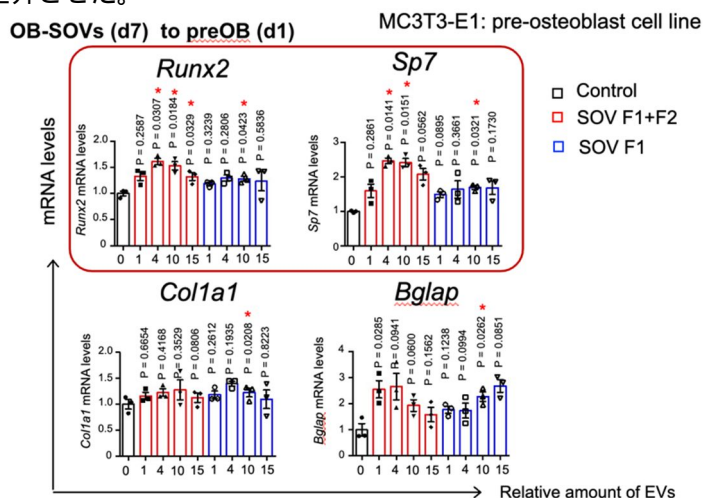
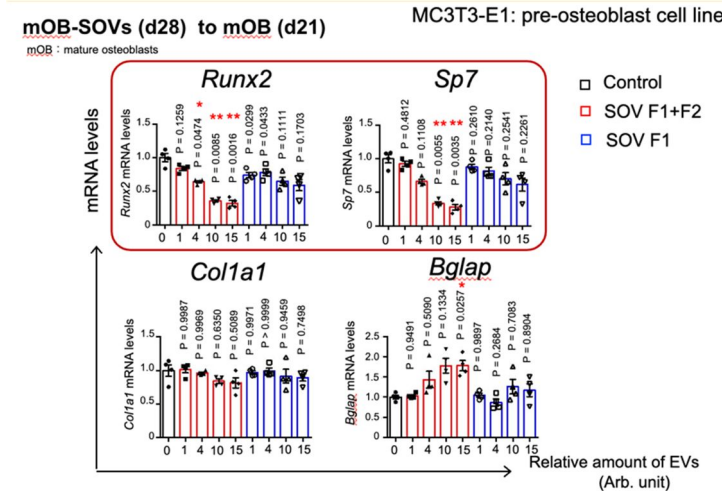
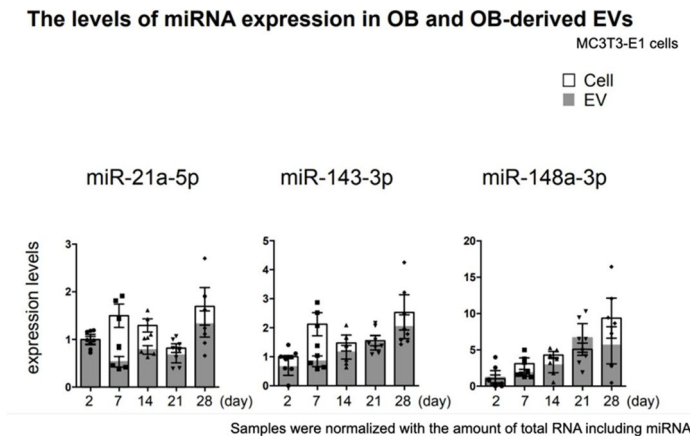


図 2) 骨芽細胞分化後期由来の細胞外小胞 (SOV F1+F2) は、成熟骨芽細胞の *Runx2*, *Sp7* の発現を抑制した。



(2) 分化早期の細胞外小胞は *miR21a-5p* を多く含み、分化後期の細胞外小胞は *miR-143-3p* および *miR148a-3p* を多く含む。

分化早期と後期由来の骨芽細胞由来細胞外小胞を網羅的に解析したところ、下記3つの miRNA を多く含んでいた。分化早期の細胞外小胞は *miR21a-5p* を多く含み、分化後期の細胞外小胞は *miR-143-3p* および *miR148a-3p* を多く含むことが明らかになった。



(3) MiR-21a および miR-148a のノックアウトマウスを作成し、マイクロ CT および骨形態計測を用いて解析を行ったところ、12 週齢オスマウスにおいて、野生型マウスに比べいずれの遺伝子ノックアウトマウスも骨量が有意に増加した。しかし、骨芽細胞のパラメーターについては、明らかな差は認めなかった。

(4) 考察

骨芽細胞由来細胞外小胞は、分化前期と後期で骨芽細胞に対する作用が異なることが明らかとなった。前期由来の小胞は、骨芽細胞の分化を促進し、後期由来の小胞は分化を抑制した。このことから、集団として働く骨芽細胞には、小胞を介して周囲の細胞と同調して分化するような機能が備わっていることが考えられた。メカニズム解析として注目した miRNA のノックアウトマウスでは、骨芽細胞に対する作用は明らかにならなかった。その原因として、いずれの miRNA も、破骨細胞に対する分化促進作用が知られており、それらの影響が考えられる。今後コンディショナルノックアウトマウスを作成し、骨芽細胞に対する作用について確かめる必要がある。今回はメカニズムまでは明らかにならなかったが、骨芽細胞は細胞外小胞を分泌し、取り込むことで互いに連絡を取り合い、長く続く骨形成期を時空間的に制御していることが考えられた。

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 上中麻希、菊田順一、石井優 | 4. 巻 1227 |
| 2. 論文標題 骨組織の動態機構とその制御 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 日本臨牀81巻増刊号1 | 6. 最初と最後の頁 64-70 |
| 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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 上中麻希、菊田順一、石井優 |
| 2. 発表標題 骨芽細胞由来の細胞外小胞は骨形成期から骨吸収期への相転換に関与する |
| 3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 上中麻希、菊田順一、石井優 |
| 2. 発表標題 骨芽細胞由来の細胞外小胞は骨形成期から骨吸収期への相転換に寄与する |
| 3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 上中麻希、菊田順一、石井優 |
| 2. 発表標題 骨芽細胞由来の細胞外小胞の骨代謝制御機能 |
| 3. 学会等名 第43回日本骨形態計測学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院医学系研究科・医学部 免疫細胞生物学教室 研究内容
<http://www.icb.med.osaka-u.ac.jp/research.html>
大阪大学大学院医学系研究科・医学部 トップ > 研究活動 > 主要研究成果 > 2022年 >
<https://www.med.osaka-u.ac.jp/activities/results/2022year/ishii2022-2-24>

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|