

平成 30 年 5 月 11 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：2016～2017

課題番号：16H06602

研究課題名(和文) 骨細胞による周囲骨基質の溶解および石灰化沈着における微細構造学的検索

研究課題名(英文) Ultrastructural examination on osteolysis and calcification induced by osteocyte

研究代表者

本郷 裕美 (Hongo, Hiromi)

北海道大学・歯学研究院・学術研究員

研究者番号：00778970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨細胞性骨溶解の可能性を確実にするため、破骨細胞が存在しない RANKL-/-マウスおよび血中Ca濃度が低下している授乳期マウスを用いて実験を行った。原子間力顕微鏡(AFM)により骨細胞周囲の骨基質の弾性率は低下し、透過型電子顕微鏡(TEM)観察するとやや拡大した骨小腔は粗造な壁面を示し、骨小腔内部にはコラーゲン線維が分解されたと思われる不定形構造物を認めた。また骨小腔周囲には一層の骨基質が観察され、<sup>42</sup>Ca安定同位体を用いて同位体顕微鏡にて観察すると骨小腔周囲に一致して<sup>42</sup>Ca安定同位体の沈着が認められた。以上より、骨細胞は周囲骨基質を溶解し、その後石灰化沈着する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have attempted to histologically verify “osteocytic osteolysis”, using two mice models - RANKL-/- mice lacking osteoclasts and lactating mice fed with calcium (Ca) insufficient diet, which decreased the serum concentration of Ca. Nanoindentation of AFM revealed decreased modulus of elasticity surrounding bone matrix of osteocytes in these model mice. Under TEM observation, there are some fragmented collagen fibrils and pieces of mineralized matrices in the enlarged osteocytic lacunae which showed irregularly-shaped walls. Furthermore, we observed a layer of bone matrix parallel to the configuration of enlarged osteocytic lacunae. Under isotope microscopy using <sup>42</sup>Ca stable isotope, the deposition of <sup>42</sup>Ca isotope could be observed surrounding the osteocytic lacunae. It seems likely, therefore, that osteocytes enable to erode the surrounding bone matrix and deposit minerals on their lacunae.

研究分野：組織化学

キーワード：骨細胞性骨溶解 骨細胞 石灰化沈着

### 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに骨細胞に着目して研究を行ってきた。骨細胞は骨芽細胞が自ら産生した骨基質中に埋め込まれた細胞のことで、骨小腔という空間に存在する。そして細胞突起を伸ばし、骨基質表面に存在する骨芽細胞や隣り合う骨細胞同士とギャップ結合を介して連絡することで、骨基質中に無数に張り巡らされた機能的細胞ネットワーク（骨細胞・骨細管系）を形成している。骨幹端骨梁の骨細胞は形が丸く、配列も不規則であるのに対し、皮質骨の骨細胞は扁平な紡錘形を呈し、骨表面に対して平行に配列しており、骨細胞・骨細管系は幼弱な骨幹端骨梁よりも、成熟骨である皮質骨において規則的な配列を示していることがわかっている。

近年、骨細胞はメカニカルストレスを感知するメカニカルセンサーとして働くことが示唆されており、メカニカルストレスに応じた骨改造を可能にするには骨表面に局在する骨芽細胞だけでは不十分であり、骨基質内部の規則的に配列した骨細胞・骨細管系が必要であることが明らかとなっている。さらに骨細胞は血中リン濃度を低下させる FGF23 産生や sclerostin、また、Rankl を発現することで骨代謝調整を行うことが明らかとなっており、現在、注目を集めている。

特に骨基質ミネラルの維持あるいは輸送を行うことの一つの傍証として、骨細胞特異的にジフテリア毒受容体を発現させたマウスにジフテリア毒を投与し観察すると、骨細胞は死ぬ前に骨細胞周の基質ミネラルを溶解し、骨小腔を拡大することが確認されている。骨細胞はメカニカルセンサーであるだけでなく、局所的なミネラルの維持にも関与していることが考えられている。

1960年代に Bélanger によって提唱された骨細胞性骨溶解 (osteocytic osteolysis) は副甲状腺ホルモン (PTH) の投与あるいは低 Ca 食給餌によって引き起こされる骨小腔が拡大する現象だが、その詳しい機序は未だ解明されていない。

