

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670773

研究課題名(和文)骨恒常性を司る骨細胞の分化と機能制御機構の解明

研究課題名(英文)Osteocyte differentiation and function in bone homeostasis

## 研究代表者

中島 友紀(Nakashima, Tomoki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織を構成する細胞の約90%を占める骨細胞は、骨という特殊な硬組織に埋め込まれ、骨表面の破骨細胞や骨芽細胞と密接にコンタクトし、細胞間ネットワークを形成している。この形態学的特徴から、骨の恒常性を制御する指令細胞と考えられているが、骨芽細胞から骨細胞への分化機構や、その細胞特性や機能について、いまだ不明な点が多いのが現状である。本研究では骨の恒常性を司る制御機構を解明するため、骨細胞の単離培養系の活用、また骨芽細胞からの分化系の構築から、遺伝子・タンパク質発現データベースを構築することで、骨細胞の細胞特性の理解を試みた。

研究成果の概要(英文)：Bone is constantly renewed by the balanced action of osteoblastic bone formation and osteoclastic bone resorption both of which mainly occur at the bone surface. This restructuring process called "bone remodeling" is important not only for normal bone mass and strength, but also for mineral homeostasis. Osteocytes, the most numerous and least well studied bone cells, are stellate-shaped cells enclosed within the bone lacuno-canalicular network of bone. Based on the osteocyte location within the bone matrix and the cellular morphology, it is proposed that osteocytes potentially contribute to the regulation of bone remodeling in response to mechanical and endocrine stimuli. To identify the regulation factor of osteocyte differentiation and function, we performed a genome-wide screening of osteocytes and establishment of osteocytogenesis assay system.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨生物学 骨恒常性 骨細胞

### 1. 研究開始当初の背景

骨の恒常性は、破骨細胞が骨破壊により古い骨を除去し、骨芽細胞が骨新生することで保たれている。骨細胞は、骨新生時に骨芽細胞が骨基質に埋め込まれた最終分化細胞と考えられており、骨構成細胞の約90%を占め、骨小腔に単独で存在し細胞突起により細胞間ネットワークを構成している。この骨細胞ネットワークは骨基質内の骨細胞間だけでは無く、骨表面の破骨細胞や骨芽細胞とも密接に連結していることから、骨細胞が細胞間コミュニケーションにより、骨の恒常性を制御する指令細胞である可能性が形態学的解析から推測されている。

骨表面上の破骨細胞や骨芽細胞は、1990年代から細胞培養系の確立、マウスジェネティクスを駆使した解析により、その分化機構の解明が進み、骨生物学に多くの情報を齎している。しかし、骨という特殊な硬組織に埋没した骨細胞は、単離することが難しく、これまでその細胞特性や機能について、組織学・病理学的な所見から推測される域を脱していなかった。

最近、申請者は、骨細胞だけが蛍光を発する遺伝子改変マウスを樹立し、世界に先駆け、骨細胞の高純度単離培養系を確立した。そして、骨細胞が、破骨細胞分化因子 RANKL を強力に発現し破骨細胞を誘導することを細胞および生体レベルで実証し、骨の恒常性が骨細胞によって制御されている一端を明らかにした(Nakashima et al, *Nat Med* 2011)。さらに骨細胞を含む骨形成系細胞のプロテオーム解析から、新規細胞間コミュニケーション因子の同定し、骨の恒常性における骨細胞の重要性を見出した(Hayashi and Nakashima et al, *Nature* 2012)。これら申請者の報告により、骨細胞の研究が一躍活性化することが世界レベルで期待されているが、骨細胞の分化制御と機能制御のメカニズムは、いまだ全貌の解明には至っていない。

### 2. 研究の目的

骨組織を構成する細胞の約90%を占める骨細胞は、骨という特殊な硬組織に埋め込まれ、骨表面の破骨細胞や骨芽細胞と密接にコンタクトし、細胞間ネットワークを形成している。この形態学的特徴から、骨の恒常性を制御する指令細胞と考えられているが、骨芽細胞から骨細胞への分化機構や、その細胞特性や機能について、いまだ不明な点が多いのが現状である。

本研究では骨の恒常性を司る制御機構を解明するため、骨細胞の単離培養系の活用、また骨芽細胞からの分化系の構築から、遺伝子・タンパク質発現データベースを構築することで、骨細胞の細胞特性を統合的に理解することを目標とする。

