

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293392

研究課題名(和文) イメージング・シミュレーション・オミクスによる骨格形成機構の多角的解析

研究課題名(英文) Multimode analyses of skeletogenesis by imaging, simulation and omics

研究代表者

飯村 忠浩 (Iimura, Tadahiro)

愛媛大学・学術支援センター・教授

研究者番号：20282775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、中軸骨格組織形成に関わる重要な分子群をスクリーニング・同定することを目的とした。さらに、候補遺伝子のノックアウトマウスの骨格の解析を進めた。特に進捗のあった成果として、ケモカイン受容体CCR5が骨粗鬆症の発症に重要であることを明らかにした。CCR5はHIV共受容体でありHIV治療標的分子である。CCR5の阻害薬Maravirocおよび抗CCR5中和抗体はヒト培養破骨細胞のアクチンリング形成・骨吸収活性を阻害した。CCR5KOマウスは骨粗鬆症への抵抗性を示した。これらは、CCR5を標的としたHIV治療が骨吸収性疾患に対してもメリットをもたらす可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research grant was to identify important genes during skeletal development, and further validate the role of candidate genes by analysis of knock-out mice. We identified some cc-chemokines expressing in developing skeletal tissues. One of prominent advance in this research was that a chemokine receptor CCR5, also a HIV co-receptor, was essential for osteoporosis. Clinical reports suggested that HIV treatment targeting CCR5 may cause less-susceptibility to bone-destructive diseases such as rheumatoid arthritis and osteoporosis. We uncovered that anti-CCR5 neutralization antibody as well as a CCR5 inhibitory drug, Maraviroc, blocked osteoclast differentiation and function through damaging their actin-ring formation. Moreover, CCR5-deficient mice were resistant to osteoporotic stimuli. These findings experimentally supports the clinical reports as mentioned above, and suggest that HIV therapy targeting CCR5 may provide skeletal merits.

研究分野：骨格形成・骨代謝の生物医学

キーワード：骨代謝 骨粗鬆症 破骨細胞 HIV シグナル

1. 研究開始当初の背景

個体発生は、3層性胚盤の確立から咽頭期・体節期胚の終期までのいわゆる形態形成期(図1-)と、その後の組織形成期(図1-)に大別されて考えられる。脊椎原基の発生に焦点をあてると、形態形成期には主にHox遺伝子群による形態情報の付与、分節時計システムによる中胚葉分節(体節)形成、体節細胞での筋・骨格・付随結合組織の各系譜分化などのプログラムが進行する。組織形成期には、椎体・椎間の空間的な組織配置とともに、両硬組織の組織分化が進行する。しかしながら、この中軸骨格の組織形成機構に関しては、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、中軸骨格組織形成機構を理解するために、「椎体・椎間前駆細胞の空間配置」機構と「椎体・椎間の組織分化」機構に焦点をあて、それらに関わる重要な分子群をスクリーニング・同定することを目的とする。前者では「細胞間相互作用と細胞の集団運動」、後者では「組織間相互発達」という視点から、骨格発生・発達メカニズムを統合的に解明していく。先進蛍光イメージングと数理モデリング、さらにマイクロアレイによる分子オミクス解析を統合した多角的解析によりこの問題にアプローチする。椎間板は主に線維軟骨組織からなり、顎関節も同組織を含む。しかしながら、線維軟骨の分化機構については不明な点が極めて多い。本研究は、線維軟骨の分化機構解明を中心に展開され、顎関節疾患を含む関節疾患の病態解明の分子基盤を提案する。