そこで申請者は骨細胞・骨細管系が骨基質ミネラル維持・調整の一環として、骨細胞性骨溶解を誘導するか検索を行ってきた。これまでの実験として、ICR マウスに外頸静脈から hPTH(1-34; 80µg/kg) を投与し、皮質骨の骨細胞を観察すると、経時的に骨小腔は拡大し、その外形は凹凸を示し、骨小腔内部には断片的な石灰化物や分解されたコラーゲン線維と思われる不定形構造物が認められることを明らかにしてきた。さらに骨小腔周囲の骨基質に形状変化が認められなくとも、原子間力顕微鏡 (AFM) によるナノインデンテーションにより骨基質の物性を計測すると、PTH 投与で骨小腔周囲の弾性率が低下し、物理的に脆弱化していることを確認している。したがって、申請者は、骨細胞・骨細管系は骨基質溶解能を有し、骨ミネラルの維持・調整を行う可能性があるかと推察している。

### 2. 研究の目的

申請者は、上記背景をふまえ、骨細胞性骨溶解をより確実なものとするため①破骨細胞が分泌する酵素・酸が関与する可能性を排除すること、②PTH だけでなく血中 Ca 濃度が低下した環境で同様のことが起こるか、③骨細胞は骨基質溶解だけでなく、溶解後に骨基質の添加を行うか、について明らかにする必要があったと考えた。そこで、破骨細胞が存在しない *Rankl*<sup>-/-</sup> マウスでも同様の現象が確認されるか、授乳期では乳汁を介して Ca の排出が多くなるため時として低 Ca 血症に陥ることが知られているため、この実験系を用いて同様の解析をすすめる。さらに PTH 投与後の骨小腔周囲に一層の骨基質を認めるか否かについて、カルセイン標識および <sup>42</sup>Ca 安定同位元素を用いた同位体顕微鏡にて検索する。これにより骨細胞・骨細管系の骨基質溶解および骨基質添加を行う能力があるか解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

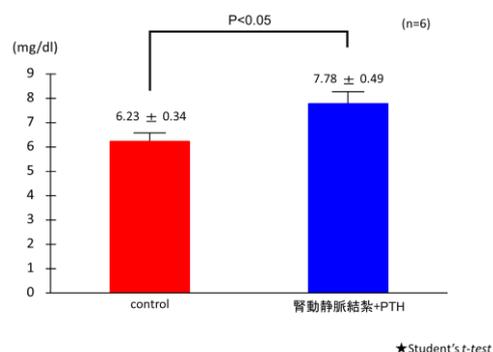
(1) 破骨細胞の影響を除外するために、破骨細胞が存在しない *Rankl*<sup>-/-</sup> マウスの腎動静脈を結紮し、hPTH(1-34; 2mg/kg) を外頸静脈から投与し、数時間後における血中 Ca 濃度測定、骨細胞・骨小腔を von Kossa 染色、カルセイン標識による蛍光顕微鏡観察、透過型電子顕微鏡にて観察した。

(2) 生後 12 週齢の妊娠マウスを、固定まで普通食を給餌した群、alendronate (ALN) 投与群 (1mg/kg, 10 日間) と非投与群に分け、出産直後から Ca 欠乏食 (Ca: 0.018%) を給餌した。血中 Ca 濃度測定、TRAP 染色、トルイジンブルー染色、von Kossa 染色、原子間力顕微鏡 (AFM) によるナノインデンテーション、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察、共焦点レーザー顕微鏡観察、<sup>42</sup>Ca 安定同位体投与による同位体顕微鏡観察を行った。

### 4. 研究成果

(1) *Rankl*<sup>-/-</sup> マウスを用いた組織化学的解析結果

① PTH 投与 1 時間後の *Rankl*<sup>-/-</sup> マウスの血中 Ca 濃度測定



腎臓での Ca 再吸収による影響を排除するために腎動静脈を結紮し、PTH を投与した群と

コントロール群に有意差が認められることから、腎臓での再吸収および破骨細胞による骨吸収の影響を受けずに血中 Ca 濃度が上昇した。

②准超薄切片による von Kossa 染色観察  
エポキシ樹脂に包埋した未脱灰切片を、石灰化骨基質は黒褐色に、未石化骨基質は青く抜ける von Kossa 染色を施して観察すると、PTH 投与群で骨小腔周囲に青く抜けた未石灰化骨基質が観察された。

