

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06002

研究課題名(和文)ビスフォスフォネート製剤の骨芽細胞・骨細胞への直接作用 - BRONJと糖尿病の関連

研究課題名(英文)Histochemical effects of bisphosphonate on osteocytic lacunar-canalicular system

研究代表者

坪井 香奈子 (Kanakano, Tsuboi)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：50754610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、BP製剤が骨細胞・骨芽細胞に与える組織的メカニズム、および、BP製剤の骨細胞・骨基質に与える影響を糖尿病が増悪させる可能性について糖尿病モデルラットであるSDT fatty ratを用いて組織化学的に解明することを目的とした。Stimulated emission depletion顕微鏡により、骨細管中のアクチン線維の走行、骨細胞・骨細管系の3次元ネットワークの観察に成功した。また、糖尿病ラットでは低石灰化を示すこと、骨細管においてDMP-1、OCNの強陽性を示すこと、骨髄内の血管増生が活発であることを確認した。以上より、糖尿病は骨細胞や血管系に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have examined if bisphosphonate would affect osteoblasts/osteocytes, and also if diabetes mellitus would worsen the histological features of osteocytes and bone matrix using SDT fatty rats mimicking diabetes mellitus. Stimulated emission depletion microscopy successfully visualized three dimensional structures of actin filaments within the cytoplasmic processes of osteocytes. SDT fatty rats revealed broad un-mineralized bone matrix including many irregularly-arranged DMP-1-/OCN-immunopositive osteocytes, as well as many -SMA-positive/CD31-reactive blood vessels in the diaphyseal bone marrow. Taken together, diabetes mellitus appears to influence the histological aspects of osteocytes and vascular endothelial cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：骨細胞 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

申請者は、今までビホスホネート製剤関連顎骨壊死(BRONJ)の病理組織的機序を解明するために、動物モデルに BP 製剤を連日投与し、骨吸収のリバウンドの有無、骨芽細胞・骨細胞系の活性状態、さらに、BRONJ の機序が、BP 製剤の破骨細胞の抑制だけに起因するのか、あるいは、破骨細胞を抑制することで、カップリングが遮断し骨芽細胞・骨細胞まで影響が及ぶのか、それとも BP 製剤が骨細胞・骨細管系に直接作用する可能性があるのかを検索してきた。これまでの研究として、BP 製剤であるアレンドロネートを連日投与し、その中止後には、骨量は維持されたままであるが、骨芽細胞は ALP 陽性反応の低下と細胞形態の扁平化を示すこと、また、骨細胞は萎縮し骨小腔との間隙が拡大することを観察している。さらに ALN を外頸静脈より1回投与すると、骨芽細胞が抑制されるより前に、骨細胞が萎縮することを確認している。

また、BRONJ の全身的リスクファクターの一つとして挙げられている糖尿病は、近年、骨質劣化や骨密度の低下を引き起こし、糖尿病に起因する骨粗鬆症が問題となるなど、骨へ大きな影響があることが明らかとなってきた。糖尿病は、コラーゲン線維の AGE 架橋構造の増加、基質石灰化、さらには、腎疾患による血中ミネラルバランスの異常などを引き起こすことが知られている。このような影響は、全身骨だけでなく、顎骨へも同様に及ぼすと考えられるため、糖尿病は、BP 製剤で誘導される副作用を増悪させる可能性がある。その機序として、糖尿病による血管障害や易感染性、および AGE 架橋形成の誘導があげられるが、申請者は、糖尿病の骨組織、特に、骨細胞・骨芽細胞そして骨基質への直接的な作用もあると推察した。したがって今回、BP 製剤の骨細胞への直接作用の可能性の検索、および糖尿病が、BP 製剤の骨芽細胞・骨細胞への影響を増悪化させるか否かについて解析を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、BP 製剤が骨細胞・骨芽細胞に与える細胞組織的メカニズム、および、BP 製剤の骨細胞・骨基質に与える影響を糖尿病が増悪させる可能性について組織化学的に解明することを目的とした。BP 製剤の作用として、破骨細胞が標的細胞と考えられているが、骨リモデリングにおいては、破骨細胞から骨芽細胞へのカップリングが作用することで骨芽細胞が活性を維持していることが知られており、また、骨芽細胞と骨細胞が相互に連結・連動し作用していることも考えなければいけない。さらには、BP 製剤が細胞内に取り込まれれば、破骨細胞以外の細胞、例えば、マクロファージや筋線維も同様に抑制されることが明らかにされているため、BP 製剤の影響は、長期間において破骨細胞以外の細胞にも影響を与えることを示唆する。したがって、BP 製剤が及ぼす影響について臨床的にも意義が大きいと考えられ本研究を開始した。

