

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11059

研究課題名（和文）骨細胞への最終分化を方向付ける決定因子の探索

研究課題名（英文）Investigation of factors determining terminal differentiation into osteocytes

研究代表者

山下 照仁（YAMASHITA, Teruhito）

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授

研究者番号：90302893

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：骨細胞株や骨芽細胞をコラーゲンゲルに埋伏し、ゲル表面で頭蓋冠由来骨芽前駆細胞を共培養し骨細胞への分化誘導能を検討した。石灰化誘導3週間後、骨細胞株を埋伏したゲルは石灰化が促進していたが、上層した骨芽細胞は石灰化していなかった。骨芽細胞を包埋した共培養は、骨細胞株を包埋した培養よりもALPの発現が弱く脂肪滴を持った細胞が多く見られた。

骨細胞マーカーSostの発現をモニターするためのSostレポーターマウスを作成した。Sost遺伝子プロモータ下流にGFPを挿入したESクローンを樹立し、キメラマウスの作出を行なった。その結果、Sostレポーターマウスの作出に成功した。

研究成果の概要（英文）：To examine the mechanism of osteocytic differentiation on the bone surface, osteocytic cells or osteoblasts were embedded in collagen gels, and osteoblast precursor cells were co-cultured on the gel surface to induce differentiation. Calcification and fat differentiation were quantified 3 weeks after induction of calcification. While osteocytic cells embedded in gels were stained by von Kossa method, the overlying osteoblasts were not. Osteoblasts co-culturing on the osteoblast-embedded gels showed less ALP expression than cells on the osteocyte-embedded, and lipid droplets were frequently stained with Sudan III.

To monitor the expression of Sost, a mature osteocytic marker, we generated Sost reporter animals. ES clones in which GFP gene was inserted downstream of the Sost gene promoter were constructed, and then we have succeeded in creating Sost reporter mice.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨細胞 骨吸収 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

骨形成を促進するための創薬の戦略としては、骨芽細胞前駆細胞に働きかけて骨芽細胞の分化を促進させる方法、骨芽細胞の骨形成機能を活性化させる方法、骨芽細胞の生存を維持させる方法などが考えられる。BMP、FGF および Wnt は骨芽細胞系譜の細胞に直接作用して骨形成を促進するが、PTH は骨に埋伏している骨細胞を介して間接的に骨芽細胞を活性化することが示されている (PLoS One 3:e2942, 2008)。骨細胞はメカノセンサーとして、骨格にかかる重力や運動による負荷を感知している (J Biomech 36:1453, 2003)。この負荷量は何らかのシグナルを介して骨形成や骨吸収を制御し、負荷に応じた骨格の改変を行なっている。

骨細胞は骨基質の中に埋伏している細胞で、増殖をせずほとんど細胞外マトリックスの分泌も行っていない。骨細胞同士は骨細管を通じてお互いがネットワークを形成して、情報をやり取りしている (Acta Anat 137:350, 1990)。骨細胞はまた、骨表面に存在する骨芽細胞や破骨細胞とも相互作用している。骨芽細胞に対しては Sost の分泌を介して Wnt シグナルを抑制し、骨形成を負に制御している。破骨細胞に対しては RANKL の発現を介して RANK シグナルを活性化し、骨吸収を正に制御している (JBMR 23:860, 2008; Nat Med 17:1231, 2011)。

我々は、高回転型の骨粗鬆症を示す OPG 遺伝子変異マウスの解析過程において、Sost の遺伝子発現が骨において有意に抑制されていることを見出した (JBMR 32:2074, 2017:発表論文)。OPG 遺伝子変異マウスは、骨形成の指標である ALP やオステオカルシンの血清レベルが高いことから骨形成が亢進していることが示されている。それにもかかわらず長管骨の骨形態計測の結果から骨梁骨量のみならず皮質骨量も顕著に減少している。その結果、骨細胞数が減少するため骨抑制因子 Sost のレベルが低下していると考えられる。一方、骨芽細胞が活性化していれば骨が盛んに作られ埋伏する骨細胞は増えるはずである。このように、OPG 欠損マウスでは骨細胞数の増減に大きな矛盾が見られる。

骨細胞は骨形成・骨吸収を制御するが、骨芽細胞から骨細胞と分化して骨に埋伏される過程は明らかではない。我々は、既に骨に埋伏している骨細胞が、次に埋伏される骨細胞候補を規定しているという仮説に基づき、本研究を計画した。特に、骨形成に関わっていた大多数の骨芽細胞は骨細胞に分化せず、わずかな細胞が選択され骨細胞として埋伏される機構は未解明である。