③透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

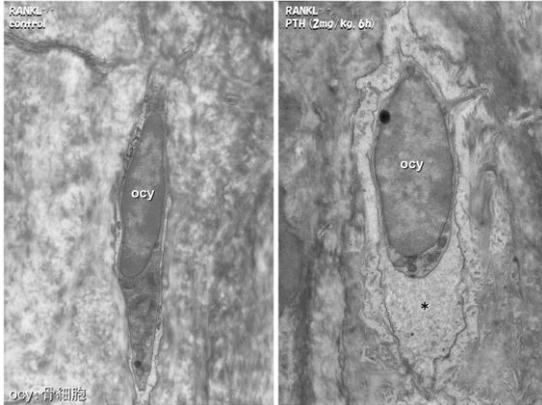


図 1

コントロール群 (図 1: 左) に比べて PTH 投与群 (図 1: 右) の骨小腔壁は粗造となりやや拡大し、骨小腔内部にはコラーゲン線維が分解されたと思われる綿毛状の不定形構造物(\*)が観察された。

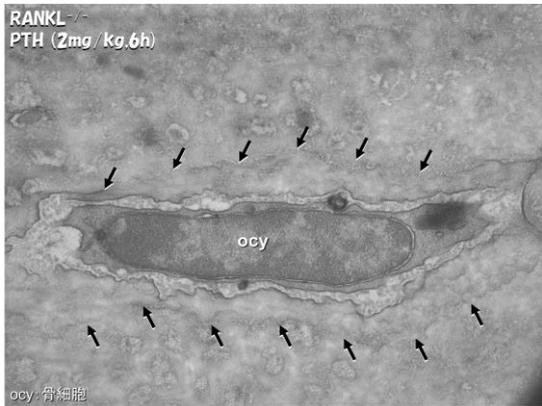


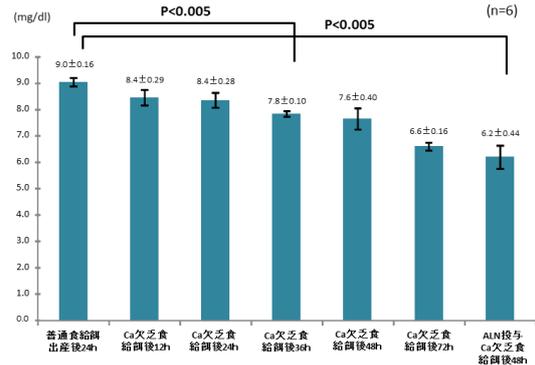
図 2

さらに骨基質をよく観察すると、骨小腔を取り囲むように一層の骨基質を観察することができる (図 2: 黒矢印)。このことは骨基質が一度溶解し、その後再石灰化された可能性が推察された。

④カルセイン標識による蛍光顕微鏡観察  
*Rankl*<sup>-/-</sup>マウスにカルセインを投与し健康顕微鏡にて観察すると、骨小腔周囲に緑色のカルセイン標識が観察された。以上より、破骨細胞が存在しない *Rankl*<sup>-/-</sup>マウスでも、骨細胞が骨基質を溶解し、その後骨小腔周囲に石灰化物を沈着している可能性を示唆していると考えられる。

(2)授乳期マウスを用いた実験系の組織化学的解析結果

①授乳期マウスの血中 Ca 濃度測定



アレンドロネート投与群・非投与群ともに Ca 欠乏食給餌 36~48 時間後に血中 Ca 濃度が有意に低下していた。

②TRAP 染色およびアレンドロネート投与後の破骨細胞観察

破骨細胞の活性を確認するために TRAP 染色を行った。授乳中ではカルシウムの必要量が増加すると推察され、アレンドロネート非投与群では破骨細胞の数が増えている。一方アレンドロネート投与群では破骨細胞数は減少しているが、完全にいなくなっておらず、トリジンブルー染色および透過型電子顕微鏡観察すると破骨細胞は明らかな波状縁を示さなかった。またアポトーシスに陥っているものも観察された。よってアレンドロネート投与により破骨細胞の骨吸収能は抑制されていると考えられた。

③授乳期マウス皮質骨の von Kossa 染色観察  
アレンドロネート投与群・非投与群ともに Ca 欠乏食給餌 48 時間後で骨小腔周囲に青く抜けた未石灰化骨基質が観察された。

