

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：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15771

研究課題名(和文)骨細胞ネットワークの分泌蛋白ソーティングとミニモデリング誘導メカニズム

研究課題名(英文) Sorting of secretory proteins trafficking and mini-modeling induction by osteocyte network

研究代表者

網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：30242431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞ネットワークは、骨の成熟に伴って幾何学的に規則性を示していた。また、骨形成機序が個体成長初期ではミニモデリング(モデリング)であるのに対して、成長後期では骨リモデリングへと移行していた。骨細胞ネットワークは、胎生期・生後ではスクレロスチンをあまり産生せず、成獣期で骨リモデリングが行われる時期になると骨細胞から産生されることが観察された。一方、成獣期でも力学負荷やビタミンDアナログによってミニモデリングが誘導されることが知られている。今回の研究では、骨細胞ネットワークが局所的にスクレロスチン産生を抑制することで、ミニモデリングを誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Osteocytic network shows geometrically-regular distribution of osteocytes and their cytoplasmic processes in association with bone maturation. Histological process of bone formation chronologically changed from mini-modeling in the early stage of the individual growth into bone remodeling in the adult stage. Osteocytic network did not show sclerostin in immature bone at the early stage of individual growth, while it abundantly synthesized sclerostin in mature bone at the later stage. Vitamin D analogue has been shown to induce mini-modeling even at the adult stage. In this study, it is likely that, when administered with vitamin D analogue, osteocytes appear to cease the sclerostin secretion, locally inducing mini-modeling-based bone formation.

研究分野：骨代謝学・細胞組織学

キーワード：骨細胞 骨リモデリング ミニモデリング スクレロスチン 骨細管

1. 研究開始当初の背景

「骨細胞ネットワーク」は、骨基質の情報を把握するのに最も優れたシステムであり、骨梁の幾何学構築を調節することがシミュレーションで明らかにされている (Huiskes et al, Nature 2000)。しかし、骨細胞ネットワークにおいて、輸送物質の選別(ソーティング)や方向性が決まらなければ、微細亀裂やメカニカルストレスに対応した骨リモデリング(新旧の骨基質の置き換えをいう)・ミニモデリング(ミニモデリングは顕微鏡レベルのモデリングをいう。また、モデリングとは骨の形作りを意味する)を必要な部位に誘導することが難しくなり、骨梁の生理的な幾何学構造を作ることができない。本研究において解決すべき課題点として、第一に、幼弱骨と成熟骨において、骨細胞からの細胞突起の伸展の仕方および突起の分岐の仕方がどのようになっているか微細構造学的に明らかにすること、第二に、各種の骨細胞産生因子が、胎生期・生後から、経時的にどのように変化してゆくのか、また、それが骨リモデリングまたはモデリング(ミニモデリング)時期とどのように関連するのか。第三に、ミニモデリングが、骨細胞が産生する因子、特にスクレロスタチンのソーティング(選別輸送)によって誘導されるかがあげられた。

2. 研究の目的

骨細胞は細胞性ネットワークを形成しスクレロスタチン(骨芽細胞抑制)、FGF23(血中リン濃度調節)、DMP1(周囲の石灰化基質調節)などを分泌することで、破骨細胞分化誘導や骨芽細胞活性を調節すると考えられている。本研究では、未熟な幼弱骨ではなく、成熟した機能的な骨において、骨細胞が細胞突起を、幾何学的規則性を有する配列にすることで、骨細胞由来の分泌蛋白をソーティング(選別輸送)することで標的細胞に蛋白輸送を行う可能性、また、その機構によって、ミニモデリングによる骨形成を誘導する可能性について新規の微細構造観察機器を用いて解明する。