2. 研究の目的

(1) マトリックスに埋伏した骨細胞は骨芽細胞に対して選択分化誘導をするのかを解析する。骨細胞株 ML0-Y4 をコラーゲンゲルに埋伏し、ゲル表面に骨芽細胞株 MC3T3-E1

および頭蓋冠由来骨芽前駆細胞 POB を播種し、組織免疫学的染色手法で選択分化してくる骨細胞の性質を明らかにする。また、骨誘導因子を外から加えることで、骨細胞の選択に関わるシグナルが予想できる。トリプシン処理で表面の骨芽細胞を、コラゲナーゼ処理でゲル中の骨細胞をそれぞれ取除くことにより、新生骨中に埋伏された骨細胞を単離する。細胞増殖の割合や骨形成誘導された細胞との差異を組織学的に明らかにするために、頭蓋骨を用いた組織培養に骨芽細胞を共培養する器官培養系を作成する。

(2) 骨細胞への選択分化は Sost の影響を受けるのか否かを調べるため、Sost 遺伝子レポーターマウスの作製をする。骨組織内に埋伏している骨細胞は、力学的負荷や骨吸収など周囲の環境の影響を受けて、個々の細胞が様々な Sost 発現強度で分布することが予想される。緑色蛍光タンパク GFP 遺伝子を Sost 遺伝子プロモーター下流に挿入した Sost-Green ノックインマウスを作製することにより、Sost の発現強度の違いが骨細胞への選択分化に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) コラーゲンゲル共存培養系と頭蓋冠器官培養系を用いて骨細胞の選択分化誘導の培養システムを確立する。この培養において、選択分化誘導を受けた骨細胞の免疫組織学的解析を行う。

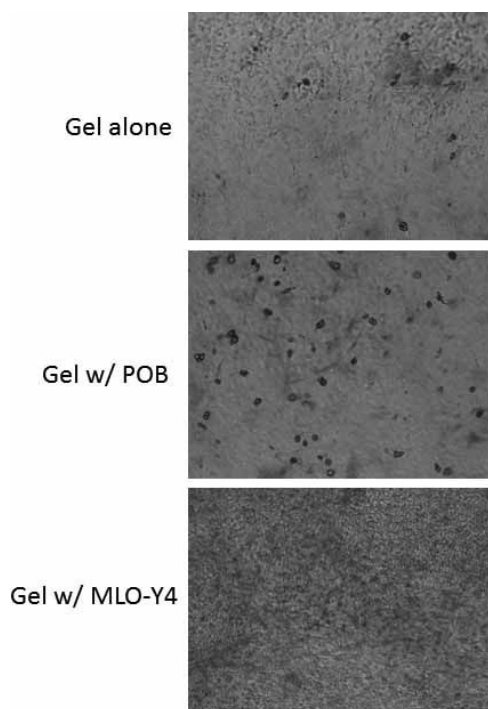
コラーゲンゲル共培養系を用いた骨細胞の選択分化誘導：骨細胞株 ML0-Y4 をコラーゲンゲルに埋伏し、ゲル表面に骨芽細胞株 MC3T3-E1 もしくは頭蓋冠由来骨芽前駆細胞 POB を播種後、グリセロホスフェートとアスコルビン酸を添加し共培養を行なう。培養期間中、骨形成を促すために、BMP2、FGF2、Wnt4、PTH をそれぞれ添加する。3週間後に ALP 染色を行ない、共焦点顕微鏡を用いて3次元的に新生骨領域の観察定量化を行なう。細胞から RNA を精製し、骨形成関連因子であるオステオカルシン (Ocn)、I 型コラーゲン、オステオポンチン、スクレロステチン、DMP1 の定量的 PCR を行ない、選択分化している骨細胞の性質を解析する。

頭蓋冠器官培養系を用いた骨細胞の選択分化誘導：コラーゲンゲル共培養系では十分な新生骨誘導が見られない可能性もあるので頭蓋冠を用いた組織培養に骨芽細胞を共培養する器官系も用いる。新生児マウスの頭蓋冠を摘出し無菌的に骨膜を除いた骨片を培養する。この際、縫合部位周辺の骨髓ストローマ細胞や血球系細胞を出来る限り取除いた培養と、すべてを含んだ状態での培養それぞれを行なう。BMP2、FGF2、Wnt4、PTH を骨誘導因子として添加する。2週間培養後の ALP 染色によって細胞増殖の割合や骨形成誘導された細胞との差異を解析する。

