

## 破骨細胞分化ステージの詳細

東京大学大学院 医学系研究科 骨免疫学寄付講座  
寺島 明日香

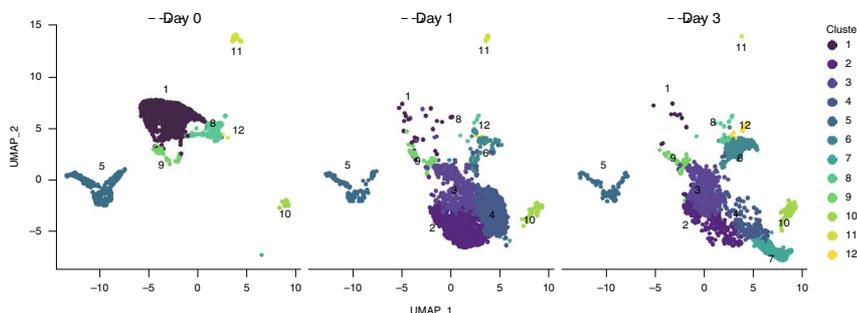
破骨細胞は骨髄に存在する造血幹細胞から分化するミエロイド系の細胞であることが知られており、生体内においては唯一骨を吸収することができる細胞である。正常な骨質を維持するためには、古い骨を除去し、新しい骨を形成するというサイクルを生涯にわたり繰り返すことが重要である。ただ、この骨吸収と骨形成のバランスが崩れてしまうと、様々な骨疾患につながる恐れがある。例えば関節リウマチは自己免疫疾患であるが、破骨細胞の異常な活性化を誘発することが知られている。関節近傍で活性化した破骨細胞は、不可逆的に関節を破壊してしまう。関節リウマチで見られる、こうした炎症性骨破壊をコントロールするには破骨細胞分化や活性を制御することが求められる。そのため、破骨細胞分化を活性化させるサイトカインやシグナルについての研究が精力的に進められてきた。こうした取り組みにより、ミエロイド系前駆細胞から破骨細胞へ分化するプロセスが明らかになってきた。破骨細胞前駆細胞上に発現する RANK 受容体に、RANK リガンド (RANKL) が結合し RANK シグナルが活性化することが破骨細胞分化に必須であることが明らかとなっている。

生体内の破骨細胞分化、破骨細胞前駆細胞を評価するには、現在のところ、破骨細胞特異的に発現する酒石酸抵抗性ホスファターゼ (TRAP) を病理組織で染色して検出したり、破骨細胞の *ex vivo* での培養が一般的である。しかしながら、特に破骨細胞の *in vitro* での培養はサンプル調整やテクニックによるばらつきが見られる場合もある。また、破骨細胞培養分化実験は培養開始時に含まれている破骨細胞前駆細胞数を反映する。前駆細胞については様々な報告があるものの、血球細胞分化ヒエラルキーのどの分化ステージに破骨細胞前駆細胞が存在しているのかについての詳細は明らかではない。本研究では、*in vitro* 分化培養系破骨細胞における発現遺伝子をシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) 技術を用いて解析することで詳細な検討ができると考えた。生体内の破骨細胞前駆細胞を簡便にモニターするシステムを確立することができれば、今後の飛躍的に進むと考えた。生体における破骨細胞前駆細胞の実態を明らかにすることで破骨細胞が関与する疾患の病態解明の基盤構築を目指す。

### 1. *In vitro* 分化培養系破骨細胞の scRNA-seq 解析

マウス骨髄細胞を M-CSF 存在下で 2 日間培養後、さらに M-CSF と RANKL 存在下にて 3 日間培養し、*in vitro* において破骨細胞分化を誘導した。RANKL 刺激前を Day 0、刺激後 1 日目 (Day 1)、3 日目 (Day 3) とし、それぞれ、2, 190、2, 649、2, 389 細胞を scRNA-seq 解析を行なった (図1)。