### 3. 研究の方法

骨細胞の初代培養系の確立は立ち遅れて

いたが、申請者は、骨細胞特異的遺伝子(Dmp1 Cre)マウスとCAG-CAT-EGFPマウスを交配することで、骨細胞だけが蛍光を発するマウスを樹立し、骨から酵素処理とFACSソーティングによる高純度な骨芽細胞と骨細胞の単離培養に成功した(*Nat Med* 2011)。

本研究では、この方法を用いて採取した骨芽細胞と骨細胞を実験に用いる。ゲノムワイドなトランスクリプトーム解析によって、発現遺伝子の情報を集積し、バイオインフォマティクスなデータベースを構築する。さらに本単離方法では、骨細胞(EGFP陽性)と骨芽細胞(EGFP陰性)を単離培養することが可能である。

そこで、骨芽細胞が、実際に骨細胞に分化誘導されるか明らかにするため、細胞分化スクリーニング系の確立を試みる。上記データベースで得られた機能未知な候補分子等を添加し、骨芽細胞(EGFP陰性)から骨細胞(EGFP陽性)への分化を、ビジュアル化および定量的に、最新のIn Cell Analyzer(GE社)を用いて、詳細かつ網羅的に解析することで、細胞分化を誘導する分子をスクリーニングする。バイオインフォマティクスなデータベースから得られた候補分子の機能を明らかにするために、shRNA法を用いた遺伝子ノックダウンや強制発現実験により、骨細胞の分化や機能の制御機構を解析する。上記実験により選抜された情報から、コンディショナル遺伝子欠損およびTgマウスを作成し、候補遺伝子の生体における機能欠損および亢進状態を解析することで、骨細胞の分化および機能制御機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 申請者が樹立した高純度な骨芽細胞・骨細胞の単離培養系を活用し、ゲノムワイドなトランスクリプトーム解析によって、発現遺伝子の情報を集積し、バイオインフォマティクスなデータベースを構築した(未発表データ：図1)。

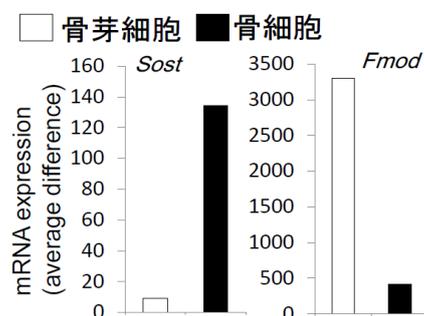


図1：骨芽細胞と骨細胞の遺伝子データベースの確立

遺伝子プロファイリングの結果、これまで報告されてきた骨細胞や骨芽細胞で特異的な遺伝子発現(Sost, Fmod etc)が確認され、本実験系が適切に機能していることが分った。さらに重要なことに、これまで不明であった骨細胞の全遺伝子情報の獲得に成功したこ

とは大きな成果である。本データベースを基盤にして、骨の恒常性における骨芽細胞と骨細胞の機能的な異なる役割を推測する予測シミュレーションや骨数理モデリングなどの研究へと繋ぐことが可能となった。さらに発現遺伝子の骨細胞における機能を明らかにするため、機能解析の構築につながり、骨恒常性における骨細胞の細胞特性を理解する足掛かりとなった。

(2) 世界に先駆け骨芽細胞から骨細胞への分化実験系を確立することに成功した(未発表データ：図2)。

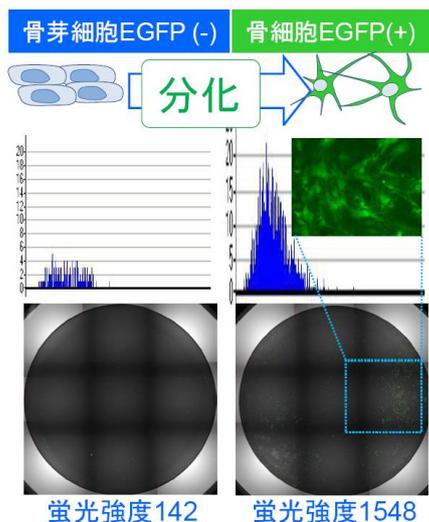


図2：新規骨細胞分化系の確立

この新規骨細胞分化系の構築は、骨芽細胞から骨細胞への分化をビジュアル化および定量化することで、様々な分子や薬剤スクリーニングを可能とした点において、大きな意味を持つ。さらに、大量に細胞数を必要とするため、これまで不可能であった網羅的なプロテオーム解析に着手することができた(未発表データ：図3)。