3. 研究の方法

以下3つの課題を明らかにして行く。

椎間板(線維軟骨)の分化を制御する分子の同定

骨格形成前駆細胞(椎間板形成細胞群と椎体形成細胞群)の空間的配置メカニズム

椎間板および椎体形成細胞群と周囲神経および血管発生・発達の組織間相互発達メカニズム

平成26年度は、これまで解析基盤である「組織学的・細胞分子生物学的解析によるマイクロアレーデータのValidation(検定)」をさらに充実させ、(1)の課題解決を遂行する。平成27年度以降は、(1)と同様の解析基盤に、先進蛍光バイオイメージングと数理モデリングによるValidationを加え、より多次元の視点からの理解と分子基盤の構築を探索していく。

4. 研究成果

本研究では、中軸骨格組織形成機構を理解するために、「椎体・椎間板の空間的配置」機構と「椎体・椎間の組織分化」機構に焦点をあて、それらに関わる重要な分子群をスクリーニング・同定することを目的とし、さらに、候補遺伝子のノックアウトマウスの骨格の解析を進めた。そのうち特に進捗のあった成果として、ケモカイン受容体CCR5が破骨細胞の機能発現に必須であることを明らかにし、論文として報告した(Lee et al., Nature Communications, 2017)。さらに、本研究成果は、朝日新聞や愛媛新聞、NHKで報道された。以下、骨格系の恒常性維持と病態におけるCCR5の機能に関する知見を概説する。臨床疫学調査からHIV共受容体であるCCR5の機能低下は、リウマチのみならず骨粗鬆症に対しても抵抗性を示すらしいことが報告されてきたが、その実験医学的な裏付けは不明であった。CCR5の機能喪失による骨代謝への影響を調べた結果、CCR5の阻害薬Maravirocおよび抗CCR5中和抗体はヒト培養破骨細胞のアクチンリング形成・骨吸収活性を阻害した。CCR5KOと同腹の野生型マウスを用いた骨粗鬆症モデル実験において、KOマウスでは骨量が減少せず骨粗鬆症への抵抗性を示した。さらに、CCR5はRANKLやインテグリンを介したシグナルと共役して、破骨細胞の細胞骨格と運動性を調節すること、その際、small GTPasesであるRacおよびRhoの活性化が重要かつ必要十分であることを明らかにした。これらの観察結果は、上記の疫学研究を裏付ける結果であり、CCR5を標的としたHIV治療が骨吸収性疾患に対してもメリットをもたらす可能性を示している。中軸骨格や関節における、上記ケモカインおよびケモカイン受容体の機能に関しては、引き続き解析を進めている。

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30件)

1. Yamashita, M., Inoue, K., Saeki, N., Ideta-Otsuka, M., Yanagihara, Y., Sawada, Y., Sakakibara, I., Lee, J., Ichikawa, K., Kamei, Y., Iimura, T., Igarashi, K., Takada, Y., and Imai, Y. Uhrf1 is indispensable for normal limb growth by regulating chondrocyte differentiation through specific gene expression. *Development* **145** (2018)
2. Yamane, H., Takakura, A., Shimadzu, Y., Kodama, T., Lee, J. W., Isogai, Y., Ishizuya,