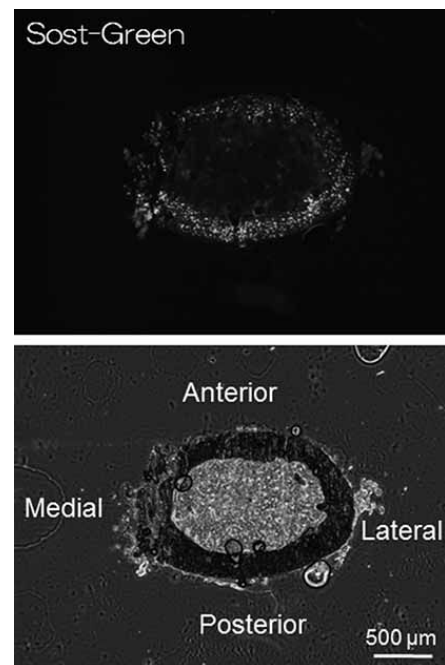
(2) Sost 遺伝子レポーターマウスの作製を行ない、Sost 遺伝子の発現強度と新規埋伏骨細胞との形態学的解析を行なう。Sost の発現強度が骨細胞選択分化に与える影響を明らかにするため、緑色蛍光タンパク GFP 遺伝子を Sost 遺伝子プロモータ下流に挿入した Sost-Green ノックインマウスを作製する。具体的には Sost 遺伝子の翻訳開始点直後に GFP 遺伝子を挿入し、エキソン 1 を欠いた (Sost 遺伝子領域は正常に転写されるが、Sost のタンパク質は欠損する) 遺伝子構造のノックインベクターを作製し、ES 細胞に導入、遺伝子組換えによりクローンを得る。これを仮腹マウスに移植して Sost-Green ノックインマウスを得る。

4. 研究成果

(1) コラーゲンゲル共存培養系を用いて骨細胞の分化誘導の培養システムを作製した。骨細胞株 MLO-Y4 もしくは初代培養骨芽細胞をコラーゲンゲルに埋伏し、ゲル表面で頭蓋冠由来骨芽前駆細胞を共培養した。骨形成を促すために、グリセロホスフェートとアスコルビン酸を添加した。3 週間後に ALP 染色およびフォンコッサ染色を行ない、定量化をした。その結果、MLO-Y4 が埋伏したゲル内の細胞は、骨芽細胞を埋伏したゲル内の細胞よりもフォンコッサ染色が促進していた。一方、ALP 染色は MLO-Y4 側で亢進していた。上層した骨芽細胞はまだ、石灰化しているようには観察されなかった。一方、ズダン III 染色を行うと、骨芽細胞を包埋した骨芽細胞共培養は、MLO-Y4 を包埋した骨芽細胞共培養よりも ALP の発現が弱く脂肪滴を持った細胞が見られた (下図参照)。



(2) 成熟した骨細胞のマーカーである Sost の発現を in vivo および ex vivo でモニターするための Sost 遺伝子レポーターマウスの作成に成功した。Sost 遺伝子プロモータの下流に GFP を挿入したターゲットベクター-DNA 断片を ES 細胞にエレクトロポレーション法で導入し、遺伝子組換え体をスクリーニングした。組換え ES クローンを 6 ライン樹立して、胚盤胞に ES クローンをインジェクションしてキメラマウスの作出を行なった。その結果、生殖細胞に載った Sost 遺伝子レポーターマウスの作出を行い、ライン化することに成功した。4 週齢における大腿骨骨幹部の蛍光および明視野下の観察より、皮質骨に強い陽性シグナルが認められた (下図参照)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, Ozaki Y, Iimura T, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N: Bone formation is coupled to resorption via suppression of sclerostin expression by osteoclasts. (2017) J Bone Miner Res 32(10):2074-2086. doi: 10.1002/jbmr.3175 (査読有)

Uehara S, Udagawa N, Mukai H, Ishihara A, Maeda K, Yamashita T, Murakami K, Nishita M, Nakamura T, Kato S, Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y: Protein kinase N3 promotes bone resorption by osteoclasts in response to Wnt5a-Ror2 signaling. (2017) Sci Signal 10(494):eaan0023. doi: 10.1126/scisignal.aan0023 (査読有)

Yamashita T, Udagawa N, Thirukonda GJ, Uehara S, Yamauchi H, Suzuki N, Li F, Kobayashi Y, Takahashi N: Platypus and opossum calcitonins exhibit strong activities, even though they belong to mammals. (2017) Gen Comp Endocrinol 246:270-278. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.01.001 (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔その他〕

松本歯科大学歯科医学研究所活動紹介

<http://www.mdu.ac.jp/laboratory/5750/006092.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山下 照仁 (YAMASHITA, Teruhito)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・
准教授
研究者番号：90302893

(2)研究分担者

二宮 禎 (NINOMIYA, Tadashi)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：00360222

高橋 直之 (TAKAHASHI, Naoyuki)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・
特任教授
研究者番号：90119222