

83. 骨の恒常性メカニズムの解明

中島 友紀

Key words : 骨細胞, 骨芽細胞, 骨恒常性

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

緒言

生活・人生の質 (QOL) に直結する運動機能の保持は、人間らしい生活を営むために重要な要素であり、生体の基軸となる骨の恒常性は、破骨細胞による骨吸収 (破壊) と骨芽細胞による骨形成 (骨新生) の動的なバランスによって維持されている。破骨細胞や骨芽細胞が骨表面で機能する一方で、骨細胞は骨内に埋もれた細胞であり、骨を構成する細胞の約 90% の数を占め、細胞突起によって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。この特殊な細胞間ネットワークから、骨細胞が破骨細胞と骨芽細胞をコントロールすることで、骨の動的な恒常性を制御し再構築を実現する司令細胞であると推測されている^{1,2)}。

骨細胞の研究は、骨という特殊な硬組織に細胞が埋没していることから、単離培養することが難しく、これまで、その細胞特性は、組織・病理学的を中心とした形態の所見から推測される域を脱していなかった。著者は、骨細胞だけで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³⁾。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、骨リモデリングの開始が骨細胞によって制御されていることを明らかにした³⁾。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同定した Sema3a が、破骨細胞分化抑制と骨芽細胞分化促進を同時に制御するこれまでに類を見ない骨保護分子であること見出した⁴⁾。しかしながら、骨細胞がどのように骨表面の破骨細胞や骨芽細胞を制御し、骨の恒常性を司っているのか？また、骨細胞ネットワークの破綻が、どのような骨疾患および全身性の疾患に関与しているのか？いまだ不明な点が多いのが現状である。

本研究では、骨細胞の細胞特性と骨恒常性のメカニズムを明らかにするため、遺伝子改変マウスを用いた骨細胞単離法や新規骨細胞分化系の確立から、骨細胞の発現遺伝子・タンパクを網羅的に解析しデータベースを構築する。候補遺伝子による骨細胞分化能や骨構成細胞間クロストークなどを細胞レベルで検討し、骨構成細胞特異的な遺伝子改変マウスの解析に繋げることで、骨における骨細胞の本質的な役割に迫ることを目標にする。

方法および結果

1. 骨細胞の網羅的な遺伝子・タンパク発現解析

骨細胞の初代培養系の確立は立ち遅れていたが、著者は、最近、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³⁾。本研究では、この方法を活用し骨芽細胞と骨細胞を実験に用いて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獲得した (図 1A)。さらに後述の骨細胞新規分化系を用いて、網羅的なプロテオーム解析を実施することで、骨芽細胞と骨細胞の発現遺伝子・タンパク質の情報を集積し、バイオインフォマティクスなデータベースを完成させた (図 1B)。

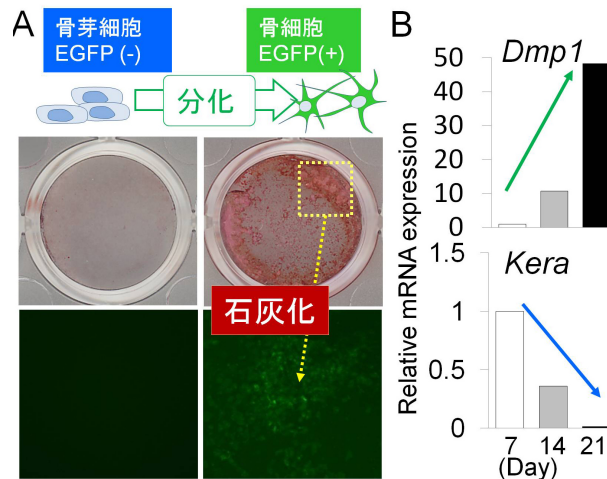


図1. 骨細胞分化系の確立.

A) アリザリン染色. B) 骨細胞・骨芽細胞特異的遺伝子発現の推移.

2. 骨芽細胞から骨細胞への細胞分化系の構築

骨芽細胞が骨形成時に、骨に埋没し骨細胞へ最終分化すると考えられているが、その詳細は、今だ不明な点が多いのが現状である。著者は、以前、骨細胞特異的なプロモーター Cre と CAG-CAT-EGFP アレルを持つ遺伝子改変マウスを開発しており、骨細胞 (EGFP 陽性) と骨芽細胞 (EGFP 陰性) を単離培養することを可能にしている³⁾。本研究では、骨芽細胞 (EGFP 陰性) から骨細胞 (EGFP 陽性) への最終細胞分化系を構築した (図 2A)。EGFP 陽性の骨細胞の周辺は、石灰化状態が進み、骨形成時に骨細胞が埋没していくことが *in vitro* 実験系で再現できた (図 2A)。さらに経時的な分化状態から、骨芽細胞および骨細胞特異的な遺伝子解析を実施したところ、分化に伴い骨芽細胞は、その細胞特性を失い、骨細胞の細胞特性を獲得していくことが見出された (図 2B)。この分化系の確立は、大量の骨細胞を獲得することができ、これまで不可能であった網羅的なプロテオーム解析を実現させる足掛かりとなった (図 2B)。