- T., Takao-Kawabata, R., and [limura, T.](#) Acute development of cortical porosity and endosteal naive bone formation from the daily but not weekly short-term administration of PTH in rabbit. *PLoS One* **12**, e0175329 (2017)
3. Takakura, A., Lee, J. W., Hirano, K., Isogai, Y., Ishizuya, T., Takao-Kawabata, R., and [limura, T.](#) Administration frequency as well as dosage of PTH are associated with development of cortical porosity in ovariectomized rats. *Bone Res* **5**, 17002 (2017)
 4. [Lee, J. W.](#), Hoshino, A., Inoue, K., Saitou, T., Uehara, S., Kobayashi, Y., Ueha, S., Matsushima, K., Yamaguchi, A., Imai, Y., and [limura, T.](#) The HIV co-receptor CCR5 regulates osteoclast function. *Nat Commun* **8**, 2226 (2017)
 5. Koide, M., Kobayashi, Y., Yamashita, T., Uehara, S., Nakamura, M., Hiraoka, B. Y., Ozaki, Y., [limura, T.](#), Yasuda, H., Takahashi, N., and Udagawa, N. Bone Formation Is Coupled to Resorption Via Suppression of Sclerostin Expression by Osteoclasts. *J Bone Miner Res* **32**, 2074-2086 (2017)
 6. Ogura, K., [limura, T.](#), Makino, Y., Sugie-Oya, A., Takakura, A., Takao-Kawabata, R., Ishizuya, T., Moriyama, K., and Yamaguchi, A. Short-term intermittent administration of parathyroid hormone facilitates osteogenesis by different mechanisms in cancellous and cortical bone. *Bone Rep* **5**, 7-14 (2016)
 7. Nishiyama, Y., Matsumoto, T., [Lee, J. W.](#), Saitou, T., Imamura, T., Moriyama, K., Yamaguchi, A., and [limura, T.](#) Changes in the spatial distribution of sclerostin in the osteocytic lacuno-canalicular system in alveolar bone due to orthodontic forces, as detected on multimodal confocal fluorescence imaging analyses. *Arch Oral Biol* **60**, 45-54 (2015)
 8. Lin, Z., [limura, T.](#), Kasugai, S., and Yamaguchi, A. Oral mucosal fibroblasts overexpressing BMP-2 differentiate into osteoblasts and participate in new bone formation during bone regeneration. *Journal of Oral Biosciences* **57**, 118-123 (2015)
 9. [Lee, J. W.](#), Asai, M., Jeon, S. K., [limura, T.](#), Yonezawa, T., Cha, B. Y., Woo, J. T., and Yamaguchi, A. Rosmarinic acid exerts an antiosteoporotic effect in the RANKL-induced mouse model of bone loss by promotion of osteoblastic differentiation and inhibition of osteoclastic differentiation. *Mol Nutr Food Res* **59**, 386-400 (2015)
 10. Kiyomatsu, H., Oshima, Y., Saitou, T., Miyazaki, T., [Hikita, A.](#), Miura, H., [limura, T.](#), and Imamura, T. Quantitative SHG imaging in osteoarthritis model mice, implying a diagnostic application. *Biomed Opt Express* **6**, 405-420 (2015)
 11. [Hikita, A.](#), [limura, T.](#), Oshima, Y., Saitou, T., Yamamoto, S., and Imamura, T. Analyses of bone modeling and remodeling using in vitro reconstitution system with two-photon microscopy. *Bone* **76**, 5-17 (2015)
 12. Denans, N., [limura, T.](#), and Pourquie, O. Hox genes control vertebrate body elongation by collinear Wnt repression. *Elife* **4** (2015)
 13. Sugiyama, M., Saitou, T., Kurokawa, H., Sakaue-Sawano, A., Imamura, T., Miyawaki, A., and [limura, T.](#) Live imaging-based model selection reveals periodic regulation of the stochastic G1/S phase transition in vertebrate axial development. *PLoS Comput Biol* **10**, e1003957 (2014)

