

令和 2 年 6 月 1 日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 9

氏名

松下 祐樹

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

### 記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: アナーバー (国名: 米国)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

間葉系幹細胞の形成と細胞運命の解明: CXCL12 陽性骨髄間質細胞の細胞系譜追跡

3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 5 月 29 日

4. 受入機関名及び部局名

ミシガン大学 歯学部

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注) 「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

## 【これまでの研究の背景】

骨のホメオスタシスの維持や病態発症過程では、間葉系幹細胞が重要な役割を担っており、成体においては骨髄間質に存在する間葉系幹細胞が骨リモデリングや損傷修復時の骨再生過程に大きな役割を果たすと考えられている。ケモカインである CXCL12 (chemokine (C-X-C motif) ligand 12) は胎生期の造血幹細胞の骨髄へのホーミングと成体骨髄での造血幹細胞の維持と免疫担当細胞の産生に必須の因子であり、骨髄間質細胞に発現する (*Nature* 382:635-638, 1996, *Immunity* 25:977-988, 2006)。この CXCL12 を高発現する骨髄間質細胞、すなわち CAR (CXCL12-abundant reticular)細胞が骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を持った間葉系幹細胞としての役割を持つことが *in vitro* の研究により報告されている (*Immunity* 33:387-399, 2010, *Nature* 508:536-540, 2014)。この CAR 細胞は、*in vivo* においてレプチン受容体 (LepR) によって標識される骨髄間質細胞と完全に重複することが近年報告された (*Cell Stem Cell* 15:1-15, 2014)。申請者らは CAR 細胞を時期特異的に標識し追跡できる genetic lineage tracing (遺伝的な細胞系譜の追跡) のマウスモデル (*Cxcl12-iCreER* BAC トランスジェニック (Tg) マウス) を構築して、骨髄に存在する間葉系幹細胞の形成過程、分化動態を *in vivo* において解明することを目的とし、研究を進めてきた。具体的には、*Cxcl12-iCreER<sup>T2</sup>* マウスを *Rosa26-loxP-stop-loxP-tdTomato* (*R26R-tdTomato*) マウスと交配させ、タモキシフェン投与により CXCL12 発現細胞を蛍光分子 tdTomato で永久標識できる *Cxcl12-iCreER; R26R-tdTomato* マウスを作製した。得られたマウスに対して、生後 21 日齢でタモキシフェンを投与し 2 日後に解析したところ、tdTomato は大腿骨、脛骨、頭蓋骨、肝臓、歯髄など様々な組織の細胞で発現していた。その中で、大腿骨では骨髄間質細胞特異的に tdTomato が発現していた。これは以前報告されている *Cxcl12<sup>GFP/+</sup>* マウスにおける GFP の発現パターンと類似しており、*Cxcl12-iCreER* システムは CAR 細胞の一部の細胞を標識していると考えられた。よって今後の細胞系譜解析において有用であることが明らかとなった。

## 【研究目的】

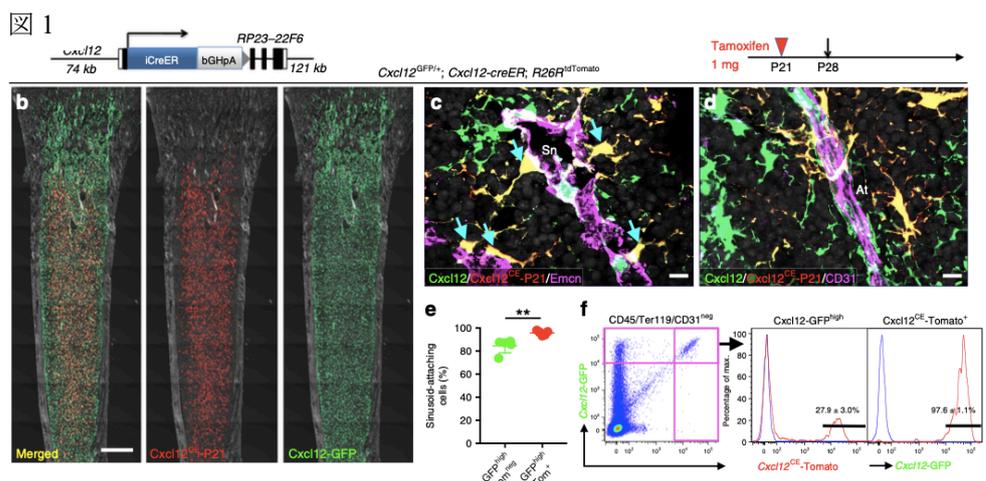
これまでの研究結果を踏まえ、本研究では CXCL12 が骨髄に存在する間葉系幹細胞に発現し、その形成および維持に必須であるとの仮説を立て、CXCL12 を発現する骨髄間質細胞が間葉系幹細胞として骨形成および骨再生へ関与するメカニズムを *in vivo* において解明することを目的とした。

