

骨組織の発生と維持の分子機構解明

東京大学大学院医学系研究科 骨免疫学寄付講座

塚崎 雅之

骨は運動器であるだけでなく、ミネラル代謝調節や造血といった多様な機能を併せ持つ組織である。骨組織の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスによって厳密に維持されている。骨形成と骨吸収のバランス破綻は、骨粗鬆症などの代謝性疾患、関節リウマチ、歯周病などの炎症性骨疾患、がん骨転移、骨肉腫などの腫瘍性疾患の病態に深く関与することから、骨形成と骨吸収の分子メカニズムを詳細に理解することは、医生物学領域において極めて重要な課題である。しかしながら、骨組織の発生とその恒常性維持機構に関しては、未だ不明な点が多く残されている。

そこで本課題では、我々が新たに作成したユニークなマウスモデルと、現在解析中のシングルセル RNA-seq データを駆使し、(1) 骨格幹細胞クロストークによる骨形成機構の解明 (2) 骨吸収を司る破骨細胞の運命決定機構の解明 の2つのプロジェクトを推進することで、骨組織の発生と維持の全容解明を目指した。

(1) 骨格幹細胞クロストークによる骨形成機構の解明

骨組織には解剖学的に局在の異なる3種類の骨格幹細胞が存在し、それぞれが異なる様式の骨形成を仲介することで、複雑な骨組織を構築すると考えられている。すなわち、成長板軟骨と骨髄中に存在する骨格幹細胞は内軟骨性骨化（はじめに軟骨組織を作成し、これを骨へと置換してゆく骨化様式）による骨形成に寄与する一方で、皮質骨外側の骨膜に存在する骨格幹細胞（骨膜幹細胞）は膜性骨化（軟骨組織を作らず、直接的に骨組織を形成する骨化様式）のみに寄与すると考えられている（Mizuhashi et al., *Nature* 2019, Newton et al., *Nature* 2019, Debnath et al., *Nature* 2018）。

申請者は当初、タンパク質修飾酵素のひとつである PRMT5 (Protein arginine methyl transferase 5) の破骨細胞における機能を探索する目的で、Cathepsin K (CtsK)-Cre を用いて、PRMT5 遺伝子を除去したマウス (PRMT5^{fllox/Δ} CtsK-Cre) を作製した。カテプシン K は破骨細胞が骨の有機質を分解するために使用するタンパク質分解酵素であり、CtsK-Cre は破骨細胞で特異的に遺伝子を除去するシステムと考えられていた。作製したマウスでは、内軟骨性骨化と膜性骨化の両方が障害され骨成長障害を呈したものの、意外なことに破骨細胞の分化や機能、遺伝子発現プロファイルは全く変化しておらず、骨成長障害は CtsK-Cre が他の細胞で PRMT5 遺伝子を除去したことによる影響と考えられた。CtsK-Cre は骨膜幹細胞でも発現することが報告されているため (Debnath et al., *Nature* 2018)、当該マウスにおける骨膜幹細胞の表現型を解析したところ、骨膜幹細胞で PRMT5 が除去されると、生後徐々に骨膜幹細胞の数が減少してゆくことが明らかとなった。すなわち、生後に骨膜幹細胞の数が減少すると、膜性骨化だけでなく内軟骨性骨化も障害されるという意外な知見を得ることができた。

これまで、骨膜幹細胞が膜性骨化にのみ寄与すると考えられてきた理由は、①骨膜幹細胞の子孫細胞は、骨内部には侵入せず骨外膜に限局する ②骨膜幹細胞で骨形成に必須の遺伝子 Osterix を除去すると、膜性骨化のみが障害される ③骨膜幹細胞を異所性に移植すると、膜性骨化のみ引き起こす という3つの根拠によるものであった。しかしながら、骨膜幹細胞が可溶性因子を分泌することで遠隔的に内軟骨性骨化を制御する可能性に関しては見落とされてきた。