14. Lee, J. W., Yamaguchi, A., and limura, T. Functional heterogeneity of osteocytes in FGF23 production: the possible involvement of DMP1 as a direct negative regulator. *Bonekey Rep* **3**, 543 (2014)
 15. Koga, S., Oshima, Y., Honkura, N., limura, T., Kameda, K., Sato, K., Yoshida, M., Yamamoto, Y., Watanabe, Y., Hikita, A., and Imamura, T. In vivo subcellular imaging of tumors in mouse models using a fluorophore-conjugated anti-carcinoembryonic antigen antibody in two-photon excitation microscopy. *Cancer Sci* **105**, 1299-1306 (2014)
 16. Lee, J. W., and limura, T. Shedding quantitative fluorescence light on novel regulatory mechanisms in skeletal biomedicine and biondentistry. *Jpn Dent Sci Rev* **53**, 2-10 (2017)
 17. limura, T., and Lee, J. W. Unveiling a rhythmic regulatory mode hidden in developmental tissue growth by fluorescence live imaging-based mathematical modeling. *Journal of Oral Biosciences* **59**, 6-11 (2017)
 18. Lee, J. W., and limura, T. (2015) Quantitative in situ fluorescence imaging to unveil the morphological and functional heterogeneity of osteocytes. *Journal of Oral Biosciences* **57**, 76-79 (2017)
 19. 高倉綾, 李智媛, 山根宏志, 高尾亮子, 飯村忠造. テリパラチドの高頻度投与は皮質骨空隙形成を誘導する. *日本骨形態計測学会雑誌* 印刷中 (2018)
 20. 飯村忠造, 李智媛. 骨組織の顕微鏡研究. *顕微鏡* 印刷中 (2018)
 21. 李智媛, 飯村忠造. 骨細胞の機能と形態のヘテロジェニティ. *THE BONE* **29**, 3-8 (2015)
 22. 飯村忠造. 超域ネットワーク型「生命医学研究支援体制の構築に向けて. *愛媛ジャーナル* **29**, 75-77 (2015)
 23. 飯村忠造. 軟骨・骨の組織病理学的解析における 2 光子励起顕微鏡の応用. *CLINICAL CALCIUM* **25**, 91-98 (2015)
 24. 飯村忠造. 筋・骨格系の統合的な発生・発達におけるメカニカルストレスとHox 遺伝子群. *THE BONE* **29**, 55-61 (2015)
 25. 飯村忠造. 骨細胞の in situ 蛍光計測による機能解析. *O.li.ve. - 骨代謝と生活習慣病の連関 -* **5**, 55 (2015)
 26. 飯村忠造. 骨細胞の 3 次元解析. *THE BONE* **28**, 59-66 (2014)
 27. 飯村忠造. 骨細胞の形態と機能ダイナミズムの可視化・定量化. *実験医学* **32**, 93-99 (2014)
 28. 正田温彦, 大嶋佑介, 飯村忠造, 今村健志. 2 光子励起顕微鏡を用いた骨・軟骨組織イメージング. *THE BONE* **28**, 85-89 (2014)
 29. 大嶋佑介, 飯村忠造, 正田温彦, 今村健志. ラマン分光法による骨組織の分子計測と骨質評価への応用. *THE BONE* **28**, 91-96 (2014)
 30. 今村健志, 正田温彦, 大嶋佑介, 飯村忠造. バイオイメージングの現状と展望. *INNERVISION* **29**, 39-41 (2014)
- 〔学会発表〕(計 33 件)
1. 飯村忠造 李智媛, マルチモード蛍光観察による新規の骨代謝病態機能探索、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018/3/28
 2. Ji-Won Lee, Shunsuke Uehara, Yasuhiro Kobayashi, Yuuki Imai and Tadahiro limura, The HIV co-receptor CCR5 regulates cellular pathways required for osteoclast function, 第 3 回日本骨免疫学会 ウィンターセミナー, 2018/1/26
 3. 飯村忠造, 骨代謝のマルチモード・イメージング解析, 日本顕微鏡学会平成 29 年度関西支部特別講演会, 2018/10/14
 4. 飯村忠造, ドラッグ・リポジョシヨニングとプロテオ創薬 による骨代謝改善標的分子の探索, 第 410/411 回 北海道歯学会例会, 2017/12/7
 5. 飯村忠造, HIV 治療標的分子 CCR5 の 骨代謝