3. 研究の方法

(1)骨細胞・骨細管系の組織化学的解析

BP 製剤投与後における ALP、sclerostin、FGF23、E11、DMP1 など細胞マーカーを検索するだけでなく、骨細管中のアクチン線維の走行について Stimulated emission depletion (STED) 顕微鏡を用いてさらに詳細に解析する一方、BP 製剤が骨細胞ネットワークの gap junction に影響を及ぼす可能性を in vivo で解明した。

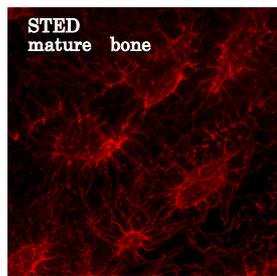
(2)高血糖状態が骨へ及ぼす影響についての組織化学的解析

糖尿病モデルラットである SDT (Spontaneously Diabetic Torii) fatty rat の顎骨および脛骨を用いて骨細胞・骨芽細胞やその周囲の基質変化について μ CT 撮影、組織化学、免疫組織化学染色 (DMP-1、chondroitin-4-sulfate、OC、AGE) 等を行い、糖尿病が骨に与える影響について検索した。

4. 研究成果

(1) Stimulated emission depletion (STED) 顕微鏡

による骨細管中のアクチン線維の走行の観察。通常の骨細胞は多数の細胞突起を伸ばし、骨細胞同士、さらに骨表面に存在する骨芽細胞と連結し、骨細胞・骨細管系と呼ばれる複雑なネットワークを形成していることがわかった。



(2) SDT fatty ラットの脛骨を用いた組織化学的解析結果

①H-E 染色および μ CT 観察

HE 染色では、脛骨では、SDT fatty ラット群とコントロール群に明らかな組織的相違を認めなかったが、 μ CTを用いて観察を行うとSDT fatty ラットの脛骨では、骨幹端骨梁の数や幅が著明に低下していることが分かった。

②骨芽細胞及び骨細胞に対する影響の検索

骨芽細胞の局在を観察するために、ALP 染色を行ったところALP 陽性反応は、両群ともに明らかな違いは認められなかった。また、DMP-1、chondroitin-4-sulfate、OCN の免疫染色を行ったところ、いずれもDMP-1およびOCN は、SDT fatty ラット群の骨幹端の骨細胞の骨小腔でいずれも強陽性を示す一方、骨細管における陽性反応は減弱傾向を示した。

③基質石灰化に関する検索

von Kossa 染色を行い骨基質の石灰化を検索したところ、コントロール群では、生後 42 週齢と高齢であっても、厚い類骨を示していたが、SDT fatty ラットでは、骨基質面上に細胞体の豊かな活性型骨芽細胞が存在するだけでなく、その直下に、広範囲に未石灰化領域が形成されており、低石灰化を示すことが示唆された。

④コラーゲン架橋および微小血管への影響について

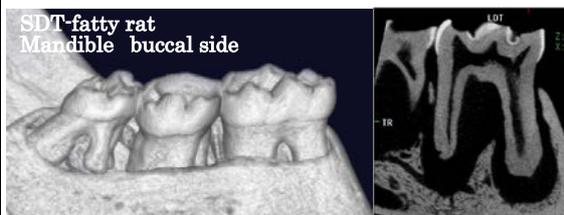
AGE の免疫染色を行ったところ、SDT fatty ラット群の外骨膜および骨髄内の細胞間隙の線維状構造物において、AGE の陽性反応が増加することが分かった。骨髄内でAGE 陽性細胞が増加

していると骨組織の微小血管にも何等かの影響を及ぼしている可能性を考えた。また、糖尿病ラット群の遠位骨幹端部において多数の α -SMA 陽性細胞、および、CD31 陽性血管内皮細胞が存在することを確認し、糖尿病により骨髄内の血管増生が活発に行われていることが分かった。



(3) SDT fatty ラットの顎骨を用いた組織化学的解析結果

SDT fatty ラット下顎骨のHE 染色および μ CT 観察で、歯槽骨、特に根間中隔は、その高さが著しく低下していた。



TRAP 染色にて破骨細胞を検索すると、骨吸収を受けたと思われる鋸歯状の歯槽骨表面に、多数のTRAP 陽性破骨細胞を認めたが、一方で、多数のALP 陽性骨芽細胞が観察された。よって、SDT fatty ラットの歯槽骨は著しい骨吸収を受けたが、骨芽細胞の活性は維持されていると推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

