

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20356

研究課題名(和文)骨基質石灰化における骨芽細胞・骨細胞のリン酸イオン供給システムの解明

研究課題名(英文) Analysis on the supply system of phosphate ions by osteoblasts/osteocytes during bone mineralization

研究代表者

長谷川 智香 (HASEGAWA, Tomoka)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50739349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨基質石灰化における軟骨細胞・骨芽細胞系細胞(前骨芽細胞・骨芽細胞・骨細胞)によるモノリン酸イオン供給の機序を明らかにする目的で、石灰化開始点となる基質小胞(matrix vesicle)を産生する細胞(軟骨細胞・骨芽細胞)に、モノリン酸イオン合成酵素である組織非特異型アルカリフォスファターゼ(TNALP)を過剰発現させたマウスを作成し、骨基質石灰化とリン酸イオン供給に関する酵素・膜輸送体の発現・活性を微細構造学的に解析した。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the regulation of phosphate ion generation by chondrocyte and osteoblastic cells (preosteoblast, osteoblast and osteocyte) during the process of bone mineralization, we generated transgenic mice over-expressing tissue non-specific alkaline phosphatase (TNALP) driven by type I collagen promoter specific to preosteoblast/osteoblast, or type II collagen promoter specific to chondrocyte. We have examined the localization of several enzymes and membrane transporters involved in phosphate ion generation and mineralization in bone.

研究分野：組織学

キーワード：骨基質石灰化 骨芽細胞 TNALP

### 1. 研究開始当初の背景

骨基質石灰化におけるリン酸カルシウム結晶化は、肥大化軟骨細胞および骨芽細胞によって産生される基質小胞(matrix vesicle)の内部環境で開始されるが、そのためには、リン酸イオンとカルシウムイオンの供給が必要である。生体内において、カルシウム濃度はほぼ一定に維持されているのに対して、リン濃度は日内変動が大きいことから、石灰化の場ではモノリン酸イオン濃度を局所的にコントロールする必要がある。これらの調節は、基質小胞や骨芽細胞の単位膜における、リン酸イオン合成酵素 TNALP、ピロリン酸合成酵素 ENPP1、リン酸イオン膜輸送体 Na/Pi co-transporter III (Pit1), ankylosis (ANK), plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase や  $Mg^{2+}$ -ATPase など各種酵素と膜輸送体の発現・活性により行われるが、その詳細なメカニズムは未だに明らかではないのが現状である。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、骨基質石灰化の場では、骨芽細胞のみならず、その骨髄側に存在する前骨芽細胞にも組織非特異型アルカリフォスファターゼ (TNALP)が局在しリン酸イオンの供給を、さらに、骨芽細胞だけでなく骨細胞にも ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1)が発現し、過剰な石灰化の抑制を行う可能性を見出してきた。これらを踏まえて、軟骨細胞や骨芽細胞系細胞(前骨芽細胞・骨芽細胞・骨細胞)が、協調して TNALP と ENPP1 を介したリン酸産生・輸送をダイナミックに供与・調節する機構を明らかにする目的で、in vivo を中心とした微細構造学解析を行った。

### 3. 研究の方法

(1)軟骨細胞特異的 TNALP 過剰発現マウスの微細構造解析

type II collagen promoter に TNALP cDNA を組み込んだベクターを作製し microinjection にて Tg マウスを作製した。静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞に TNALP が過剰発現していることを確認し、各種組織化学 (TNALP, ENPP1, Pit-1, Ank, PHOSPHO1 免疫組織化学、酵素組織化学)および透過型電子顕微鏡による微細構造解析を行う。

(2)骨芽細胞特異的 TNALP 過剰発現マウスの微細構造解析

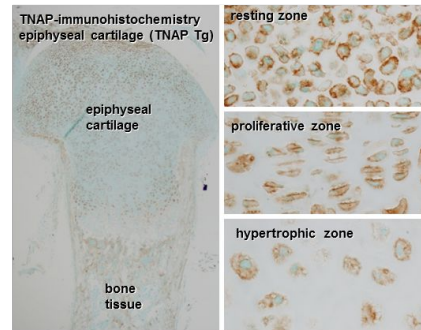
type I collagen  $\alpha$ 1 promoter に TNALP cDNA を組み込んだベクターを作製し microinjection にて Tg マウスを作製し、軟骨細胞特異的 TNALP 過剰発現マウスと同様に、各種組織化学および透過型電子顕微鏡による微細構造解析を行う。