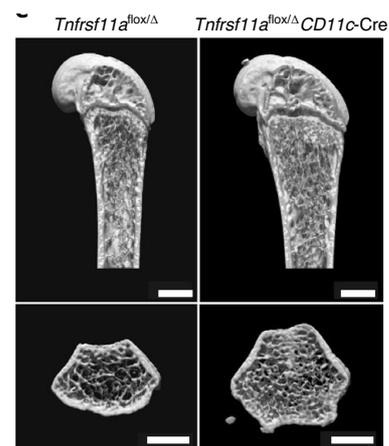
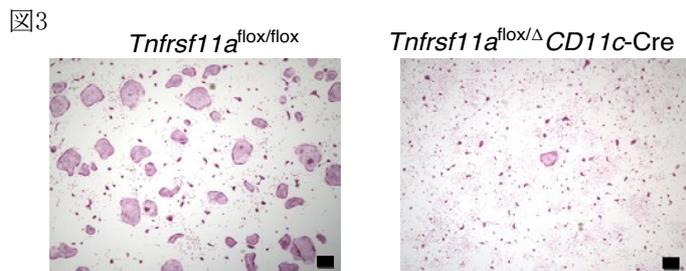
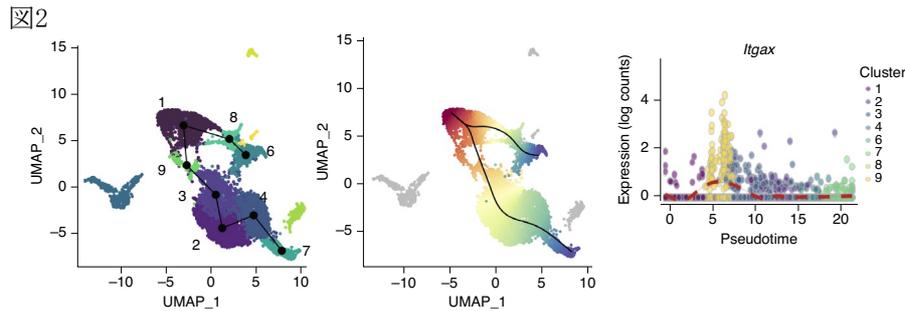
図1



12個のクラスターに分かれ、特にDay 3で検出された7個のクラスターには破骨細胞分化マーカーとして特徴的な遺伝子の発現(*Acp5*, *Ctsk*, *Mmp9*, *Nfatc1*, *Dcstamp* and *Atp6v0d2*)を認めた。

## 2. 機械学習アルゴリズムによる破骨細胞分化経路予測

次に、scRNA-seqデータを用いて、擬時系列解析を行ない、。すると、クラスター1は、7へと分化する過程でクラスター9→3→2→4の順番に通ることが予測された。この過程では、*Acp5*, *Ctsk*, *Mmp9*, *Dcstamp*, *Ocstamp* and *Atp6v0d2*といった破骨細胞分化に特徴的な遺伝子の経時的な上昇を認める一方、破骨細胞分化を負に制御すると報告のある*Irf8*, *Bcl6* and *Mafk*は発現減少していた。クラスター9に着目すると樹状細胞に特徴的な*Itgax* (CD11c) の発現と抗原提示細胞で重要な遺伝子(*Cd74*, *H2-Aa*, *H2-Ab1* and *H2-Eb1*)の発現が認められた(図2)。樹状細胞の破骨細胞分化への役割は議論が続いているところなので、



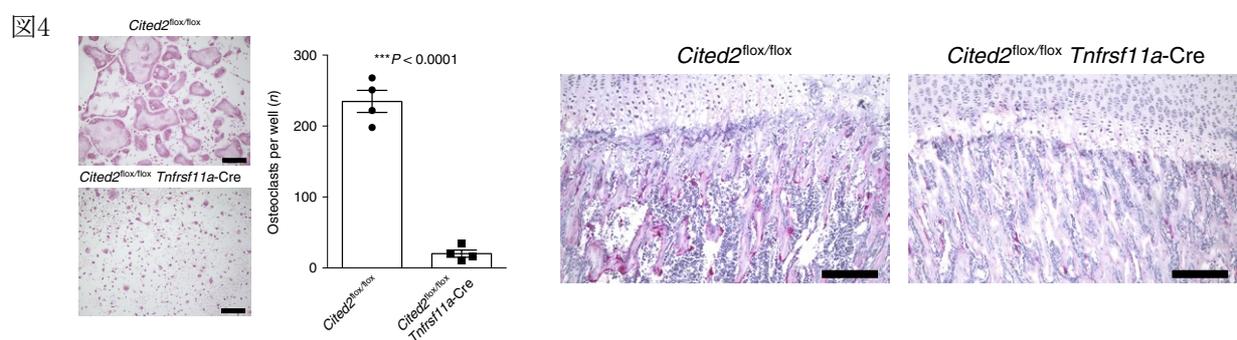
樹状細胞特異的にRANKL受容体であるRANK (*Tnfrsf11a*) を欠損するマウス (*Tnfrsf11a<sup>flox/delta</sup> CD11c-Cre*) の解析を行なった。このマウスでは破骨細胞分化が抑制されており、そのために骨量が増加していた(図3)。したがって、破骨細胞は分化過程で一過的にCD11cを発現することが明らかとなった。