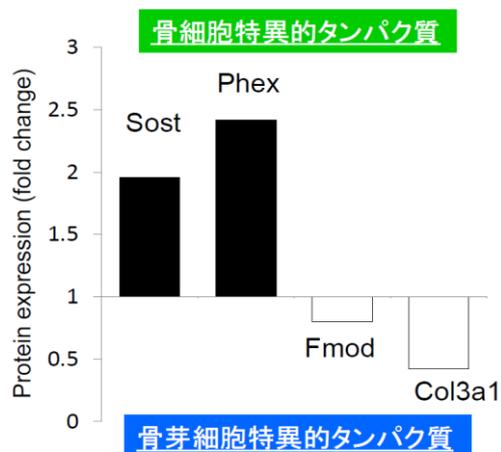


図3：骨芽細胞と骨細胞の発現タンパク質データベースの確立

本研究からこれまでに類を見ない骨芽細胞

と骨細胞の全遺伝子・タンパク質発現のプラットフォームが完成した。

(3) 骨細胞における遺伝子・タンパク質の情報のデータベースの構築から、骨恒常性を制御する新規因子の候補選抜が可能となった。現在、遺伝子改変マウスの構築に繋がり、生体レベルでの機能解析への研究ステージが移行した。さらに、世界に先駆けた情報データベースから、細胞特異的な発現分子が同定され、これまでに類を見ない細胞特異的なCre発現マウスの作成など、骨研究を発展させるデバイスの確立へと繋がっている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 38 件)

- 1) Iida A, Xing W, Docx MK, Nakashima T, Wang Z, Kimizuka M, Van Hul W, Rating D, Spranger J, Ohashi H, Miyake N, Matsumoto N, Mohan S, Nishimura G, Mortier G, Ikegawa S. Identification of biallelic LRRK1 mutations in osteosclerotic metaphyseal dysplasia and evidence for locus heterogeneity. *J Med Genet.* 2016 Apr 7. pii: jmedgenet-2016-103756 (2016). (査読有)
- 2) Ono T, Okamoto T, Nakashima T, Nitta T, Hori S, Iwakura Y, Takayanagi H. IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells enhance bone regeneration. *Nat Commun* 2016 Mar 11;7:10928. (2016) (査読有)
- 3) Guerrini MM, Okamoto K, Komatsu N, Danks L, Nakashima T, Takayanagi H. Inhibition of the TNF family cytokine RANKL prevents autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunity* 43, 1174-85 (2015). (査読有)
- 4) Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G, Nakashima T, Takayanagi H. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis* annrheumdis-2014-207137 (2015). (査読有)
- 5) Nakamura H, Nakashima T, Hayashi M, Izawa N, Yasui T, Aburatani H, Tanaka S, Takayanagi H. Global epigenomic analysis indicates protocadherin-7 activates osteoclastogenesis by promoting cell-cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 455, 305-11 (2014). (査読有)
- 6) Okura H, Sato S, Kishikawa S, Kaneto S, Nakashima T, Yoshida N, Takayanagi H, Kiyono H. Runx2-I Isoform Contributes to Fetal Bone Formation Even in the Absence of Specific N-Terminal Amino Acids. *PLoS One* 9, e108294 (2014). (査読有)
- 7) Komatsu N, Okamoto K, Sawa S,

- Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3<sup>+</sup> T cells into T<sub>H</sub>17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 20, 62-68 (2014). (査読有)
- 8) O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone* 54(2), 258-263 (2013). (査読有)
- 9) 中島友紀: 骨リモデリングと歯周組織の恒常性 *CLINICAL CALCIUM* 25 (8)1220-1228 (2015) (査読無)
- 10) 中島友紀: 骨破壊における RANK/RANKL 分子リウマチ治療 8 (3)44-48 (2015) (査読無)
- 11) 中島友紀: 骨細胞の多彩な機能 *CLINICAL CALCIUM* 25 (6)899-905 (2015) (査読無)
- 12) 中島友紀: 骨研究の最前線～骨を基軸とした多臓器連関システム *FOOD STYLE21* 19(6)44-47 (2015) (査読無)
- 13) 中島友紀: 破骨細胞研究と骨免疫学 *日本臨床免疫学会会誌* 38 (1)17-25 (2015) (査読無)
- 14) 中島友紀: 骨細胞による骨リモデリングの制御 *CLINICAL CALCIUM* 25 (1) 21-28 (2015) (査読無)
- 15) 中島友紀: 破骨細胞研究からみた骨破壊治療の新展開 *リウマチ科* 52 (6) 655-662 (2014) (査読無)
- 16) 中島友紀: 骨細胞による骨代謝調整 *Bio Clinica* 30 (1) 28-32 (2015) (査読無)
- 17) 中島友紀: 骨と筋肉との相互連関 *Medical Practice* 31 (12) 1945-1948 (2014) (査読無)
- 18) 中島友紀: 骨細胞による骨リモデリングの制御 *Current Therapy* 32 (10) 1015-1020 (2014) (査読無)
- 19) 中島友紀: 骨転移と RANKL *CLINICAL CALCIUM* 24 (8) 1201-1208 (2014) (査読無)
- 20) 中島友紀: 骨細胞-骨代謝の司令塔 腎と骨代謝 27(3) 191-197 (2014) (査読無)
- 21) 中島友紀: 骨構成細胞のカップリングとコミュニケーション *CLINICAL CALCIUM* 24 (6) 853-861 (2014) (査読無)
- 22) 中島友紀: RANKLの多彩な作用 *実験医学 (増刊)* 32 (7) 43-52 (2014) (査読無)
- 23) 中島友紀: 巻頭言: 骨と幹細胞研究の最前線 *CLINICAL CALCIUM* 24 (4) 11 (2014) 特集ゲスト編集 (査読無)
- 24) 林幹人、中島友紀: 造血系細胞から分化する破骨細胞分化制御 *CLINICAL CALCIUM* 24 (4) 487-500 (2014) (査読無)
- 25) 中島友紀: 骨細胞による骨制御 腎と骨代謝 27(2) 136-146 (2014) (査読無)
- 26) 中島友紀: 乳癌の骨転移病変と RANKL 腎と骨代謝 27(1) 15-23 (2014) (査読無)
- 27) 林幹人、中島友紀、高柳広: セマフォリンシグナルによる骨代謝調節 *THE BONE* 27(4) 379-383 (2013) (査読無)
- 28) 中島友紀: ストレスと骨の細胞間コミュニケーション *CLINICAL CALCIUM* 23 (11) 1595-1603 (2013) (査読無)
- 29) 中島友紀: Chapter3:骨転移の成立・進展のメカニズム1.乳癌細胞の進展のメカニズムと RANKL *癌と骨* 87-94 (2013) (査読無)
- 30) 中島友紀: 骨細胞による骨吸収制御 *THE BONE* 27(3) 49-57 (2013) (査読無)
- 31) 中島友紀、林幹人、高柳広: 骨細胞による骨恒常性の制御 *Medical Science Digest* 39 (8) 353-356 (2013) (査読無)
- 32) 中島友紀、林幹人、高柳広: 骨細胞による骨吸収調節機構 *日本臨床 増刊号* 71(2) 121-125 (2013) (査読無)
- 33) 中島友紀、林幹人、高柳広: 骨リモデリングの制御機構 *実験医学* 31 (6) 842-848 (2013) (査読無)
- 34) 林幹人、中島友紀、高柳広: セマフォリンによる骨代謝 *内科* 111 (4) 711-715 (2013) (査読無)
- 35) 中島友紀、林幹人: Semaphorin 骨粗鬆症治療 12(1) 54-57 (2013) (査読無)
- 36) 林幹人、中島友紀、高柳広: セマフォリンによる骨代謝 *実験医学* 31 (4) 510-514 (2013) (査読無)
- 37) 中島友紀、林幹人、高柳広: 骨疾患の治療標的としての Wnt シグナルリウマチ科 49 (3) 363-368 (2013) (査読無)
- 38) 中島友紀: 骨構成細胞による骨恒常性の制御 *CLINICAL CALCIUM* 23 (2) 218-228 (2013) (査読無)
- [学会発表] (計 23 件)
- 1) 中島友紀: セマフォリンによる骨リモデリングの制御 第 89 回日本薬理学会年会 3月9日 2016年 横浜 (招待講演)
- 2) 中島友紀: RANKL Biology 第 52 回お茶ノ水疾患研究会 1月20日 2016年 東京 (招待講演)
- 3) 中島友紀: RANKL Biology 第 2 回日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス 10月3日 2015年 東京 (招待講演)
- 4) 中島友紀: 骨リモデリングの制御機構 第 57 回歯科基礎医学会 日本学術会議シンポジウム 9月13日 2015年 新潟 (招待講演)
- 5) 中島友紀: 骨リモデリングの制御機構の解明 第 33 回 日本骨代謝学会 7月24日 2015年 東京 (招待講演)
- 6) Nakashima T: Regulation of bone remodeling 3rd Seoul Symposium on Bone Health KSBMR-JSBMR joint symposium May.27 2015. Seoul (招待講演)
- 7) 中島友紀: 骨を基軸とした多臓器連関(オステオネッネットワーク) 12<sup>th</sup> Asia Congress of Nutrition/第 69 回日本栄養・食料学会 5月16日 2015年 横浜 (招待講演)
- 8) 中島友紀: 骨免疫学の開拓と治療への応用 JBA バイオセミナー 1月20日 2015年

