

骨細胞による生体維持機能の解明

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子情報伝達学分野

林 幹人

研究の背景・目的

成体における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、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ダイナミックに生まれ変わることによって力学的刺激に対し組織レベルで適応している。この過程は骨リモデリングとよばれるが、加齢に伴うサルコペニアや長期横臥などにより力学的刺激が低下することで一連の機構が破綻し、骨粗鬆症だけでなく免疫系の異常や認知症など全身性の異常が引き起こされ、その結果、骨折、フレイル、などの病的状態に至ることから、骨の動的恒常性の維持が全身性の生体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、外界からの刺激(特に力学的刺激)を感受し、“オステオカイン”とよばれる骨から産生され全身の臓器・細胞制御に関わるホルモン・サイトカインなどの液性因子によって能動的に生体制御に関わるのが明らかになってきた。これらの力学的刺激の感知やオステオカインの産生に主に関わる細胞が骨細胞で、これは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であるが、それらの実態や制御メカニズムは不明な点が多いのが現状である。成体の骨組織を構成する細胞の約90%を占める骨細胞は、骨基質内の骨小腔とよばれる空間に局在し、樹状突起を多数有することで他の骨細胞同士や骨表面の細胞と情報伝達を行っていると考えられている。近年の研究において、骨細胞が骨の恒常性に必要不可欠な役割を担っており、そればかりか全身の様々な臓器に作用して生体恒常性を司る非常に重要な細胞であることが明らかにされてきた。すなわち、①破骨細胞分化・骨吸収の誘導、②骨芽細胞分化・骨形成の制御、③骨細管周囲・骨小腔リモデリング、④リン・カルシウム代謝、⑤機械的刺激の感受とそれに応じた骨構造の改変、⑥骨損傷治癒、⑦筋・骨連関、⑧エネルギー代謝、⑨SASPシグナルの標的、⑩造血系の制御、⑪骨芽細胞に脱分化して骨形成、⑫がん骨転移、等である。一方、上記のように多種多様な機能を有することが明らかであることから、ある骨細胞が骨形成と骨吸収を同時に制御したり、カルシウム・リン代謝を制御する骨細胞と筋・骨連関に関わる骨細胞が同一であることは考えにくいにもかかわらず、骨細胞のサブポピュレーションに関する研究はほとんど行われておらず、未だ機能的細分化が行われていない単一のポピュレーションとして認識されているのが現状である。

本研究では骨細胞による生体恒常性調節システムを包括的に解明するため、我々が新たに作製した真に骨細胞特異的なCreノックインマウス(*OsgI^{Cre}*マウス)と蛍光レポーターマウスを用いてin vivoで骨細胞を特異的に標識し骨細胞の単離を行った。これらの単離細胞のシングルセルRNA-Seq解析を行い、各細胞の遺伝子発現プロファイリング、発現パターンに基づいた細胞の分類・特徴づけを行うことで、これまで単一の集団としてみなされてきた骨細胞を機能的に細分化・定義づけし、骨細胞サブポピュレーションを特定してそれぞれの単一細胞の発現プロファイリングによって分化メカニズムを同定することを目的とした。さらに、それぞれのポピュレーションに特異的なマーカー遺伝子や、新たな骨細胞機能分子の同定など、骨細胞による生体維持機能の全容の解明を目指した。

研究の方法

本研究では、以下の4点の研究計画を実施した。①新規骨細胞特異的Cre発現マウスを用いた骨細胞特異的欠失モデルマウス解析による新たな骨細胞機能の探索、②レポーターマウスを用いた骨細胞特異的な標識による骨細胞の選択的単離とシングルセルRNA-Seq及びその解析による骨細胞サブポピュレーションの特定、③加齢マウスにおける骨細胞シングルセルRNA-Seq解析によるポピュレーション変化の実態解析、④新たな骨細胞産生性因子の同定とその遺伝子のコンディショナル欠損マウス作製・解析による骨細胞新機能同定。

研究成果

*Rosa26-iDTR*マウスと *OsgI^{Cre}*を交配することで骨細胞特異的にジフテリア毒素受容体を発現させ、若齢および加齢マウスにジフテリア毒素を投与することで、誘導性に骨細胞を欠失させ加齢に伴う骨細胞機能の変化を探索した。これまでの *DmpI-Cre*を用いて骨細胞(とそれ以外の骨芽細胞を含めた多様な *DmpI*陽性細胞)を欠失させた研究の結果からは、骨細胞は骨密度を上昇させる機能を有していると考えられていた。しかしながら、実際には骨細胞は異なる機能を有していることを見出した(論文作成中)。さらに、この特異的な骨細胞欠失の効果は若齢と老齢で全く異なることも明らかになった。また、骨細胞欠失老齢マウスに対するSenolytics (Dasatinib + Quercetin)投与での老化細胞除去は対照群と同様の効果が観察されたことから、老化細胞が産生する細胞老化関連分泌形質(SASP)による骨減少症は骨細胞以外の細胞に起因している可能性が示唆された。骨細胞欠失マウスに対する後肢免荷モデルでは、骨細胞欠失によって後肢免荷による骨量減少がキャンセルされたことから、骨細胞が力学的刺激を感受し、骨構造を適切に維持する機能を有することが再確認された。

