

骨膜の幹細胞が骨を伸ばす

1. 発表者：

塚崎 雅之（東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 免疫学講座 特任助教）

高柳 広（東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 免疫学講座 教授）

2. 発表のポイント：

◆骨は、骨を長く伸ばす「内軟骨性骨化」と、骨を太くする「膜性骨化」という2つの仕組みにより成長します。この2つの骨化様式は、それぞれ異なる骨格幹細胞によって担われる、独立した現象であると考えられてきました。今回、我々は世界で初めて、骨を太くする「骨膜幹細胞」が、骨を長くする「成長板幹細胞」を遠隔からコントロールすることで、生後の骨格成長に重要な役割を果たすことを発見しました。

◆骨膜幹細胞の数が減少すると、骨が太く成長できないだけでなく、骨の伸長も障害されることを見出しました。原因を探索し、骨膜幹細胞が骨化制御因子 **Indian Hedgehog (Ihh)** を発現していること、これが成長板幹細胞の増殖を促すことで、骨を長く伸ばすことを突き止めました。

◆本研究により、これまで独立現象とされてきた2つの骨化様式を担う幹細胞の間にクロストークが存在することが明らかとなり、骨成長機構の新たな概念が打ち立てられました。整形外科や歯科口腔外科の臨床現場では古くから、骨折や骨再生の手術の際に、骨膜を保存することの重要性が知られていましたが、本研究はそのメカニズムの一端を明らかにしたものであり、骨膜を標的とした新たな骨再生法や、低身長症、骨粗鬆症、難治骨折、骨腫瘍など様々な骨疾患に対する治療法の確立につながると期待されます。

3. 発表概要：

脊椎動物の「かたち」を決定している骨格系は、身体を支え運動を可能とする運動器としての役割だけでなく、ミネラル代謝調節や造血といった多様な機能を併せ持ち、生体恒常性の維持に必須の役割を担っています。四肢を構成する長管骨の縦軸方向への成長は、骨内部の成長板軟骨に存在する成長板幹細胞(注 1)が増殖・分化を繰り返すことにより駆動されており、このプロセスは「内軟骨性骨化(注 2)」と呼ばれ、個体のサイズを決定づけます。一方で、頭蓋骨および鎖骨の形成と、長管骨の横軸方向への成長は、骨の外周を包む骨膜に存在する骨膜幹細胞(注 3)により仲介され、このプロセスは軟骨形成を伴わないことから「膜性骨化(注 4)」と呼ばれています。

生後の急激な身長増加は、乳幼児期、学童期、思春期にそれぞれ栄養、成長ホルモン、性ホルモンが直接的・間接的に成長板軟骨に作用することにより実現され、思春期以降の骨端線の閉鎖（成長板軟骨の癒合）により停止すると考えられています。しかしながら、内軟骨性骨化による適切な骨成長の維持機構および骨端線閉鎖の分子機構に関しては未だ不明な点が多く、様々な原因で生じる低身長症に対する有効な予防・治療法の開発が重要な課題となっています。また、内軟骨性骨化と膜性骨化は、それぞれ局在の異なる骨格幹細胞(注 5)によって制

御される独立した現象と考えられており、骨膜幹細胞と成長板幹細胞の関係性や相互作用に関してはこれまで分かっていませんでした。

東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 免疫学分野の塚崎 雅之 特任助教と高柳 広 教授らの研究グループは、骨膜幹細胞が膜性骨化だけでなく生後の内軟骨性骨化にも重要な役割を担うことを解明し、骨膜幹細胞の機能障害が早期の骨端線閉鎖による重篤な低身長症と骨量減少を引き起こすことを明らかにしました。本研究成果は、骨格系制御システムの基本原理の理解を深めると同時に、低身長症や骨粗鬆症をはじめとする多くの骨疾患の原因解明及び新規制御法開発や、新たな骨再生法の創出につながることで期待されます。