④原子間力顕微鏡 (AFM) による骨小腔周囲の弾性率測定

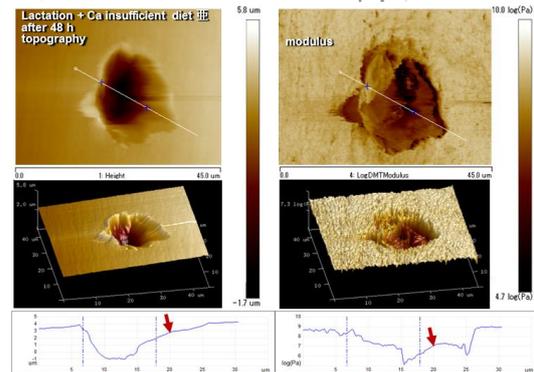


図 3

Ca 欠乏食給餌 48 時間後の試料において、原子間力顕微鏡によるナノインデンテーションを行うと、骨小腔周囲の弾性率が低下傾向を示した (図 3)。

⑤透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察  
コントロール群と比べて授乳期では骨小腔の外形は凹凸を示し、骨小腔内部にはコラーゲン線維が分解されたと思われる綿毛状構造物が観察された。

⑥共焦点レーザー顕微鏡によるカルセイン標識観察

カルシウム欠乏食給餌 72 時間後から普通食に切り替えて 9 日後にカルセイン標識を共焦点レーザー顕微鏡にて観察すると、骨小腔と細管に一致してカルセイン標識が観察された。

⑦<sup>42</sup>Ca 安定同位体を用いた同位体顕微鏡観察

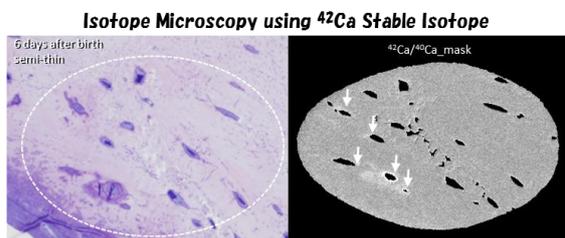


図 4

<sup>42</sup>Ca 安定同位体を出産後 4~6 日目の間に与えて、同位体顕微鏡にて観察すると、いくつかの骨小腔周囲に <sup>42</sup>Ca 安定同位体の沈着(石灰化沈着)が認められた(図 4: 白矢印)。よって、血中 Ca 濃度が低下した授乳期マウスでも、同様に骨細胞周の骨基質が溶解し、その後石灰化沈着が誘導される可能性が示唆された。

#### 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 8 件)

①Hikone K, Hasegawa T, Hongo H(11 人中 3 人目): Histochemical Examination on Periodontal Tissues of Klotho-Deficient Mice Fed With Phosphate-Insufficient Diet. *J Histochem Cytochem.* 65(4):207-221, 2017. 査読有 DOI: 10.1369/0022155416689670

②Hasegawa T, Endo T, Tsuchiya E, Kudo A, Shen Z, Moritani Y, Abe M, Yamamoto T, Hongo H(17 人中 9 人目): 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(1):55-62, 2017. 査読有 <https://doi.org/10.1016/j.job.2016.11.004>

③Sakurai A, Hasegawa T, Kudo A, Shen Z, Nagai T, Abe M, Yoshida T, Hongo H(15 人中 8 人目): Chronological immunolocalization of sclerostin and FGF23 in the mouse metaphyseal trabecular and cortical bone. *Biomed Res.* 38(4):257-267, 2017. 査読有 DOI: 10.2220/biomedres.38.257

④Tanaka Y, Hasegawa T, Yamada T, Yamamoto T, Sasaki M, Hongo H(14 人中 6 人目): Histological assessment for femora of ovariectomized obesity (db/db) mice carrying mutated leptin receptor. *Histol. Histopathol.* 31(12):1315-1326, 2016. 査読有 DOI: 10.14670/HH-11-758

⑤Hongo H, Sasaki M(15 人中 1 人目): Localization of minodronate in mouse femora through isotope microscopy. *J Histochem Cytochem.* 64(10):601-622, 2016. 査読有 DOI: 10.1369/0022155416665577

⑥Tsuboi K, Hasegawa T, Yamamoto T, Sasaki M, Hongo H(11 人中 5 人目): Localization of minodronate in mouse femora through isotope microscopy. *J Histochem Cytochem.* 64(10):601-622, 2016. 査読有 DOI: 10.1369/0022155416665577

⑦Yamamoto T, Hasegawa T, Sasaki M, Hongo H(15 人中 4 人目): Frequency of teriparatide administration affects the histological pattern of bone formation in mice. *Endocrinology.* 157(7):2604-2620, 2016. 査読有 DOI: 10.1210/en.2015-2028

⑧Liu Z, Yamamoto T, Hasegawa T, Hongo H(13 人中 4 人目): Immunolocalization of osteocyte-derived molecules during bone fracture healing of mouse ribs. *Biomed Res.* 37(2):141-151, 2016. 査読有 DOI: 10.2220/biomedres.37.141

[学会発表] (計 12 件)

①吉野弘菜、長谷川智香、邱 紫璇、坪井香奈子、本郷裕美、網塚憲生: アレンドロネートが骨芽細胞系細胞と骨特異性血管に及ぼす組織学的影響。第 123 回日本解剖学会東京 2018 年 3 月 28-30 日 プログラム・抄録集: 61, 2018.

