

# 研究報告書

## 「運動器の動的恒常性を司るロコモ・サーキットの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 中島友紀

### 1. 研究のねらい

運動器の主な構成要素である骨と筋肉は、ヒト組織重量の約 70%を占める臓器であり、動的な恒常性を維持しながら統合的な運動機能を実現している。生体はレジスタンストレーニングやスポーツなどの運動によるメカニカルストレスに应答し骨と筋肉の組織量を増加させる。一方、宇宙空間など力学的負荷が少ない環境においては、速やかな骨と筋肉の減少が引き起される。また、加齢に伴うサルコペニアや、様々な神経系、運動器系疾患は、日常生活動作を低下させ、自立した生活を障害することで寝たきり生活へと繋がり、生命予後を決定する大きな要因となっている。

メカニカルストレスが増えると骨と筋肉は丈夫になり、逆にストレスが減ると骨と筋肉が弱くなることを、人類は経験的に理解している。しかし、骨と筋肉は、どの様に力学的負荷や環境変化に対応し、同時にその組織量を再構築するのか？骨と筋肉は、個別の臓器として力学的負荷を感受し、その再構築の実現や破綻に至るのか？または、骨と筋肉の臓器間でいかなる連環クロストークがあり協調的な生命システムとして、その再構築や破綻を導いているのか？など、不明な点が多いのが現状である。

また、運動機能の低下で寝たきり状態になると認知症や他の内臓器疾患が発症しやすいことや、歯牙の崩落により咀嚼機能が低下した患者では、記憶や学習能力の低下が見られることが知られている。すなわち、運動器系の破綻が全身性の生体制御機構に関与していることが予測されるが、それらの制御メカニズムもまた、いまだに十分に理解されているとは言い難い。

本研究では、運動器の主軸となる骨と筋肉の臓器連環クロストークを「ロコモ・サーキット」と名付け、骨・筋肉連環因子の同定や、その制御機構と破綻のメカニズムを明らかにすることで、運動器の動的恒常性の理解と新規治療法の分子基盤の確立に繋げることを目標としている。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究は、ロコモ・サーキットの制御機構を解明するため、細胞および生体レベルでの力学的負荷実験や新規細胞分化実験系を構築した。そして、細胞や組織の網羅的なトランスクリプトームやプロテオーム解析を展開し、骨と筋肉の発現遺伝子・タンパク質の基盤情報のデータベースを構築、この情報をプラットフォームとすることで、ロコモ・サーキットを制御する分子の同定を試みた。また、骨・筋肉連環因子の候補遺伝子の改変マウスを作出し、生体レベルでその分子機構の解明を試みた。さらに、ハイスループットな骨・筋肉の機能スクリーニング系を新たに構築し、低分子ケミカルライブラリーを用いて、ロコモ・サーキットの人為的な制御法の確立に道をつけた。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A: 骨・筋肉連環因子の同定

骨細胞特異的蛍光マウスを用いて採取した高純度の骨細胞を用いて、網羅的なトランスクリプトーム解析を実施し、全遺伝子の発現プロファイリングを構築した。また、新たに構築された骨細胞分化実験系(研究テーマ B)を活用し、網羅的なプロテオーム解析を実施することで、骨形成系細胞である骨芽細胞と骨細胞の発現タンパクの差異を明確に明らかにすることに成功した。また、骨細胞の *in vitro* メカニカルストレス実験系(伸張負荷刺激 3 次元培養系)の構築を試み、力学的な環境変化に伴う遺伝子の発現を網羅的に解析した。さらに、筋分化系における遺伝子発現のプロファイリングを試みた。

生体レベルでのメカニカルストレス免荷モデルとして、新規廃用性筋萎縮モデルを作成、メカニカルストレス負荷モデルとして、自発的なレジスタンストレーニングとなるマウスクライミング実験系の確立や強制的レジスタンストレーニングであるトレッドミル運動実験系を構築から、骨と筋組織の変動解析を実施した。本生体レベルでの実験系の構築が、網羅的なトランスクリプトーム解析のサンプル獲得を可能とした。