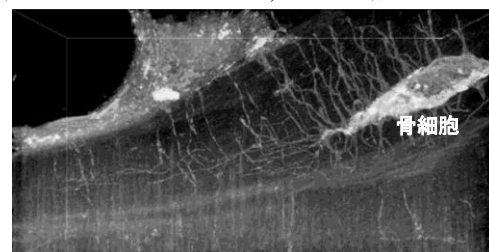
3. 研究の方法

本研究は、研究目的を遂行するために平成 28 年度と 29 年度の2年間にわたって行う計画が立てられた。まず、初年度は、1)幼弱骨と成熟骨における骨細胞ネットワークの幾何学的配列性が規則的か、あるいは、不規則か。さらには、骨細胞の細胞突起の伸展のさせ方・分岐のさせ方などについて微細構造学的に明らかにすることに

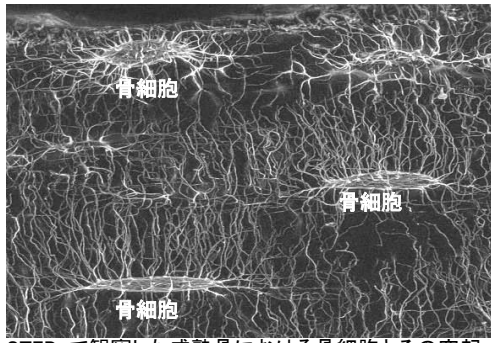
より、骨細胞ネットワークが物質輸送・ソーティングの経路として使用される構造を示すかについて、高解像共焦点レーザー顕微鏡である STED (stimulated emission depletion) および三次元微細構造観察ができる FIB-SEM (Focus ion beam-scanning electron microscopy) にて解析を進める。また、2)骨の発生段階、成長期、成獣期(成人期)と進むにつれて、骨形成の機序がミニモデリングから骨リモデリングへと変化するが、その時に、骨細胞が産生するスクレロスタチン、FGF23、DMP1 といった因子の発現や局在を明らかにする。平成 29 年度では、ミニモデリングを誘導する活性型ビタミン D3 アナログ(エルデカルシトール)を投与したラット・マウスの脛骨・大腿骨における切片を作成し、スクレロスタチンまたは関連因子を免疫組織化学で検出するとともに、骨細胞の突起のマーカーとして、アクチンフィラメントを用いた二重染色を行い STED など解析する。

4. 研究成果

平成 28 年度の研究成果として、幼弱骨または成熟骨における骨細胞ネットワークを FIB-SEM で三次元微細構造学的に観察すると、幼弱骨では、骨芽細胞および骨細胞からの突起が不規則に伸びており、また、細胞突起同士の間隔が認められない箇所が存在した。また、骨芽細胞直下の細胞突起はメッシュワーク構造を示しており、物質の輸送経路としては方向性の定まらない分布をしていることが示された。これに対して、成熟骨においては、骨細胞から太く短い細胞突起が骨細胞の細胞体と平行に出て、すぐに細い突起に分岐するが、すべてが細胞体に平行に進み、ある程度、進んだ所で90度折れ曲がって、骨表面に垂直に終始する、すなわち、骨芽細胞に連結する三次元画像が得られた。このような、骨細胞からあかかも神経円錐のような太い突起が形成され、そこから細い突起が分布する構造は、太い突起内部で分泌蛋白のソーティングが行われる可能性を示唆していた。この結果は Histochem Cell Biol, 2018 に報告してある。



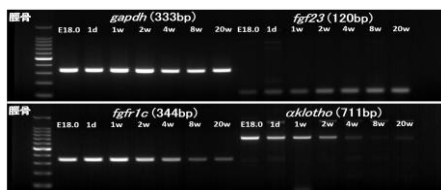
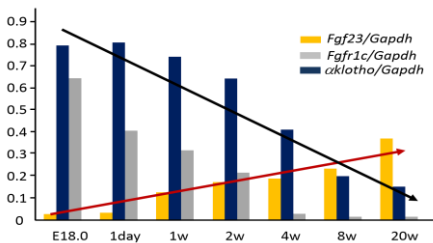
FIB-SEM で観察した骨細胞。細胞突起は骨細胞体に平行、または、垂直に走行している