本研究は、日本学術振興会 科学研究費補助金（15H05703, 18H02919, 18K19438, 19K18943, 18J00744, 21H03104, L20539）や、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST）「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」研究開発領域における研究開発課題「組織修復型免疫細胞の解明とその制御による疾患治療の開発」（研究開発代表者：高柳 広）、革新的先端研究開発支援事業（PRIME）「健康・医療の向上に向けた早期ライフステージにおける生命現象の解明」研究開発領域における研究開発課題「早期ライフステージにおける骨成長の維持及び破綻機構の解明」（研究開発代表者：塚崎 雅之）などの支援を受けて行われました。

4. 発表内容：

【研究の背景】

近年、成長板幹細胞と骨膜幹細胞がマウス骨組織より単離・解析され、局在と性質の異なる骨格幹細胞が、それぞれ局所的に増殖・分化することで、内軟骨性骨化と膜性骨化を制御するという概念が提唱されました（図 1）。世界中で、骨格幹細胞の運命（どこからやってきて、どこで、どのような細胞に分化してゆくか）に関する研究が精力的に行われている一方で、骨格幹細胞が可溶性因子を分泌し、他の細胞と相互作用する可能性に関しては調べられていませんでした。成長板幹細胞が適切に維持されるためには、Ihh(注 6)のシグナルを受け取る必要があります。成長板幹細胞の子孫細胞である肥大軟骨細胞が Ihh を発現していることが知られていました。しかしながら、他の細胞が産生する Ihh が成長板幹細胞を制御する可能性に関しては検証されていませんでした。

【研究成果の概要】

私たちは当初、タンパク質修飾酵素のひとつである PRMT5(注 7)の破骨細胞(注 8)における機能を探索する目的で、Cathepsin K(CtsK)-Cre(注 9)を用いて、PRMT5 遺伝子をカテプシン K 発現細胞で特異的に除去したマウス（PRMT5^{fllox/Δ} CtsK-Cre）を作製しました。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ました。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ました。原因を探索してゆき、CtsK-Cre が骨膜幹細胞でも作動していること、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を突き止めました。すなわち、私たちは期

せずして骨膜幹細胞の数が生後減少するマウスを作出し、骨膜幹細胞の数が減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事実に気がつきました。

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した。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いました。そこで骨膜幹細胞で高発現する可溶性因子を探索し、骨化制御因子 **Ihh** を同定しました。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ました。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、成長版幹細胞の増殖が阻害され、3週齢（ヒトだと幼児期）以降に重篤な骨成長障害を呈することが分かりました。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ました。以上から、可溶性因子を介した幹細胞クロストークが生後の骨成長を制御するという新たな概念が創出され、膜性骨化と内軟骨性骨化システムは互いに相互作用しつつ複雑な骨格系を形成している可能性が示唆されました（図2）。

【研究成果の意義】

本研究により、異なる幹細胞間の相互作用が、骨の成長に寄与すること明らかとなりました。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ます。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含みます。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な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ます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Nature Communications」（オンライン版：7月18日）

論文タイトル：Periosteal stem cells control growth plate stem cells during postnatal skeletal growth

著者：Masayuki Tsukasaki, Noriko Komatsu, Takako Negishi-Koga, Nam Cong-Nhat Huynh, Ryunosuke Muro, Yutaro Ando, Yuka Seki, Asuka Terashima, Warunee Pluemsakunthai, Takeshi Nitta, Takashi Nakamura, Tomoki Nakashima, Shinsuke Ohba, Haruhiko Akiyama, Kazuo Okamoto, Roland Baron and Hiroshi Takayanagi1*

DOI 番号：10.1038/s41467-022-31592-x

アブストラクト URL : <https://www.nature.com/articles/s41467-022-31592-x>

6. 問い合わせ先 :

【研究に関すること】

東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 免疫学分野

教授 高柳 広 (たかやなぎ ひろし)

TEL : 03-5841-3373

FAX : 03-5841-3450

E-mail : takayana@m.u-tokyo.ac.jp

【AMED 事業に関すること】

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)

