

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791341
 研究課題名 (和文)
 骨リモデリングにおける骨芽細胞活性化共役因子 (カップリングファクター) の解明
 研究課題名 (英文)
 The examination on coupling factor in the course of bone remodeling
 研究代表者
 李 敏啓 (LI MINQI)
 新潟大学・超域研究機構・助教
 研究者番号：60447612

研究成果の概要：

骨芽細胞活性化共役因子 (カップリングファクター) は、破骨細胞から産生され骨芽細胞の活性化に作用する因子である。以前の我々の研究では、骨リモデリングにおける骨芽細胞の活性化は破骨細胞が必須であること、特に、骨芽細胞の活性化には必ずしも破骨細胞の骨吸収により骨基質埋め込まれていた局所因子が放出・作用することではなく、破骨細胞が分泌する有機成分あるいは破骨細胞との細胞間接触である可能性を推測している。そこで本研究では、PTH 間歇投与による骨形成の過程において、カップリングファクターとしての候補因子・役割について検索を試みた。PTH 投与後では骨芽細胞前駆細胞の増殖および骨基質合成が上昇していたが、破骨細胞形成も亢進していた。c-fos^{-/-}マウスに同様に PTH 間歇投与を行うと、骨芽細胞前駆細胞の増殖は亢進したが成熟型骨芽細胞への分化と骨基質合成は誘導されなかった。従って、破骨細胞からのカップリングファクターの影響は、骨芽細胞前駆細胞の分化および機能亢進にあると推測された。破骨細胞からのカップリングファクターの形態学的受容様式として、破骨細胞と骨芽細胞前駆細胞との細胞間接触が頻繁に認められたことから、cell-to-cell contact の可能性が推測された。また、カップリングファクターとして機能する因子の候補として ephrin B2/EphB4 が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野：形態系基礎歯科学

科研費の分科・細目：口腔解剖学

キーワード：解剖学、細胞・組織、遺伝子、歯学、骨

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨リモデリングは骨代謝にとって重要な現象であり、骨の三次元構造を変化させるとともに PTH(副甲状腺ホルモン)などの血中カルシウム調節因子に応じてコントロールされている。骨リモデリングにより、古い骨基質が新しい骨基質に置換するが、その過程においては、破骨細胞の骨吸収に伴って骨芽細胞の活性化とその後の骨形成が誘導される。

(2) 国内・国外において、破骨細胞ならびに骨芽細胞の分化形成に関する研究は盛んに行われているが、骨リモデリングにおいて骨芽細胞または前骨芽細胞が破骨細胞に依存して活性化を受けるメカニズムは未解明のままである。一方、近年の骨粗鬆症の治療薬開発では、破骨細胞の骨吸収を最小限に抑えながら、休止期の骨芽細胞を活性化型骨芽細胞へと変換させることで骨形成優位に誘導する努力が図られている。従って、骨リモデリングにおける骨芽細胞活性化のメカニズムがにわかに注目を浴びている。

(3) 上記を踏まえた以前の我々の研究では、骨リモデリングにおける骨芽細胞の活性化は破骨細胞が必須であること(Sakagami, Li et al., Micron 2005)、特に、骨芽細胞の活性化には必ずしも破骨細胞の骨吸収により骨基質埋め込まれていた局所因子が放出・作用することではなく、破骨細胞が分泌する有機成分あるいは破骨細胞との細胞間接触である可能性が推測されている。しかしながら、骨リモデリングにおける骨芽細胞活性化のメカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

上述のように、骨リモデリングにおける骨芽細胞活性化のメカニズムは解明されていないことから、本研究では「骨リモデリング過程の骨芽細胞の活性化における破骨細胞の役割」について具体的なモデル実験を作製してカップリングファクターの作用点(骨芽細胞の分化・機能亢進、あるいは前駆細胞の増殖)、微細構造学的な作用様式、

カップリングファクターとしての候補因子などについて検索する。

リモデリングにおける骨芽細胞の活性化は、①破骨細胞の骨吸収により骨基質に埋め込まれていた局所因子が放出・作用することで誘導する(以前の我々の研究では可能性が低い)、②破骨細胞が細胞膜上に発現する何らかの物質を介して誘導される、③破骨細胞が骨基質表面に分泌する物質が誘導する、の3通りの可能性に分けて考えられるため、in vitro では有用な方法が難しく、申請者は研究計画に記したように各遺伝子欠損マウスを用いた in vivo の解析を進める。具体的には副甲状腺ホルモン(PTH)の間歇投与を行う(下記参照)。

3. 研究の方法

PTH 間歇投与によって骨形成と骨吸収の両方が亢進するが、結果的に骨形成が優位となる。そこで、野生型マウスに PTH 間歇投与を2週間行った場合と、破骨細胞が存在しないマウス(c-fos^{-/-})に同様の実験を行い骨芽細胞前駆細胞(前骨芽細胞)の細胞増殖と成熟型骨芽細胞への分化および基質合成と言った機能亢進について検索を行った。

検索項目

- ・ アルカリ性ホスファターゼ(ALP)
- ・ 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)
- ・ BrdU の取り込み
- ・ ephrinB2, EphB4 の免疫組織化学(免疫電顕)
- ・ 微細構造学観察(電顕観察)
- ・ カルセイン標識および骨形態計測