- における役割, 北海道大学 遺伝子病制御研究所 血管生物学セミナー, 2017/11/1
6. 飯村忠浩, 運動器研究における組織・細胞の形態学的観察法-私なら、こうする-, 日本骨代謝学会 Skeletal Science Retreat, 2017/11/26
 7. 飯村忠浩, 超解像イメージングによる骨系細胞の微細構造と動態機能解析, 第44回日本臨床バイオメカニクス学会, 2017/11/24
 8. 飯村忠浩 李智媛, マウスジェネティクスを用いた HIV 感染患者の骨病態解明, 第59回歯科基礎医学会学術大会, 2017/9/16
 9. Lee JW, Inoue K, Uehara, S, Kobayashi Y, Imai Y, Limura T, Requirement of CCR5, a co-receptor of HIV, for the functional cellular architecture of osteoclasts, providing experimental evidences for the direct association between loss of CCR5 and resistance to bone loss, Joint meeting of the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS) and the International Federation of Musculoskeletal Research Societies (IFMRS), 2017/6/17-21
 10. 李智媛 飯村忠浩, 骨形態計測法で明らかになった HIV 治療薬標的分子 CCR5 の破骨細胞機能分化における必須の機能, 第37回日本骨形態計測学会, 2017/6/23
 11. 飯村忠浩, 骨粗鬆症治療薬の育薬研究, 第24回 NPO 法人 東京血管疾患研究所セミナー, 2017/7/1
 12. 飯村忠浩, 産学および分野横断連携研究の取り組みと成果, 第71回日本口腔科学会学術集会, 2017/4/28
 13. 飯村忠浩, 先進光学顕微鏡の骨形態計測法への応用展開, 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017/3/28
 14. 李智媛, Unveiling novel regulatory mechanisms of osteoclasts by integrative approaches of bio-imaging and molecular omics, Protein-Island-Matsuyama (PIM) International Symposium 2016, 2016/9/16
 15. Lee JW, Hoshino A, Kobayashi Y, Uehara, S, Imai Y, Limura T., Essential roles of C-C chemokine signaling in mature osteoclast function, International Osteoporosis Foundation (IOF) 2016, 2016/11/4
 16. 李智媛, 星野昭芳, 井上和樹, 上原俊輔, 小林康浩, 山口朗, 今井祐記, 飯村忠浩, Roles of Chemokine-mediated signaling in architectural function of osteoclasts, 第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝会議 若手シンポジウム基礎, 2016/7/22
 17. Lee JW, Hoshino A, Uehara, S, Kobayashi Y, Imai Y, Limura T., Novel regulatory mechanisms of osteoclast function, as revealed by combinatorial approaches of functional live-imaging and molecular omics, 第39回日本分子生物学会年会シンポジウム「バイオイメージングの技術躍進と医学生物学への応用最前線」, 2016/12/11
 18. 飯村忠浩, 超解像顕微鏡の生物医学応用「ここまで微細に、こんなに綺麗に見える!」, 第57回日本組織細胞化学会総会・学術集会 共催ワークショップ「広がる超解像顕微鏡の世界」, 2016/9/4
 19. 飯村忠浩 李智媛, 硬組織の形態・機能解析のための光学顕微鏡のマルチモードな活用法-微分干渉から先進レーザー顕微鏡の応用例-, 第58回 歯科基礎医学会学術大会 ランチョンセミナー, 2016/8/25
 20. 飯村忠浩 李智媛, マルチモーダル超解像法を用いた骨系細胞の機能解析, 第58回 歯科基礎医学会学術大会メインシンポジウム A 「アプライドイメージング-先進イメージングによる生命医学のブレイクスルー」, 2016/8/25
 21. 李智媛 飯村忠浩, 機能的生細胞イメージングとオミクス解析による破骨細胞調節機能の解明, 第58回 歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム 10「機能と形態の統合的アプローチによる血管・唾液腺・骨の共創的研究」, 2016/8/25
 22. 飯村忠浩, 副甲状腺ホルモン: PTH の分子シグナルと薬理効果, 第34回日本骨代謝学会学術集会 / 第3回アジア太平洋骨代謝会議 ランチョンセミナー-2-, 2016/7/22
 23. 飯村忠浩, 副甲状腺ホルモン: PTH の基礎生物医学 - 最近の知見から -, 第35回長崎骨粗鬆症研究会, 2016/6/29
 24. 李智媛 飯村忠浩, Essential role of C-C chemokine-mediated signaling in mature osteoclast function, 第7回 骨バイオサイエンス研究会, 2016/6/4
 25. 飯村忠浩, 医理工融合研究センターにおける学際的研究の推進-異分野融合は異文化融合-, 第70回 日本口腔科学会学術集会 第10回教育研修会「歯科医学の多様性 歯学からの情報発信」, 2016/4/16
 26. 飯村忠浩, 骨形成の超解像イメージング解析, 第121回 日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム 6 石灰化研究の新展開 2016/3/28
 27. Lee JW, Hoshino A, Saitou T, Inoue K, Uehara, S, Kobayashi Y, Matsushima K, Imai Y, Limura T., C-C chemokine receptor 5, a co-receptor of HIV, -mediated signal is required for geometric architecture and function of osteoclasts, thus for RANKL-induced bone destruction, 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress, 2016/5/14-17
 28. Lee JW., C-C chemokine receptor 5, a co-receptor of HIV, -mediated signal regulates bone resorption via locomotion of osteoclasts, ASBMR, 2015/10/9-12
 29. 李智媛, 蛍光細胞イメージングと骨形態計測で見る骨代謝におけるケモカインシグ