## 【研究の遂行状況及び成果】

### CAR 細胞の多様性と定常状態におけるダイナミクス

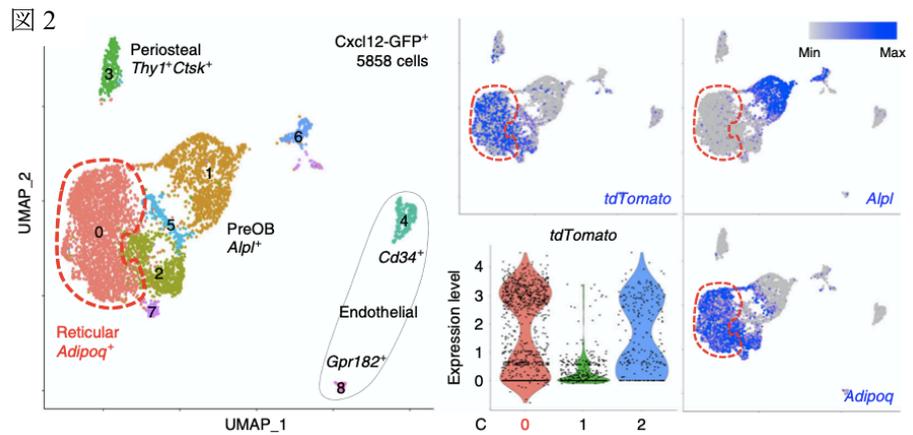
CAR 細胞特異的 *Cxcl12<sup>GFP/+</sup>* マウス (大阪大学長澤先生より供与) と *Cxcl12-iCreER<sup>T2</sup>; R26R-tdTomato* マウスを交配し、作出した *Cxcl12<sup>GFP/+</sup>; Cxcl12-iCreER; R26R-tdTomato* マウスに対して

生後 21 日齢においてタモキシフェンを投与し、7 日後に解析を行い *Cxcl12-iCreER* 陽性細胞の分布を検討した。*Cxcl12-iCreER* 陽性細胞は、



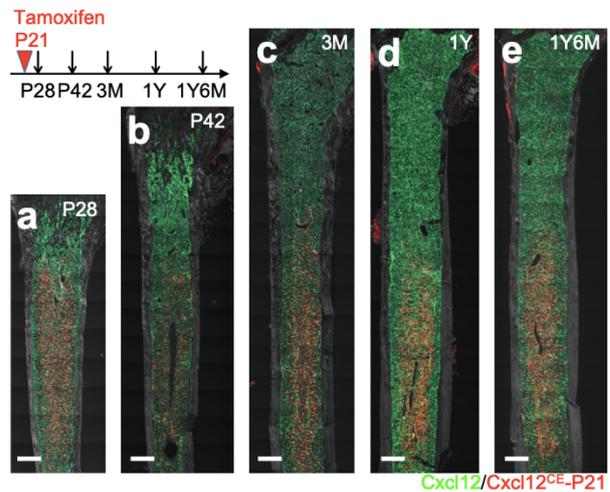
*Cxcl12*-GFP で標識される細胞にほぼ全てが含まれ (97.6%)、GFP 陽性細胞のうち 27.9%を占めており、これらの *Cxcl12*-*iCreER* 陽性細胞は骨髄中央に位置し、Endomucin 陽性の洞様毛細血管に接して存在していた (図 1)。次に *Cxcl12*<sup>GFP/+</sup>; *Cxcl12*-*iCreER*; *R26R*-tdTomato マウスから、

*Cxcl12*-*iCreER* 陽性細胞を含む全ての *Cxcl12*-GFP 陽性細胞をセルソーティングにより採取し、シングルセル RNA 解析を行ったところ CAR 細胞は多様な細胞から構成されることが明らかとなり、その中でも



この *Cxcl12*-*icreER* 陽性細胞は、脂肪細胞分化マーカーを高発現する CAR 細胞の亜集団すなわち Adipo-CAR 細胞を特異的に標識した (図 2)。骨の成長期および成長後の定常状態においては、この Adipo-CAR 細胞は予想に反して増殖も分化もせず骨髄にとどまることから、*Cxcl12*-*icreER* で標識されるこれらの細胞は幹細胞というよりはむしろ終末分化した細胞であることが示唆された。特にこれらの細胞は海綿骨には分化したものの皮質骨の骨芽細胞には全く分化しなかった (図 3)。