シーズ開発・研究基盤事業部 革新的先端研究開発課

TEL : 03-6870-2224

E-mail : kenkyuk-ask@amed.go.jp

疾患基礎研究事業部 疾患基礎研究課

免疫アレルギー疾患実用化研究事業

TEL : 03-6870-2286

E-mail : nambyo-i@amed.go.jp

7. 用語解説 :

(注 1) 成長板幹細胞

2019年に発見された、成長板軟骨の休止細胞層に存在する骨格幹細胞であり、軟骨細胞へと分化することで内軟骨性骨化を制御する。

(注 2) 内軟骨性骨化

骨内部に存在する成長板軟骨でつくられた軟骨組織が骨組織へと置換されてゆく骨化様式であり、骨の縦軸方向への成長を引き起こす。

(注 3) 骨膜幹細胞

2018年に発見された、皮質骨外側の骨膜に存在する骨格幹細胞であり、骨芽細胞へ直接分化することで膜性骨化を司る。

(注 4) 膜性骨化

骨外周を包む骨膜で起こる骨化様式であり、軟骨組織を介さずに直接的に骨が形成され、骨の横軸方向の成長を引き起こす。

(注 5) 骨格幹細胞

骨組織に存在し、自己複製能力と骨格系細胞への分化能力を併せ持つ間葉系幹細胞。成長板軟骨、骨膜、骨髄に、それぞれ種類の異なる骨格幹細胞の存在が報告されている。

(注 6) Indian Hedgehog (Ihh)

ヘッジホッグファミリーに属する可溶性因子であり、軟骨細胞の増殖や分化、骨芽細胞分化を制御することで、骨化のマスター制御因子として働く。

(注 7) PRMT5

標的タンパク質のアルギニン残基をメチル化することで、様々なタンパク質の機能を修飾する酵素。

(注 8) 破骨細胞

単球/マクロファージ系前駆細胞由来の多核巨細胞であり、生体において骨吸収を担う唯一の細胞。骨表面に強固に接着し、カテプシン K やマトリックスメタロプロテアーゼなどのタンパク分解酵素と、酸を放出することで骨基質を分解する。

(注 9) Cathepsin K(CtsK)-Cre

カテプシン K 遺伝子のプロモーター依存的に、Cre (loxP と呼ばれる DNA 配列に対して働く DNA 組み換え酵素) を発現するシステム。カテプシン K は破骨細胞が分泌するタンパク質分解酵素であり、CtsK-Cre は破骨細胞特異的に特定の遺伝子を除去する目的で広く使用されてきたが、骨膜幹細胞においても発現することが近年報告された。