そこで骨膜幹細胞の bulk-RNAseq データ(Debnath et al., *Nature* 2018) を再解析し、骨膜幹細胞で高発現する可溶性因子を探索し、内軟骨性骨化のマスター制御因子である *Ihh* が骨膜幹細胞で高発現していることを見出した。これまで、胎生期の骨組織を用いた組織学的解析により、成長板軟骨の一部である肥大軟骨細胞が *Ihh* を高発現することが報告されており、主要な *Ihh* 産生源と考えられてきた。他の細胞が発現する *Ihh* の役割については不明であったため、骨膜幹細胞で *Ihh* を除去したマウスを作製したところ、成長板幹細胞の増殖が阻害され、3 週齢以降に重篤な骨成長障害を呈することが明らかとなった。肥大軟骨細胞で *Ihh* を除去したマウスも作製し解析したところ、3 週齢より以前に重篤な骨形成障害を起こすことが明らかとなり、胎生～幼児期といった早期ライフステージにおいては肥大軟骨細胞由来の *Ihh* が重要であるものの、生後に肥大軟骨細胞が退縮するに伴い、骨膜幹細胞由来の *Ihh* が適切な骨成長に寄与する可能性が考えられた。以上から、これまで内軟骨性骨化と膜性骨化はそれぞれ成長板幹細胞と骨膜幹細胞により独立して制御されると考えられてきたが、骨膜幹細胞は可溶性因子 *Ihh* の分泌を介して成長板幹細胞の増殖を促すことで内軟骨性骨化にも寄与するということが明らかとなり、骨成長における幹細胞クロストークの重要性が浮き彫りとなった(Tsukasaki et al., *Nature Communications* 2022)。

性質や局在の異なる組織幹細胞同士のクロストークの重要性は、ハエの生殖器官や哺乳類の皮膚といった組織においても報告されており、「幹細胞クロストーク」は複雑な臓器を形づくり維持してゆくための根源的な機構である可能性が示唆される。進化的には、膜性骨化は内軟骨性骨化よりも古くから存在するシステムと考えられており、膜性骨化を担う幹細胞が別の骨化システムを制御し骨格形成を司るという知見は、脊椎動物の進化を理解する上でも重要な示唆を提供する。また本成果は、骨折や骨再生の手術の際に、骨膜を保存することが重要である根拠の一つを解明したものであり、骨膜を標的とした新しい骨再生療法の開発や、低身長症、骨粗鬆症、難治骨折、骨腫瘍など様々な骨病態に対する治療法の確立に貢献することが期待される。

(2) 骨吸収を司る破骨細胞の運命決定機構の解明

骨は、破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成によって生涯に亘り新陳代謝されることで恒常性が維持されている。破骨細胞は血球系の細胞であり、その分化と活性化は TNF スーパーファミリーのサイトカインである RANKL によって誘導される。1990 年代後半に、骨髄細胞を RANKL で刺激することで破骨細胞を試験管内で誘導する系が確立され、この培養系に対してマイクロアレイや RNA-seq などのトランスクリプトーム解析をおこない、破骨細胞の形成前と形成後の培養系に存在する細胞集団の遺伝子発現を比較することで、破骨細胞の分化や機能発現に重要な多くの遺伝子が発見されてきた。しかしながら、この培養系は雑多な集団を含んでおり、ごく一部の細胞しか破骨細胞へと分化できないことが知られていた。また従来のトランスクリプトーム解析方法では、培養系に含まれる全細胞の遺伝子発現の平均が検出されるため、破骨細胞形成前後の培養系に存在する細胞集団の遺伝子発現を比較しても、破骨細胞において非常に特異的に高発現する遺伝子以外は同定することが困難であり、転写調節因子のような発現レベルの低い遺伝子に関しては、重要な遺伝子であっても見逃されている可能性が考えられた。培養系に含まれる不均一な細胞集団の正体や、破骨細胞の詳細な分化経路とそれに伴う遺伝子発現変動の全容は不明であった。そこで本研究では、破骨細胞の分化経路を 1 細胞レベルで解析することで、破骨細胞の形成メカニズムを包括的に、詳細に解明することを目指した。

我々はまず、破骨細胞の分化培養系に対してシングルセル解析をおこなう手法を開発した。培養皿に強固に接着する破骨細胞やその前駆細胞を回収するために、コラーゲンでコートされた培養皿の上で骨髄細胞を培養し、RANKL 刺激の直前、RANKL 刺激 1 日後、RANKL 刺激 3 日後（破骨細胞が生じるタイムポイント）の 3 つの異なるタイムポイントから合計 7228 個の細胞を単離し、シングルセル RNA-seq 解析によりひとつひとつの細胞の全遺伝子発現情報を取得した。クラスタリング解析の結果、3 つのタイムポイント