骨細胞欠失の若齢と老齢とでの異なる効果に関連するメカニズムを探索するため、若齢・老齢の *OsgI^{Cre}* Ai9マウス由来長管骨より骨細胞をソーティングし、シングルセルRNA-seq解析を行い、骨細胞性クラスターをサブクラスタリングしたところ、X個のクラスターに分かれることが明らかになった(論文作成中)。これらX個のクラスターにそれぞれ特徴的な遺伝子マーカーが同定され、それらのうちの1つは最も成熟した骨細胞で発現するとされる *Fbln7*が含まれていた。また、それぞれ骨吸収・破骨細胞分化促進性遺伝子を発現するクラスターや、骨形成・骨芽細胞分化促進性遺伝子を発現するクラスター、それらの中間的なものや、全身性の機能に関連すると考えられる遺伝子発現クラスターなどが同定された。加齢に伴ったクラスター構成の変動も観察され、この変化が上記の骨細胞欠失の若齢・老齢とでの異なる結果に至っている可能性が示唆された。

また、若齢と老齢で骨細胞クラスターでの遺伝子発現に変化のあった液性タンパク質をコードする遺伝子Yを同定した。*OsgI^{Cre}*マウスを用いて骨細胞特異的にYを欠損させたマウスでは、通常食下でも加齢に伴った顕著な体重上昇を示すことが明らかになった。この表現型は *Adipoq-Cre*を用いた脂肪細胞特異的欠損マウスや *Ckmm-Cre*を用いた骨格筋特異的欠損マウスでは観察されなかったことから、骨細胞で発現するYが重要であることが確認された。また、Yの受容体として知られている遺伝子Zの様々な細胞・臓器特異的欠損マウスを作製・解析してその標的臓器を探索した。*OsgI^{Cre}*(骨細胞特異的)、*Adipoq-Cre*(脂肪細胞)、*Alb-Cre*(肝細胞)、*Vav1-iCre*(造血系細胞)、*Csflr-iCre*(ミエロイド系細胞)、*Tnfrsf11a-Cre*(RANK⁺細胞; 組織マクロファージ等)を用いて遺伝子Zを欠損させても加齢に伴った体重変化の表現型は観察されなかった一方、*Ckmm-Cre*を用いた骨格筋特異的な遺伝子Z欠損マウスでは骨細胞特異的遺伝子Y欠損マウスと同様の加齢に伴った体重上昇が観察された。さらに、タンパク質Yが直接骨細胞から骨格筋細胞に作用しているかを確認するため、*OsgI^{Cre}*を用いた骨細胞特異的メチオニンtRNA合成酵素(MetRS)の変異体MetRSL274G発現マウスを使用し、骨細胞特異的にアジド基を有する人工タンパク質によるラベリング・クリックケミストリー・精製・質量分析を行ったところ、骨細胞由来のタンパク質Yが骨格筋に作用している可能性が示唆された。

骨細胞特異的遺伝子Y欠損マウスおよび骨格筋特異的遺伝子Z欠損マウスは、どちらも摂食量に変化は観察さ

れなかったが、内臓脂肪(精巣上体白色脂肪組織)および皮下脂肪(鼠径白色脂肪組織)はどちらも加齢に伴って有意な上昇をみとめた。骨格筋の重量や線維径に違いがない一方、耐糖能やインスリン抵抗性が加齢に伴い悪化しており、酸素消費量の低下もみとめられた。骨細胞特異的遺伝子Y欠損マウス骨格筋のTotal RNA-seq解析を行ったところ多数の遺伝子変動がみとめられ、低下した遺伝子のパスウェイ解析を行ったところ、とくに脂肪酸代謝経路に関わる遺伝子発現に変化が観察された。この変化はqPCRでも確認され、脂肪酸代謝に関わる重要な転写因子Aの発現も低下していた。実際に血中のトリグリセリドは骨細胞特異的遺伝子Y欠損マウスおよび骨格筋特異的遺伝子Z欠損マウスのどちらのマウスでも加齢に伴って上昇しており、さらに骨格筋中のトリグリセリドの上昇もみとめられた。加えて、*OsgI^{Cre}*を用いた骨細胞特異的遺伝子Y過剰発現マウスを作製したところ、高脂肪食による体重増加に対する耐性を示すことも確認された。

以上から、本研究では新規骨細胞特異的Creマウスを利用し、骨細胞誘導性欠失やシングルセルRNA-seq解析から、骨細胞が若齢と老齢で異なる機能を有する可能性が明らかにされた。また、加齢に伴い発現が低下する骨細胞発現タンパク質Yは骨格筋の受容体Zに作用し、転写因子Aなどを制御することによって脂肪酸代謝などを制御することが示唆された。