- 東京 (招待講演)
- 9) 林幹人、中島友紀、高柳広 Sema3A による骨代謝制御 第 87 回日本生化学会大会 10 月 16 日 2014 年 京都
  - 10) 中島友紀 骨リモデリングの制御機構と創薬標的 第 2 回川越骨代謝セミナー 10 月 10 日 2014 年 埼玉 (招待講演)
  - 11) Hayashi M, Nakashima T, Takayanagi H. Regulation of bone metabolism by Semaphorin 3A derived from osteoblastlineage cells. ASBMR 2014 Annual Meeting Sep.13 2014.
  - 12) 中島友紀 RANKL Biology 第 32 回日本骨代謝学会日韓合同シンポジウム 7 月 26 日 2014 年 大阪 (招待講演)
  - 13) 中島友紀 炎症と骨破壊 第 32 回日本骨代謝学会日本リウマチ学会合同シンポジウム 大阪 7 月 25 日 2014 年 大阪 (招待講演)
  - 14) 中島友紀 骨と運動器の連環システム 第 32 回日本骨代謝学会 7 月 24 日 2014 年 大阪(招待講演)
  - 15) 中村春彦、中島友紀、林幹人、高柳広、田中栄 破骨細胞分化にともないヒストン修飾が活性型に変化する遺伝子群の解析 第 1 回日本骨免疫会議 7 月 5 日 2014 年 沖縄
  - 16) 寺島明日香、岡本一男、中島友紀、高柳広 骨細胞除去マウスの免疫細胞への影響 第 1 回日本骨免疫会議 7 月 4 日 2014 年 沖縄
  - 17) 小松紀子、岡本一男、澤新一郎、中島友紀、田中 栄、高柳広 Foxp3 陽性 T 細胞から分化した Th17 細胞の自己免疫性関節炎における重要性 第 35 回 日本炎症・再生医学会 7 月 2 日 2014 年 沖縄
  - 18) 澤新一郎、永島一樹、中島友紀、高柳広 リンパ節形成における RANKL 発現細胞の機能解析 第 35 回 日本炎症・再生医学会 7 月 2 日 2014 年 沖縄
  - 19) 林幹人、中島友紀、高柳広 Sema3A による骨代謝制御 第 35 回 日本炎症・再生医学会 7 月 2 日 2014 年 沖縄
  - 20) 岡本一男、林幹人、中島友紀、高柳広 EF-hand タンパク質を介した破骨細胞分化と赤血球生成制御 第 35 回 日本炎症・再生医学会 7 月 1 日 2014 年 沖縄
  - 21) 中島友紀 骨細胞による骨吸収制御機構 第 55 回歯科基礎医学会サテライトシンポジウム 9 月 20 日 2013 年 岡山 (招待講演)
  - 22) 中島友紀 RANKL と骨疾患 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会第 2 回 合同国際会議 (IBMS-JSBMR 2013) 5 月 30 日 2013 年 神戸 (招待講演)
  - 23) Nakashima T Regulation of bone remodeling by osteocytes. 第 22 回国際リウマチシンポジウム/第 57 回日本リウマチ学会 April 19 2013 Kyoto (招待講演)

〔図書〕 (計 6 件)

- 1) Hayashi M, Nakashima T, Takayanagi H. Semaphorins in bone homeostasis. *Semaphorin* (Book; Springer New York, Editor Atsushi Kumanogoh) 159-173, (2015) (査読有)
- 2) 中島友紀 : RANKL/OPG の産生細胞ファーマナビゲーター 抗 RANKL 抗体編 (メディカルレビュー社) 60-69 (2016) (査読無)
- 3) 中島友紀 : 骨細胞による破骨細胞分化の制御機構 骨・臓器ネットワークとオステサイト (メディカルレビュー社) 44-53 (2016) (査読無)
- 4) 中島友紀 : RANKL/RANK/OPG 骨ペディア 124-125 (2015) (査読無)
- 5) 中島友紀 : ビタミン D と骨免疫学 ビタミン D と疾患 100-108 (2013) (査読無)
- 6) 中島友紀、高柳広 : 骨吸収作用ファーマナビゲーター PTH 編 46-54 (2013) (査読無)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
<http://bonebiology.jimdo.com/>

#### 6. 研究組織

- (1) 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
- (2) 研究分担者  
 該当なし
- (3) 連携研究者  
 該当なし