には合計 12 種類のクラスターが存在しており、破骨細胞の分化培養系には成熟した破骨細胞のほか、様々な段階の破骨細胞前駆細胞や、破骨細胞になり損なった集団、好中球や間葉系ストロマ細胞、B 細胞など破骨細胞への分化能を持たない集団など、多様な細胞種が混在していることが明らかとなった。

次に、得られた 1 細胞ごとの全遺伝子発現データを用いて、機械学習アルゴリズムによる細胞分化経路の予測をおこなったところ、破骨細胞の分化経路として、Cluster 1 (単球様前駆細胞) から Cluster 9, 3, 2, 4 を経由して Cluster 7 (破骨細胞) へと分化してゆく多段階的なプロセスが予測された。意外なことに、Cluster 1 (単球様前駆細胞) の次のステージである Cluster 9 は、免疫細胞の一種である「樹状細胞」と良く似た遺伝子発現パターンを有しており、破骨細胞はその分化過程で一過性に、樹状細胞関連遺伝子 (細胞表面マーカーである CD11c や、抗原提示に関わる遺伝子群など) を発現する可能性が示唆された。これまで、樹状細胞の古典的な細胞表面マーカーである CD11c を発現する細胞の一部が、試験管内で破骨細胞への分化能を有するという報告がある一方で、成熟した樹状細胞を欠損するようなマウスでも破骨細胞の数が減少しないことが報告されており、破骨細胞分化における樹状細胞の役割に関しては統一した見解が得られていなかった。そこで、破骨細胞分化に必須の分子である RANK (RANKL の受容体) を、Cluster 9 (樹状細胞様前駆細胞) で特異的に除去したマウスを作成したところ、当該マウスでは破骨細胞の数が減少し骨量が顕著に増加することが明らかとなり、コンピューターにより予測された破骨細胞分化経路の生物学的妥当性が生体レベルで示された。また、破骨細胞前駆細胞が分化過程で一過的に CD11c を発現するという本知見により、過去の報告の矛盾 (生体から回収した CD11c 陽性細胞の一部が破骨細胞分化能を有する一方で、成熟した樹状細胞を欠損するマウスでも破骨細胞の数は減少しない) が解消される可能性が示された。

さらに、破骨細胞の分化経路が進むことに伴い発現が顕著に変化する転写因子・転写調節因子を探索し、破骨細胞分化のマスター転写因子である *Nfatc1* と同じ発現変動パターンを示す因子として、*Cited2* を同定した。*Cited2* は造血幹細胞の恒常性維持や肝臓における糖新生に関わる転写調節因子だが、破骨細胞における機能は未知であった。そこで破骨細胞における *Cited2* の機能を探索するために、破骨細胞前駆細胞で特異的に *Cited2* を欠損するマウス (*Cited2 flox/flox RANK-Cre*) を作成した。当該マウスでは、試験管内および生体内において破骨細胞の数が減少しており、*Cited2* は破骨細胞分化において重要な役割をもつ可能性が示された。*Cited2* 欠損細胞の遺伝子発現解析により、*Cited2* は破骨細胞の最終分化に必要な「細胞周期の停止」を促すことで、破骨細胞分化を制御することが示唆された。実際に、破骨細胞前駆細胞特異的 *Cited2* 欠損マウス由来の骨髄細胞を用いた破骨細胞分化培養系では、細胞周期の停止した前破骨細胞の頻度が顕著に減少することが明らかとなった。本研究により、破骨細胞の運命決定を司る多段階的な分化プロセスの詳細が 1 細胞レベルで解明され、各ステージ間の進行が遺伝子レベルで厳密に制御されていることが明らかとなった (Tsukasaki et al., *Nature Metabolism* 2020)。

本研究により得られた破骨細胞分化経路のシングルセル解析データは、未知の破骨細胞制御因子を同定する上で重要なリソースとなり、骨恒常性を司る基本原理の解明や、破骨細胞を標的とした新たな骨疾患治療法の開発に大きく貢献すると期待される。

謝辞

本研究の推進にあたり、公益財団法人アステラス病態代謝研究会にご支援を賜りましたことを深く感謝申し上げます。