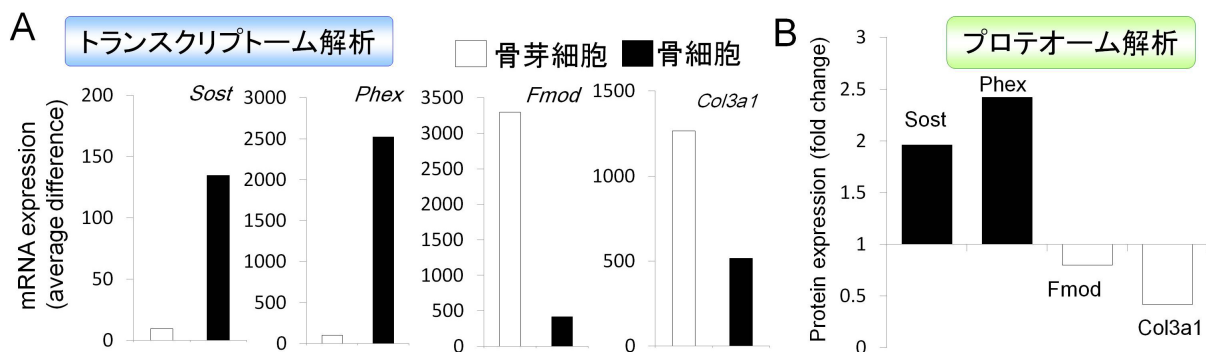


図2. 骨芽細胞・骨細胞の遺伝子・タンパク質発現解析.

A) 特異的な遺伝子発現. B) 特異的なタンパク質発現.

3. 骨細胞分化スクリーニング系の構築と応用

本研究で開発した骨細胞に分化すると蛍光を発するシステムを活用し、イメージングサイトメーターを用いて、リアルタイムな蛍光ビジュアルおよび定量的な解析法を確立した。骨芽細胞に様々なサイトカインやホルモン、また、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、骨細胞への分化を正確に解析することで、細胞分化を誘導する分子をスクリーニングする実験系が世界に先駆け完成した (図 3)。この実験系は、様々な分子の機能解析に留まらず、骨細胞を標的にした薬剤スクリーニングにも活用できる可能性があり、大きな意味を持つと考えられる。

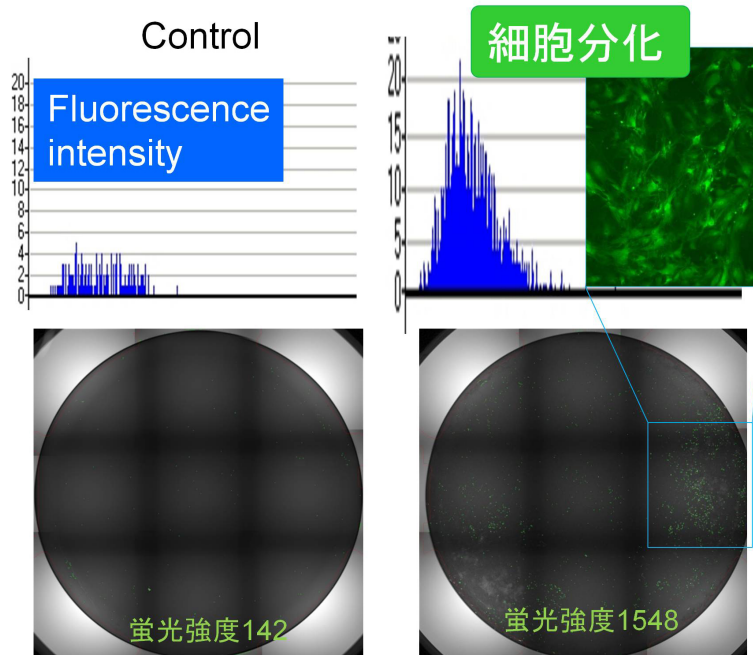


図3. 骨細胞分化スクリーニング系の確立.

イメージングサイトメーターを用いたリアルタイムな蛍光ビジュアルおよび定量的な解析法.

考 察

近年、骨細胞が特異的に産生する FGF-23 が、腎臓に作用し全身のリン代謝を制御すること、さらに心肥大に直接関係することも報告されてきた。すなわち、骨を運動器の一部と考えるだけでなく、内分泌器官として、骨が多臓器を標的とする生命システムの連環機構の一部であると、現在考えられつつある^{2,5)}。従って、本研究で取り組む骨細胞による骨恒常性制御メカニズムの解明が、今後、骨による多臓器制御システムを理解するうえでも大きな意味を持つと考えられる。本研究では、著者が世界に先駆け構築した骨細胞の単離法や新規分化系を用いて、骨細胞の網羅的な遺伝子・タンパク発現解析の実施と分化評価システムを構築した。これらの情報と実験系をプラットフォームとし、新規候補遺伝子の機能を細胞および生体レベルの解析に繋げることで、骨細胞の本質的な役割と骨恒常性メカニズムが解明され、世界に先駆けた革新的治療法の確立や早期診断バイオマーカーへの応用など、将来の骨疾患医療に繋がることが期待される。

文 献

- 1) Dallas, S. L., Prideaux, M. & Bonewald, L. F. : The osteocyte: an endocrine cell and more. *Endocr. Rev.*, **34** : 658-690, 2013.
- 2) Nakashima, T., Hayashi, M. & Takayanagi, H. : New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.*, **23** : 582-590, 2012.
- 3) Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J. Q., Bonewald, L. F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E. F., Penninger, J. M. & Takayanagi, H. : Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med.*, **17** : 1231-1234, 2011.
- 4) Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A. & Takayanagi, H. : Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature*, **485** : 69-74, 2012.
- 5) DiGirolamo, D. J., Clemens, T. L. & Kousteni, S. : The skeleton as an endocrine organ. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **8** : 674-683, 2012.