4. 研究成果

(1) 野生型マウスへの PTH 間歇投与

PTH 投与後では、BrdU の取り込みを示す ALP 陽性細胞が増加したことから、PTH による骨芽細胞前駆細胞の増殖が示唆された。また、カルセイン標識の上昇から骨基質合成の亢進も推測された。従って、PTH 間歇投与では、

骨芽細胞前駆細胞の増殖と成熟型骨芽細胞への分化および基質合成をはじめとする機能亢進が考えられた。

(2) c-fos^{-/-}マウスへの PTH 間歇投与

野生型マウスにおける骨芽細胞系細胞に対するこれらの影響は、PTH の直接作用なのか破骨細胞を介したカップリングなのかを明らかにする目的で、破骨細胞が存在しない c-fos^{-/-}マウスに同様の実験を行った。その結果、骨芽細胞前駆細胞の造花は認められたが、成熟型骨芽細胞の出現、および骨基質合成は誘導されなかった。

従って、(1),(2)の結果から、破骨細胞とのカップリングで誘導されるのは、骨芽細胞前駆細胞の増殖ではなく、成熟型骨芽細胞への分化や骨基質合成などの機能亢進であると推測された。

(3)カップリングファクターの候補因子

破骨細胞と骨芽細胞前駆細胞との細胞間接触が頻繁に認められたことから、カップリングファクターの微細構造学的機序としては、cell-to-cell contact の可能性が推測された。そこで、近年、注目を浴びている ephrin B2/EphB4 の産生を検索すると、骨芽細胞および前骨芽細胞における EphB4 の発現が上昇していることが明らかとなった。従って、カップリングファクターとして機能する因子の候補として ephrin B2/EphB4 が考えられた。

以上の結果から、骨リモデリングにおけるカップリングにおいて、破骨細胞は骨芽細胞前駆細胞に cell-to-cell contact によって、未分化な状態から成熟骨芽細胞への分化を亢進することが推測された。また、その有力な候補因子として ephrin B2/EphB4 が考えられた。

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 10 件)

- ① Li, M. et al. Distribution of macrophages, osteoclasts and the B-lymphocyte lineage in osteolytic metastasis of mouse mammary carcinoma. *Biomedical Research*. 28,

127-137, 2007. 査読有

- ② Tatsumi, S., Li, M. et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metabolism*. 5, 464-475, 2007. 査読有
- ③ Shimazaki, M., Li, M., et al. Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *The Journal of Experimental Medicine*. 205, 295-303, 2008. 査読有
- ④ Freitas, PHL., Li, M., et al. Intermittent parathyroid hormone administration stimulates preosteoblastic proliferation without leading to enhanced bone formation in osteoclast-less c-fos^{-/-} mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. In press. 2009. 査読有
- ⑤ Amizuka, N., Li, M., et al. Warfarin administration disrupts the assembly of mineralized nodules in osteoid. *Journal of Electron Microscopy*. 58, 55-65, 2009. 査読有
- ⑥ Segawa, T., Li, M., et al. Targeted disruption of Npt2c, mutated gene for hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria (HHRH). *J Am Soc. Nephro.* 20, 104-113, 2009. 査読有
- ⑦ 李 敏啓、Sobhan Ubaidus、Paulo HL Freitas、小澤英浩、網塚憲生 骨リモデリングと骨細胞・骨細管系の構築に関する組織学的検索 *The BONE メディカルレビュー社*、東京 22(4)、3-7, 2008. 査読無
- ⑧ 李 敏啓、齋藤直朗、網塚憲生 ステロイド性骨粗鬆症における骨質 *Clinical Calcium*. 医薬ジャーナル社、東京、18(3)、328-335, 2008. 査読無
- ⑨ 李 敏啓、Sobhan Ubaidus、網塚憲生 骨基質 特集「骨質」 *The BONE メ*

メディカルレビュー社、東京 21(1),
59-65, 2007. 査読無

- ⑩ 李 敏啓、網塚憲生、Paulo Henrique、
Sobhan Ubaidus、小島 拓、小澤英浩
骨転移巣における破骨細胞の局在と基
質分解酵素産生について -破骨細胞
による基質認識機構の可能性- The
BONE メディカルレビュー社、東京、
21(3), 3-7, 2007. 査読無

[学会発表] (計2件)

- ① Li, M., et al. Prednisolone Induces
Osteocyte's Death and Erosion of
Osteocytic Lacunae Walls. The 29th
Annual Meeting of the American
Society for Bone and Mineral
Research. Sep 16-19, 2007. Honolulu,
Hawaii, USA.
- ② 李 敏啓 形態学から見た骨基質石灰
化機構の解析 第50回歯科基礎医学会
総会 サテライトシンポジウム 2008
年9月23日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 敏啓 (LI MINQI)
新潟大学・超域研究機構・助教
研究者番号：60447612

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

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10件)

- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

〔学会発表〕(計5件)

- ①
- ②
- ③

〔図書〕(計2件)

- ①
- ②

[産業財産権]

○出願状況 (計□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◇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

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

6. 研究組織

(1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：