①Liu Z, Yamamoto T, Hasegawa T, Hongo H, Tsuboi K (13人中5人目): Immunolocalization of osteocyte-derived molecules during bone fracture healing of mouse ribs. **Biomed Res.** 37(2): 141-151, 2016. 査読有

②Tanaka Y, Hasegawa T, Yamada T, Yamamoto T, Sasaki M, Hongo H, Tsuboi K (14人中7人目): Histological assessment for femora of

ovariectomized obesity (db/db) mice carrying mutated leptin receptor. *Histol Histopathol.* 1315-26,2016. 査読有

③ Hongo H, Sasaki M, Kobayashi S, Hasegawa T, Yamamoto T, Tsuboi K(16人中6人目): Localization of Minodronate in Mouse Femora Through Isotope Microscopy. *J Histochem Cytochem.*64(10):601-22,2016. 査読有

④ Tsuboi K, Hasegawa T(13人中1人目): Effects of drug discontinuation after short-term daily alendronate administration on osteoblasts and osteocytes in mice. *Histochem Cell Biol.* 146(3):337-50,2016. 査読有

⑤ Yamamoto T, Hasegawa T, Sasaki M, Hongo H, Tsuboi K(15人中5人目): Frequency of Teriparatide Administration Affects the Histological Pattern of Bone Formation in Young Adult Male Mice. *Endocrinology.* 157(7):2604-20,2016. 査読有

⑥ Ohga N, Yamazaki Y, Tsuboi K, Kitagawa Y: Healing of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after discontinuation of denosumab in a patient with bone metastases of colorectal cancer: a case report and hypothesis. *Quintessence Int.* 46(7):621-6, 2015. 査読有

[学会発表](計 8 件)

① 吉田泰士、本郷裕美、坪井香奈子、長谷川智香、網塚憲生: II 型糖尿病モデル SDT fatty ラットにおける下顎骨歯周組織の組織化学的検索. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2016 年 8 月 24-26 日 プログラム・抄録集:418, 2016.

② 坪井香奈子: 新規肥満 2 型糖尿病モデル SDT fatty ラットの骨組織の組織化学的变化について. 第 34 回日本骨代謝学会学術大会 大阪国際会議場 (大阪府大阪市) 2016 年 7 月 20-23 日 プログラム・抄録集:218, 2016.

③ 坪井香奈子: 肥満 2 型糖尿病モデル SDT fatty ラットにおける骨の微細構造学的解析.

第 2 回日本骨免疫学会 ホテルモントレ 沖縄スパ&リゾート (沖縄県恩納村) 2016 年 7 月 6-8 日 プログラム・抄録集:107, 2016.

④ Tsuboi K: Histochemical examination on the biological effects of alendronate on osteocytic lacunar-canalicular system. The American Academy of Oral Medicine 2016, Atlanta, Georgia, USA, 2016.4.4-9.

⑤ Tsuboi K: Histochemical assessment on bone tissues in type II diabetic SDT fatty rats. Australian and New Zealand bone and mineral society (ANZBMS) 2015 Joint ANZBMS, MEPSA and MBSANZ, Annual scientific meeting, 2015.11.1-4, Hobart, Tasmania, Australia, Program & Abstracts: 70, 2015.

⑥ 坪井香奈子: 骨芽細胞・骨細胞に対するビスフォスフォネート製剤の影響. 第 60 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 2015 年 10 月 16-18 日 日本口腔外科学会雑誌 61(supplement):152, 2015.

⑦ 長谷川智香、坪井香奈子、本郷裕美、山本知真也、網塚憲生: SIM・FIB-SEM・原子間力顕微鏡・同位体顕微鏡を用いた骨組織解析への応用. サテライトシンポジウム 6 「骨の細胞イメージング - a new horizon - 骨のメカニズムをどこまで観ることができるか」 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市) 2015 年 9 月 11-13 日 プログラム・抄録集:99, 2015.

⑧ 坪井香奈子: 糖尿病が骨細胞に与える組織化学的影響について -SDT fatty ラットを用いた解析-. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市) 2015 年 9 月 11-13 日 プログラム・抄録集:31, 173, 2015.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

坪井 香奈子(TSUBOI KANAKO)

北海道大学・北海道大学病院・医員

研究者番号:50754610

(2)研究分担者

なし