8. 添付資料：

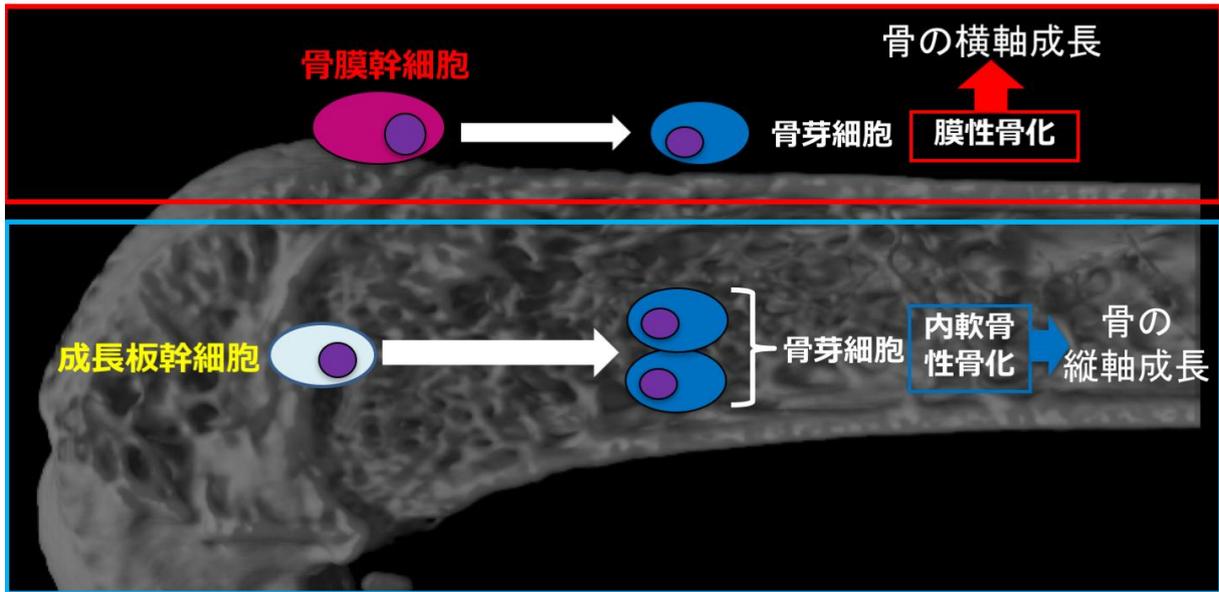


図 1: 骨成長メカニズムの既存の概念

骨は内軟骨性骨化と膜性骨化により成長し、2つの骨化様式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。

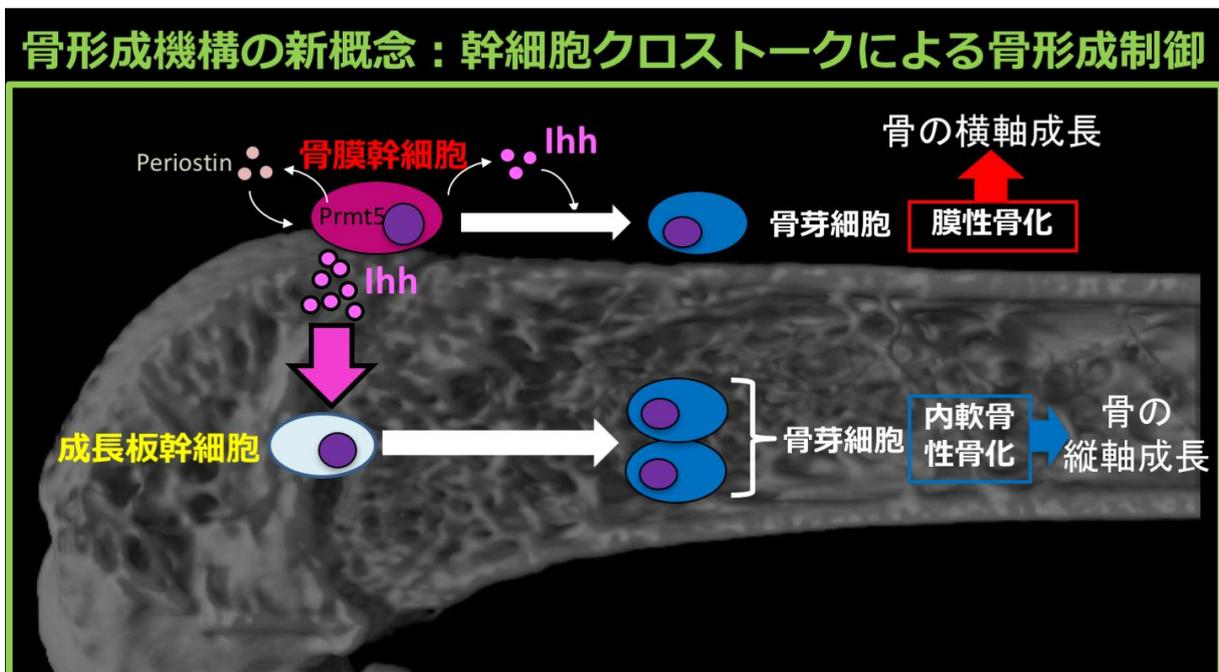


図 2: 骨成長メカニズムの新概念

骨膜幹細胞の恒常性は Prmt5/Periostin 軸により維持されており、皮質骨外側で骨芽細胞へと分化することで膜性骨化を司る。同時に、骨膜幹細胞は可溶性因子 Ihh を産生することで成長板幹細胞の増殖を促し、生後の内軟骨性骨化にも重要な役割を果たす。