- ナルの役割, 歯科基礎学会, 2015/9/11-12
30. 李 智媛, Roles of C-C chemokine receptor 5, a co-receptor of HIV, -mediated signal in locomotion of osteoclasts and bone resorption, 日本骨代謝学会, 2015/7/23-25
 31. 李 智媛, Roles of C-C chemokine receptor 5, Roles of CCR5, a co-receptor of HIV, in regulation of functional motility of osteoclasts, 骨免疫学会, 2015/6/30-7/1
 32. Lee JW., Quantitative illumination on bone histology and cell biology, International Bio Imaging, 2016/2/15
 33. Lee JW., Super-resolution analysis of cell cycle phase-dependent phosphorylation of Smads, TGFbeta symposium, 2015/1/11-14

〔図書〕(計 3件)

著書

1. 愛媛大学「研究室からこんにちは!」10 飯村忠浩(分担執筆)「画像によるライブイメージングで発生生物学を研究・がん診断などの応用が期待できるHox遺伝子」アトラス出版 松山 (2016) p238-253
2. 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典(日本骨代謝学会 編)飯村忠浩(分担執筆)第6章 keyword 21 「ケモカイン」羊土社東京 (2015) p220-222
3. 口腔組織・発生学(改訂 新版)(脇田稔、前田健康、中村浩彰、網塚憲生 編)飯村忠浩(分担執筆)第11章 6節「蛍光ライブイメージング」医歯薬出版 (2015) p348-352

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

1. PROS バイオイメージング部門 李助教・飯村教授らが HIV 感染治療薬の標的分子である CCR5 による骨代謝調節機構の解明を Nature Communications 誌で発表しました【(記者説明会)12月26日(火)】(愛媛大学プロテオサイエンスセンターHP)
<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/topics/detail.php?serial=131>
2. 抗 HIV 薬、骨粗鬆症の予防にも効果? 愛媛大が研究(朝日新聞デジタル)
<https://www.asahi.com/articles/ASL1L519RL1LUBQU0OK.html>
3. 骨粗しょう症予防期待 愛媛大助教ら骨の代謝調節機能解明(愛媛新聞オンライン)
<https://www.ehime-np.co.jp/article/news/201712270018>

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯村 忠浩 (Iimura, Tadahiro)
愛媛大学・学術支援センター・教授
研究者番号: 20282775

(2)研究分担者

疋田 温彦 (Hikita, Atsuhiko)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号: 60443397

李 智媛 (Lee, Ji-Won)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教(特命教員)
研究者番号: 70711274

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()