### 4. 研究成果

(1)軟骨細胞特異的 TNALP 過剰発現マウスの微細構造解析について

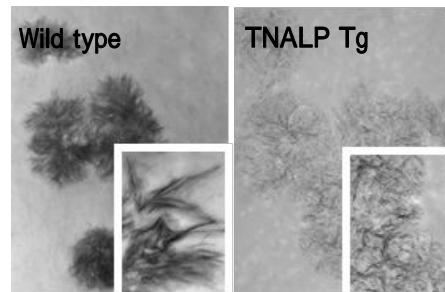
軟骨細胞に TNALP を過剰発現させた Tg マウスでは、骨端軟骨の静止・増殖軟骨細胞に TNALP の過剰発現が誘導されていた(右上図)。

#### 軟骨細胞特異的 TNALP Tg マウスにおける TNALP 免疫組織化学



しかし、軟骨基質の石灰化は認められず、むしろ、ENPP1 の過剰発現が誘導されたため骨組織における石灰化が抑制されていた。また、軟骨細胞特異的 TNALP Tg マウスでは、石灰化結晶塊の形成が悪く、全体として石灰化度の低い骨基質が形成されていた(下図)。

#### 軟骨細胞特異的 TNALP Tg マウスにおける石灰化球の透過型電子顕微鏡像



このことから、過剰発現した TNALP はリン酸モノマーを形成するだけでなく、同時に、ENPP1 や NaPi co-transporter III (Pit1)などの基質小胞に付随した酵素や膜輸送体の発現・活性に影響を与えて、石灰化の促進・抑制をコントロールする可能性が高いと推測された。

(2)骨芽細胞特異的 TNALP 過剰発現マウスの微細構造解析について

type I collagen  $\alpha$ 1 promoter に TNALP cDNA を組み込んだベクターを作製し microinjection にて Tg マウスを作製した。現在、軟骨細胞特異的 TNALP 過剰発現マウスと同様に、各種組織化学および透過型電子顕微鏡による微細構造解析を進めている。

### 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 3 件)

長谷川智香, 網塚憲生: 骨の組織・微細構造 - 顕微解剖学的知見 - . PAIN RESEARCH 31(4):210-219, 2016. (査読無)  
Hasegawa T., Endo T., Tsuchiya E., Kudo A., Zhao S., Moritani Y., Abe M., Yamamoto T., Hongo H., Tsuboi K., Yoshida T., Nagai T., Khadiza N., Yokoyama A., Freitas de PHL., Li M., Amizuka N.: Biological application of

focus ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM) to the imaging of cartilaginous fibrils and osteoblastic cytoplasmic processes. J Oral Biosci. 59:55-62, 2017. (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.job.2016.11.004>

Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuchiya E., Hongo H., Tsuboi K., Kudo A., Abe M., Yoshida T., Nagai T., Khadiza N., Yokoyama A., Oda K., Ozawa H., Freitas de PHL., Li M., Amizuka N.: Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. Japanese Dental Science Review. 53(2):34-45, 2017. (査読有)

<https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.09.002>

〔学会発表〕(計 8 件)

長谷川智香: FIB-SEM および同位体顕微鏡による骨イメージング. 第 35 回日本骨形態計測学会 倉敷芸文館(岡山県・倉敷市) 2015 年 6 月 4-6 日

長谷川智香、山本知真也、本郷裕美、坪井香奈子、山本恒之、網塚憲生: 各種電子顕微鏡を用いた骨細胞間ネットワークの微細構造解析. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 京王プラザホテル(東京都・新宿区) 2015 年 7 月 23-25 日

長谷川智香: 骨細胞ネットワーク: □FIB-SEMを含めた顕微観察器機による微細構造解析 - . 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市) 2015 年 9 月 11-13 日

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. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市) 2015 年 9 月 11-13 日

網塚憲生、長谷川智香、本郷裕美: 骨基質石灰化における微細構造学. シンポジウム:S6 第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会 パレット福島(福島県・郡山市) 2016 年 3 月 28-30 日

長谷川智香、網塚憲生: 骨の組織・微細構造 - 顕微解剖学的知見 - . シンポジウム 第 38 回日本疼痛学会 かでる 2.7(北海道・札幌市) 2016 年 6 月 24-25 日

網塚憲生、長谷川智香: 骨の細胞における微細構造・組織化学的知見. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 福岡国際会議場(福岡県・福岡市) 2016 年 10 月

13-14 日

長谷川智香、網塚憲生: 超解像共焦点レーザー顕微鏡と FIB-SEM でみる骨の世界. シンポジウム 第 122 回日本解剖学会 長崎大学坂本キャンパス(長崎県・長崎市) 2017 年 3 月 28-30 日

〔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  
とくになし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 智香 (HASEGAWA, Tomoka)  
北海道大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号: 50739349

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

小守 壽文 (KOMORI, Toshihumi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授  
研究者番号: 00252677

織田 公光 (ODA, Kimimitsu)  
新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 10122681