②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 2016 年 8 月 24-26 日 プログラム・抄録集: 418, 2016.

③山本恒之、坪井香奈子、長谷川智香、本郷裕美、網塚憲生: オスミウム浸軟法による破骨細胞のゴルジ装置の立体微細構造および分布に関する走査型電子顕微鏡観察。

(英文: Three-dimensional structure and distribution of Golgi complexes in osteoclasts observed by scanning electron microscopy using osmium-maceration method.) 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 札幌 2016 年 8 月 24-26 日 プログラム・抄録集: 492, 2016.

④Hasegawa T, Hikone K, Hongo H, Yamamoto T, Tsuboi K, Amizuka N: Histochemical examination on calcification in bone and arteries in kl/kl mice and aklotho-/- mice fed with phosphate-insufficient diet. Plenary Poster Session, The Joint Annual Scientific Meetings of the Endocrine Society of Australia, the Society for Reproductive Biology and the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ESA/SRB/ANZBMS Joint meeting 2016), Gold Coast, Australia, 2016. 8. 21-24, Program & Abstracts: 68, 2016.

⑤ Tsuchiya E, Hasegawa T, Hongo H, Yamamoto T, Yoshimasa K, Amizuka N.: Histochemical assessment for vascular endothelial cells and perivascular cells during endochondral ossification. Poster Session, The Joint Annual Scientific Meetings of the Endocrine Society of Australia, the Society for Reproductive Biology and the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ESA/SRB/ANZBMS Joint meeting 2016), Gold Coast, Australia, 2016. 8. 21-24, Program & Abstracts: 73, 2016.

⑥ 本郷裕美、佐々木宗輝、斎藤雅美、宇田川信之、網塚憲生：授乳期のカルシウム欠乏食給餌マウスにおける骨細胞周囲の骨基質の微細構造学的変化について。第34回日本骨代謝学会学術大会 大阪 2016年7月20-23日 プログラム・抄録集：228, 2016.

⑦ 坪井香奈子、本郷裕美、山本知真也、長谷川智香、網塚憲生：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 2016年7月20-23日 プログラム・抄録集：218, 2016.

⑧ 土屋恵李佳、本郷裕美、山本知真也、長谷川智香、宇田川信之、網塚憲生：軟骨内骨化における血管内皮細胞と perivascular cell の細胞間連携に関する組織化学的検索。第34回日本骨代謝学会学術大会 大阪 2016年7月20-23日 プログラム・抄録集：186, 2016.

⑨ 長谷川智香、本郷裕美、山本知真也、坪井香奈子、網塚憲生：低リン食給餌が k1/k1 マウスおよび・klotho-/-マウスの骨・血管石灰化に及ぼす組織学的影響。第34回日本骨代謝学会学術大会 大阪 2016年7月20-23日 プログラム・抄録集：184, 2016.

⑩ 本郷裕美、佐々木宗輝、斎藤雅美、宇田川信之、網塚憲生：授乳期・Ca 欠乏食給餌によって誘導される骨細胞周囲の骨基質変化について。第2回日本骨免疫学会 恩納村 2016年7月6-8日 プログラム・抄録集：113, 2016.

⑪ 坪井香奈子、本郷裕美、長谷川智香、北川善政、網塚憲生：肥満2型糖尿病モデルSDTfatty 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 恩納村 2016年7月6-8日 プログラム・抄録集：107, 2016.

⑫ 土屋恵李佳、本郷裕美、山本知真也、長谷川智香、北川善政、網塚憲生：軟骨内骨化における血管内皮細胞と perivascular cell (septooclast) の組織化学・微細構造学的検索。第36回日本骨形態計測学会 新潟 2016年6月23-25日 プログラム・抄録集：S123, 2016.

[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

本郷 裕美 (HONGO HIROMI)

北海道大学・歯学研究院・学術研究員

研究者番号：00778970

(2) 研究分担者

なし