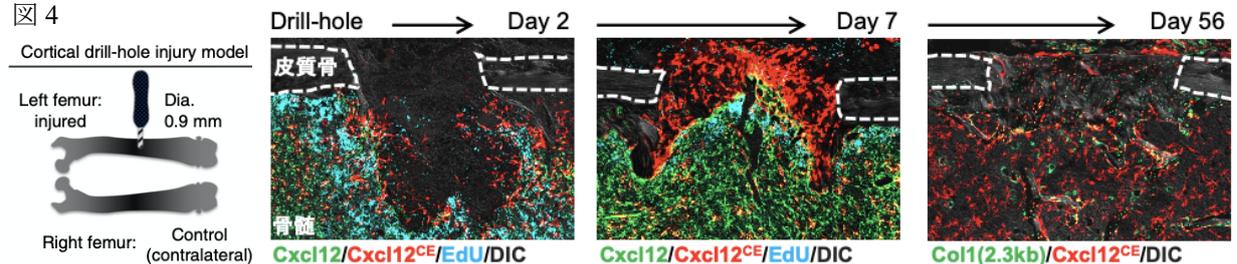
図 3



### Adipo-CAR 細胞の骨再生過程における骨芽細胞への貢献とそのメカニズム

一方、骨再生時にはこの Adipo-CAR 細胞は皮質骨を含む骨芽細胞へ分化し、強力に骨再生に貢献することが明らかとなった (図 4)。さらに骨再生過程における *Cxcl12*-*iCreER* 陽性細胞を

図 4



採取し、シングルセル RNA 解析を行ったところ、この Adipo-CAR 細胞は間葉系幹細胞様の特徴を持つ細胞に脱分化し、その上で骨芽細胞へと再分化する、細胞の可塑性による骨再生機構が存在することが示唆された (図 5)。同時に骨再生時にはこの CAR 細胞の亜集団だけでなく、骨芽細胞前駆細胞などの多様な細胞集団が併せて骨再生に参加し、骨芽細胞の形成に寄与することが明らかとなった。さらに Adipo-CAR 細胞による骨再生のメカニズムとして Wnt シグナルが強く関連していることがシーケンスデータから明らかになったため、Wnt 関連遺伝子である  $\beta$ -catenin を *Cxcl12*-*iCreER* 陽性細胞特異的に欠失する *Cxcl12*-*iCreER*; *Ctnnb*<sup>fl/fl</sup>; *R26R*-tdTomato マウスを作出し、骨再生過程を組織学的に解析したところ、コントロールマウスに比

β-catenin cKO マウスでは骨再生部位の骨量、骨密度は低下していた (図 6)。

図 5

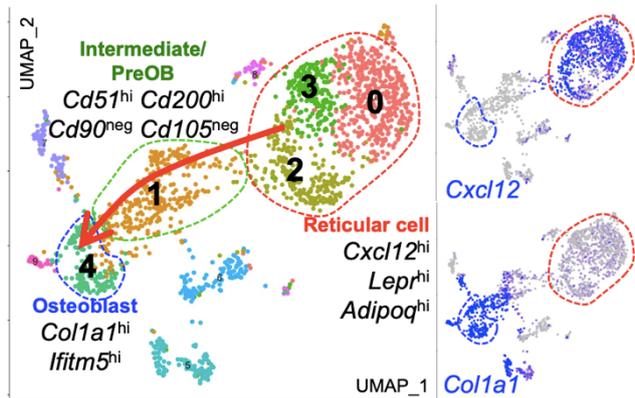
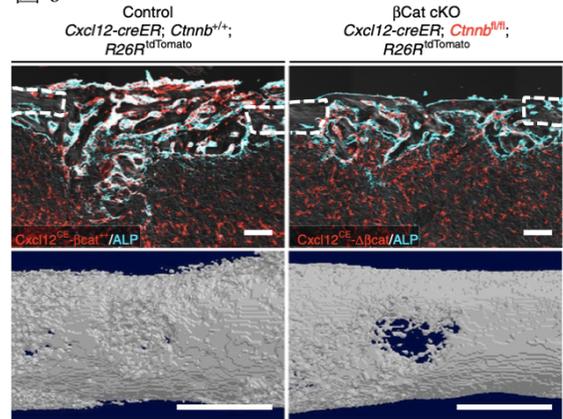


図 6



### まとめ

これまで骨折の治癒などの骨再生過程では、分化のヒエラルキーの頂点に位置する間葉系幹細胞が、全ての分化細胞を供給する源になることにより骨再生を司ると考えられていたが、本研究により CAR 細胞や骨芽細胞前駆細胞など様々な細胞が可塑性によって間葉系幹細胞様の性質を獲得し、さらに骨芽細胞へ分化することによって骨再生を引き起こすという新たなメカニズムが存在することが示唆された。