STED で観察した成熟骨における骨細胞とその突起、多く細胞突起は画面の上下方向に走行している。

次に、骨細胞が産生することが知られているスクレロスチン(骨芽細胞抑制), FGF23(血中リン調節), DMP-1(石灰化調節)の発現局在とミニモデリング・骨リモデリングとを比較検索した。マウス胎仔 18 日齢、生後1日、1, 2, 4, 8, 20週の大腿骨・脛骨の骨幹端骨梁を用いて、モデリング優位(若齢期)と骨リモデリング優位(成獣期)に分けて解析した。その結果、DMP-1 はミニモデリング・骨リモデリングとは関係なく骨細胞・骨細管系に局在していた。スクレロスチン陽性骨細胞は胎生 18 日齢ではほとんど認められず、その後、僅かな反応が4週まで認められた。8週以降では骨細胞・骨細管に明瞭な陽性反応を観察した。一方、FGF23 は生後1週まで陽性反応が認められず、4週後に多くの骨細胞が FGF23 陽性反応を示した。以上から、スクレロスチンはミニモデリング時期にあまり産生されず、骨リモデリング時期に骨細胞・骨細管に検出される傾向が認められた。一方、FGF23 はミニモデリング・骨リモデリングよりも離乳期以降に骨細胞に発現が顕著であることから、全身的なリン濃度などの要因でコントロールされると推測された。この結果は、Biomed Res, 2017 に報告してある。

骨組織におけるFgf23, Fgfr1c, αklotho遺伝子発現の相対比



FGF23, FGFR1c/αklotho(FGF23 の受容体複合体を形成)の発現を胎生期、生後1週~20週にかけて解析した所見。

平成 29 年では、スクレロスチンがミニモデリング・骨リモデリングに良く反応する可能性から、成獣期ラットを用いて(マウスよりラットの方がミニモデリング形成を効率よくしたため)、ミニモデリングを誘導することが知られているエルデカルシトールを投与し、ミニモデリングで形成された部位とそうでない部位とでスクレロスチンの分布を観察した。その結果、骨形成が誘導されない部位ではスクレロスチンは骨表面に垂直に伸びる骨細管(骨芽細胞に通じる経路)に局在するのに対して、ミニモデリングで形成された領域の骨細胞はスクレロスチン産生を示さないことが明らかにされた。よって、骨細胞からの局所的なスクレロスチン分泌がミニモデリングの誘導に重要である可能性が示唆された。現在、スクレロスチンとアクチンフィラメントの分布(骨細胞の突起全てにスクレロスチンが存在するのか、それとも、骨芽細胞に向かう細管(細胞突起)だけにスクレロスチンが局在するのかなどを解析中であり、その後、速やかに論文として提出したい。

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 7 件)

1. Hasegawa T., Yamamoto T., Hongo H., Qiu Z., Abe M., Kanesaki T., Tanaka K., Endo T., Freitas PHL., Li M., Amizuka N.: Three-dimensional ultrastructure of osteocytes assessed by focused ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM). *Histochem Cell Biol.* 149(4):423-432, 2018. DOI: 10.1007/s00418-018-1645-1. (査読有)
2. Cui P., Liu H., Sun J., Amizuka N., Sun Q., Li M.: Zoledronate promotes bone formation by blocking osteocyte-osteoblast communication during bone defect healing. *Histol. Histopath.* 33(1):89-99, 2018. DOI: 10.14670/HH-11-893. (査読有)
3. Sakurai A., Hasegawa T., Kudo A., Zhao S., Nagai T., Abe M., Yoshida T., Hongo H., Yamamoto T., Yamamoto T., Oda K., Freitas de PHL., Li M., Sano H., Amizuka N.: Chronological immunolocalization of sclerostin and FGF23 in the mouse

metaphyseal trabecular and cortical bone.
Biomed Res. 38(4):257-267, 2017.
DOI: 10.2220/biomedres.38.257. (査読有)

4. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.job.2016.11.004> (査読有)
5. Sun J., Sun B., Wang W., Han X., Liu H., Du J., Feng W., Liu B., Amizuka N., Li M.: Histochemical examination of high-dose 1, 25(OH)2D3 effects on bone remodeling in young growing rats. *J Mol Histol.* 47(4):389-399, 2016. DOI: 10.1007/s10735-016-9681-4. (査読有)
6. Yamamoto T., Hasegawa T., Sasaki M., Hongo H., Tsuboi K., Shimizu T., Ohta M., Haraguchi M., Takahata T., Oda K., Freitas PHL., Takakura A., Takao-Kawabata R., Isogai Y., Amizuka N.: Frequency of teriparatide administration affects the histological pattern of bone formation in mice. *Endocrinology.* 157(7):2604-2620, 2016. DOI: 10.1210/en2015-2028. (査読有)
7. Liu Z., Yamamoto T., Hasegawa T., Hongo H., Tsuboi K., Tsuchiya E., Haraguchi M., Abe M., Freitas PHL., Kudo A., Oda K., Li M., Amizuka N.: Immunolocalization of osteocyte-derived molecules during bone fracture healing of mouse ribs. *Biomed Res.* 37(2):141-151, 2016. DOI: 10.2220/biomedres.37.141. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. 網塚憲生, 長谷川智香: 骨における組織化学・電顕イメージング. 講演あり方委員会企画シンポジウム「イメージング最前線」第36回日本骨代謝学会 長崎 2018年7月26-28日 発表予定
2. 阿部未来, 長谷川智香, 網塚憲生: 骨リ

モデリングとモデリングにおける活性型骨芽細胞と周囲の細胞群の組織学的検索. 第38回日本骨形態計測学会 大阪 2018年6月21-23日 発表予定

3. 工藤 愛, 長谷川智香, 網塚憲生: マウス長管骨における sclerostin と FGF23 産生細胞の経時的局在変化. 第37回日本骨形態計測学会 大阪 2017年6月22-24日 日本骨形態計測学会雑誌 27(1):S114, 2017.
4. 山本知真也, 長谷川智香, 網塚憲生: 副甲状腺ホルモン(PTH)単回投与後における大腿骨の組織化学的变化について. 第37回日本骨形態計測学会 大阪 2017年6月22-24日 日本骨形態計測学会雑誌 27(1):S99, 2017.
5. 長谷川智香, 網塚憲生: FIB-SEM を用いた骨の細胞群の三次元微細構造イメージング. シンポジウム 1「電子顕微鏡・光学顕微鏡による最先端・骨イメージング」第37回日本骨形態計測学会 大阪 2017年6月22-24日 日本骨形態計測学会雑誌 27(1):S57, 2017.
6. 網塚憲生, 長谷川智香, 山本知真也: ミニモデリングと骨リモデリングにおける骨形成-組織化学・微細構造学的知見-. イブニングセミナー2 第37回日本骨形態計測学会 大阪 2017年6月22-24日 日本骨形態計測学会雑誌 27(1):S88, 2017.
7. 網塚憲生, 長谷川智香: 骨の細胞に対する PTH 作用の組織学的知見. ワークショップ:08 二次性副甲状腺機能亢進症治療の新たな知見 第62回日本透析医学会学術集会・総会 横浜 2017年6月16-18日
8. 長谷川智香, 坪井香奈子, 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 先端バイオイメージングや新規電子顕微鏡技術で見る組織細胞の動的形態学 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 長崎 2017年3月28-30日 プログラム・抄録集:88, 2017.
9. 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. 教育研修講演 9 硬組織の画像評価: 静と動 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 福岡 2016年10月13-14日 日本整形外科学会雑誌 90(8):S1653, 2016.

[その他]

北海道大学大学院歯学研究院 口腔健康科学分野 硬組織発生生物学教室ホームページ

https://www.den.hokudai.ac.jp/anatomy2/hokudai_d/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)
北海道大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：3 0 2 4 2 4 3 1

(2) 連携研究者

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：5 0 7 3 9 3 4 9

坪井 香奈子 (TSUBOI, Kanako)
北海道大学病院・医員
研究者番号：5 0 7 5 4 6 1 0

(3) 研究協力者

本郷 裕美 (HONGO, Hiromi)