老化などに伴う歯牙の崩落により咀嚼機能が低下した場合、高次脳機能など様々な全身性の生体制御に影響を及ぼすことが知られている。咀嚼機能は、顎骨とそれを基軸として駆動させる筋力に依存するため、ロコモ・サーキットによる全身性の制御機構を解析する上で重要な鍵となると考えられた。そこで、新規の無歯顎モデルなど研究デバイスを構築し高次脳機能の解析を試みた。また、餌の硬度を変化させることで咀嚼機能を変化させる実験系の構築にも成功し、高次脳機能と咀嚼機能の連環関係を見出すモデルの構築ができたと考えられる(論文投稿中)。

### 研究テーマ B: 細胞レベルでの骨・筋肉連環因子の機能解析

これまで明確な実験方法が確立されていない骨細胞の分化実験系を構築することができた。遺伝子改変マウスを用いたこの方法は、骨芽細胞(EGFP 陰性)から骨細胞(EGFP 陽性)へ分化をビジュアル化・定量解析することができる。網羅解析(研究テーマ A)から同定される候補因子のスクリーニングに活用することが可能となり、今後、本研究テーマを加速させることが期待される。

また、細胞融合により成熟・機能する破骨細胞の分化過程を定量化する実験系を構築した(論文報告 2014)。これまで破骨細胞の分化評価は、術者の視覚による実測が主であり、細胞融合を特徴となす破骨細胞の正確な評価系は確立されていなかった。本研究では、細胞融合を繰り返し分化・成長する巨細胞である破骨細胞を、細胞質・核を異なる蛍光標識を用い最新のイメージサイトメトリーを活用することで、正確な分化評価系を構築すると可能とした。

さらに、この原理・技術を応用し、筋芽細胞の線維化(筋分化)を正確に評価できる実験系の構築に繋がった。細胞融合により分化する多核の線維細胞である筋芽細胞の評価系は、破骨細胞同様に、これまで正確な評価とは言い難かった。しかし、本実験系を活用することで、筋分化過程のビジュアル化および定量評価が可能になり、様々な遺伝子や化合物の機能解析のデバイスとして、大きな期待がもたらされた。

### 研究テーマ C:生体レベルでの骨・筋肉連環因子の機能解析

生体レベルでロコモ・サーキットを制御する方法を確立するため、研究テーマ B で構築したハイスループットな筋分化スクリーニング系を活用し、低分子ケミカルライブラリーを用いて、大規模な機能スクリーニングを展開した。第 1 スクリーニングとして、筋分化を促進する低分子ケミカルを選抜し、第 2 スクリーニングとして骨芽細胞の促進効果、第 3 スクリーニングとして破骨細胞の抑制効果を検討した。本機能スクリーニングから、現在、いくつかのロコモ・サーキット制御ケミカルが同定され、生体レベルで筋と骨を同時に強化する創薬シーズとして、さらなる解析が進行している。

また、骨・筋肉連環因子の候補遺伝子も、研究テーマ A でいくつか同定されており、新規骨・筋連環遺伝子のコンディショナル KO マウスの作成に着手することができた。さらに、遺伝子の発現プロファイリングから、細胞系譜特異的な遺伝子発現が見出され、この特性を活かした細胞特異的な新規 Cre マウスの作成などデバイス構築など新たな展開へと繋がった。

### 3. 今後の展開

網羅的な遺伝子プロファイリングから得られた骨・筋肉連環因子の候補遺伝子の解析を継続して実施し、遺伝子改変マウスを作出することで、その機能を明らかにする。また、低分子ケミカルライブラリーの大規模スクリーニングから、さらなるロコモ・サーキット制御ケミカルを同定し、生体レベルでの骨粗鬆症や筋萎縮モデルマウスへの薬物動態および薬力学実験を実施し、ロコモ・サーキット破綻を抑制する人為的制御法の確立へと繋げることを目指す。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

研究者は、これまで骨生物学の領域において、研究を展開してきた。しかし、多くの骨疾患の制御法が実現される今日においてもなお、運動器疾患による要介護率の増加に、歯止めがかかっていると言いが難いのが現状である。運動器疾患は、自立した生活を障害し、寝たきり生活へと繋がり、生命予後を決定する大きな要因となっている。