## 3. 破骨細胞分化におけるステップワイズな生物学的過程

破骨細胞分化ステージの詳細を明らかにするため、それぞれのクラスターについて更なる解析をgene ontologyを調べることにした。クラスター1では、ミエロイド系細胞と関連が深いファゴソームやファ後妻トーンシス関連のプロセスが、クラスター9は樹状細胞様前駆細胞のような抗原提示に関与するプロセスが特徴的であった。クラスター3では、RANKLによって誘導される初期遺伝子がドライブされていると考えられる。クラスター2では、RNA代謝が盛んになり増殖のフェーズに入ると考えられた。クラスター4では破骨細胞にコミットした転写プロファイルが観察された。最後にクラスター7においては破骨細胞の機能的な特徴である骨吸収に関連するプロセスが活性化されていることが明らかとなった。以上のことから、破骨細胞分化は、段階的で動的な分子プロセスが起きていることが明らかとなった。

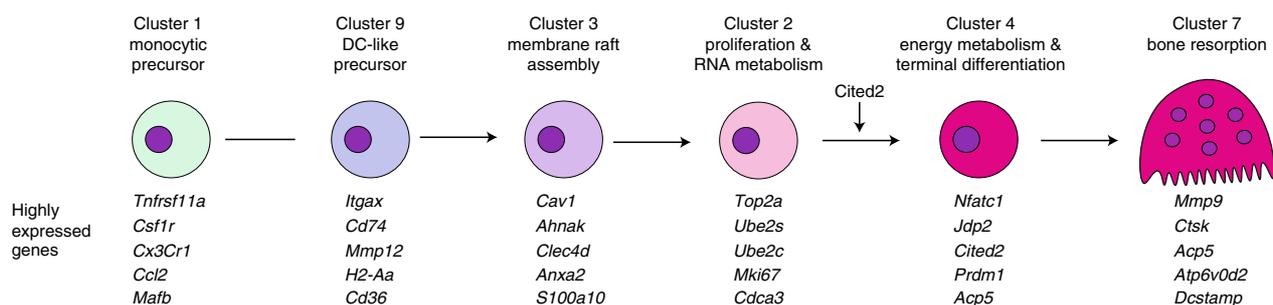
#### 4. 破骨細胞最終分化における分子スイッチとしてのCited2

次にこのデータから、重要な転写因子を探索することにした。すでに破骨細胞分化に重要であるとの報告があるNfatc1やJdp2と同じ様な挙動を示す遺伝子としてcarboxy-terminal domain 2 (*Cited2*)に着目した。*Cited2*欠損マウスは胎生致死であるので、*Cited2*欠損マウス胎児肝臓細胞を用いてin vitroでは骨細胞分化を観察した。すると、*Cited2*欠損マウス細胞からは、クラスター1、9、3、2での発現遺伝子は観察されたものの、クラスター4、7で観察される遺伝子発現は観察されなかったが、細胞周期に関わる*Ccnd1*, *Ccna2*, *Nek6*, *E2f2*, *E2f1*, *Cdc6* and *Dhfr*の発現が高いレベルであることがわかった。これまでに、破骨細胞の最終分化には細胞周期が停止することが重要であることが報告されている。我々のscRNA-seq解析結果からもクラスター2→4の過程で細胞周期が停止しているようであった。そこで、破骨細胞特異的に*Cited2*を欠失するマウス (*Cited2*<sup>fllox/fllox</sup> *Tnfrsf11a*-Cre) を観察すると、破骨細胞分化が抑制されていた (図4)。以上から、*Cited2*は破骨細胞分化過程で重要な細胞周期のスイッチとして働くことが明らかとなった。



本課題により、破骨細胞分化過程における各ステージ間の進行は分子レベルで厳密に制御されており、多段階的なプロセスによって運命決定されていることが1細胞レベルで解明された (図5)。

図5



#### 参考文献

Tsukasaki M, Huynh NC, Okamoto K, Muro R, Terashima A, Kurikawa Y, Komatsu N, Pluemsakunthai W, Okamura T, Nitta T, Penninger JM, Takayanagi H. Stepwise cell fate decision pathways during osteoclastogenesis at single-cell resolution. **Nature Metabolism**, 2: 1382-1390, 2020