骨と筋肉は、同じ運動機能を担う重要な組織であるにもかかわらず、これまで、個々が独立した基礎医学系分野を形成し発展してきた。従って、統合的な運動器として骨と筋肉の臓器間に連環クロストークが存在し、その破綻が運動器疾患に繋がっているのかについて、いまだ明確な解答は得られていない。本さきがけ研究では、運動器の主軸となる骨と筋肉の臓器連環クロストークを「ロコモ・サーキット」と名付け、その動的な恒常性と破綻メカニズムの解明を目指す試みを提案した。

異なる研究領域間を紡ぎ合わせる挑戦的な研究目的であったが、骨・筋肉連環を司る候補因子の同定や、新規スクリーニング法の構築から創薬ターゲットとなるロコモ・サーキット制御ケミカルの発見など、運動器の動的な恒常性を制御する分子基盤を解き明かす足掛かりが見出されたと考えられる。特に、骨も筋肉も強化するケミカルの同定は、創薬シードとして興味深く、グローバルレベルで急速に進行する高齢化社会において、運動器疾患の制圧・予防を目指した革新的な分子基盤の確立として、社会的に要求が高く大きな意味を持つと考えられる。

また、本さがけ研究の採択によって、内外の研究者との交流や連携が活性・強化され、多くの異分野との共同研究へと繋がっている。そして、様々な学会への招聘や医学賞の受賞などに繋がり、自身のプロモーションも達成された。この挑戦的な新たな研究領域を開拓することで、研究者としても、大きな飛躍に繋がったと考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題は、運動器の主軸となる骨と筋肉の臓器連環クロストークの連環因子の同定、および、その制御機構と破綻のメカニズムを明らかにすることで、運動器の動的恒常性の理解と新規治療法の分子基盤の確立に繋げることを目標としている。細胞および生体レベルでの力学的負荷実験や新規細胞分化実験系を構築し、細胞や組織の網羅的なトランスクリプトームやプロテオーム解析を展開し、骨と筋肉の発現遺伝子・タンパク質の基盤情報のデータベースを構築している。また、これらを制御する分子の同定を試み、骨・筋肉連環因子の候補遺伝子を改変したマウスを作出し、生体レベルでその分子機構の解明を試みている。さらに、ハイスループットな骨・筋肉の機能スクリーニング系を新たに構築し、低分子ケミカルライブラリーを用いてスクリーニング中である。また、手がかりが得られた段階であるが、これまでの研究を進めることにより、実用化できるリード化合物を見出すことが期待される。

論文報告や学会発表は多数に上る、

また、本研究領域内での共同研究の推進の中心的な役割を果たすだけでなく、領域終了後の研究者のネットワーク作りに積極的な役割を果たしている。さがけ研究期間内に准教授から教授への昇進を果たし、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Terashima A, Okamoto K, **Nakashima T**, Akira S, Ikuta K, Takayanagi H. Osteoblasts mediate immunosuppression in sepsis. *Immunity* 44(6):1434-43. (2016).
2. Iida A, Xing W, Docx MK, **Nakashima T**, Wang Z, Kimizuka M, Van Hul W, Rating D, Spranger J, Ohashi H, Miyake N, Matsumoto N, Mohan S, Nishimura G, Mortier G, Ikegawa S. Identification of biallelic LRRK1 mutations in osteosclerotic metaphyseal dysplasia and evidence for locus heterogeneity. *J Med Genet*. 53(8):568-74. (2016).
3. Ono T, Okamoto T, **Nakashima T**, Nitta T, Hori S, Iwakura Y, Takayanagi H. IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells enhance bone regeneration. *Nat Commun* 11(7):10928. (2016)
4. Guerrini MM, Okamoto K, Komatsu N, Danks L, **Nakashima T**, Takayanagi H. Inhibition of the TNF family cytokine RANKL prevents autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunity* 43(6): 1174-85. (2015).
5. Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G, **Nakashima T**, Takayanagi H. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 75(6):1187-95. (2015).

(2)特許出願 該当なし

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な学会発表や科学雑誌業績

国内外の学会における招待講演:19講演(日本骨代謝学会、日本リウマチ学会など)

医科学系雑誌の総説:32報(Clinical Calcium、実験医学など)

受賞業績

平成27年第33回日本骨代謝学会 学術賞

平成26年 平成26年度ノバルティス・リウマチ医学賞