

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10040

研究課題名(和文) 骨特異的血管におけるPTH/PTHrPの新規作用 - 骨血管連関の細胞学的解明 -

研究課題名(英文) Novel action of PTH/PTHrP in bone-specific blood vessels

研究代表者

長谷川 智香 (Hasegawa, Tomoka)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：50739349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨粗鬆症治療薬である副甲状腺ホルモン(PTH)の間歇投与が、長管骨で骨芽細胞系細胞の増殖や骨形成促進に寄与するのみならず、骨特異的血管の数や管腔径を増加させるとともに、血管周囲に局在する SMA陽性stromal細胞の増殖を促進することを明らかとした。骨特異的血管と骨芽細胞・SMA陽性stromal細胞では、EphB4/ephrinB2によるカップリングが生じている可能性、また、SMA陽性stromal細胞が、血管平滑筋細胞や骨芽細胞系細胞へと分化する可能性が見いだされ、PTHの骨形成作用における骨血管連関の可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、骨芽細胞系細胞に作用すると考えられてきたPTHが、骨特異的血管や血管周囲細胞の増殖や分化に作用する可能性、また、骨特異的血管と骨芽細胞系細胞の骨血管連関の可能性を明らかにした研究である。骨粗鬆症治療薬として用いられるPTHの骨形成作用は、これまで骨芽細胞と破骨細胞によるカップリング機構にて説明がなされてきたが、今回の研究成果から、骨特異的血管および骨芽細胞系細胞における骨血管連関が寄与する可能性が示唆され、その学術的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that intermittent administration of parathyroid hormone (PTH) increased the number and lumen diameter of bone-specific blood vessels and promoted the proliferation of SMA-positive stromal cells localized around the blood vessels in murine long bones. Furthermore, SMA-positive perivascular stromal cells may differentiate into vascular smooth muscle cells and osteoblast lineage cells, strongly suggesting the possibility of bone-blood vessel interaction in the anabolic action of PTH.

研究分野：組織学、骨代謝学、微細構造学

キーワード：骨特異的血管 骨芽細胞 PTH PTHrP endomucin SMA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

副甲状腺ホルモン(PTH)および副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)は、骨芽細胞・前骨芽細胞に存在する PTH/PTHrP 受容体に結合し、骨・軟骨の細胞分化・増殖に作用する。研究代表者らは、マウスに PTH を間歇投与すると、前骨芽細胞が増加し破骨細胞数が増加すること、また、両者のカップリングによって骨芽細胞分化が進み、活発な骨形成が維持されることを報告してきた(Yamamoto, Hasegawa et al., *Endocrinology*, 2016; Hasegawa et al., *J Histochem Cytochem*, 2018)。

一方、血管は骨でも重要な組織であり、骨芽細胞系細胞や骨髄間質細胞との関わりや機能に対する解明が求められてきた。近年、骨組織では、CD31<sup>high</sup>/endomucin<sup>high</sup> 骨特異的血管が発見され、骨芽細胞分化・骨形成誘導に寄与する可能性が報告されている(Kusumbe et al., *Nature*, 2014)。また、研究代表者らの予備実験から、長管骨の骨幹端、特に骨・軟骨移行部に多数の CD31<sup>high</sup>/endomucin<sup>high</sup> 骨特異的血管を認め、その多くが EphB4 陽性静脈であり、CD31<sup>high</sup>endomucin<sup>high</sup>/EphB4 陽性静脈系血管の周囲に ephrinB2 陽性骨芽細胞が近接して局在することが見出された。このことから、正常状態では、骨血管連関のもと様々な細胞間コミュニケーションが生じている可能性が推測された。さらに、研究代表者らは、preliminary data として PTH が骨形成誘導だけでなく、骨梁間や骨髄腔に存在する CD31<sup>high</sup>endomucin<sup>high</sup>/EphB4 陽性骨特異的血管の増加や血管腔の拡大、血管周囲の細胞群の変化(SMA 陽性細胞の出現)を大きく変えることを確認している。しかし、骨の血管に対する PTH/PTHrP の作用を *in vivo* で詳細に解析した報告はなく、その細胞学的メカニズムは明らかとされていない。

そこで、研究代表者は、これらの preliminary なデータを踏まえて、PTH/PTHrP は骨芽細胞系細胞だけに作用するのではなく、骨特異的血管にも作用すること、さらに、PTH/PTHrP はそのような血管系細胞を介して骨芽細胞系細胞に作用するといった「骨血管連関」が存在することを推察し、本研究を展開することとした。

### 2. 研究の目的

骨リモデリング(骨改造)は健常な骨において絶えず誘導されているが、その細胞学的基盤は破骨細胞と骨芽細胞系細胞とのカップリングに依存している。このことから、PTH 間歇投与による骨形成亢進も、この機序に基づき説明されてきた。ところが、「骨特異的血管の発見と骨血管連関の可能性」、さらには、研究代表者の予備実験に基づく「PTH が骨特異的血管にも作用を及ぼす可能性」から、PTH 間歇投与による骨形成亢進には、従来のカップリング機構だけでなく、骨特異的血管(骨血管連関)が大きく寄与する可能性が強く示唆される。

これらの考察をもとに、本研究では、1)PTH/PTHrP による CD31<sup>high</sup>/endomucin<sup>high</sup> 骨特異的血管に対する作用(骨特異的血管の血管新生、血管腔の変化、pericyte・血管平滑筋細胞などの周囲細胞の分布)、2)PTH/PTHrP が作用した骨特異的血管が周囲の骨芽細胞系細胞/骨髄間質細胞(CAR 細胞、telocyte を含む)などの細胞群に対する作用(骨血管連関)を解明することで、「骨特異的血管における PTH/PTHrP の新規作用」という新しい観点の研究を展開する。

### 3. 研究の方法

生後6週齢雄性 C57BL/6J マウスに溶媒(生理食塩水、コントロール群、N = 6)または human PTH[1-34](20µg/kg/day、PTH 投与群、N = 6)を1日2回(12時間毎)の頻度で14日間にわたり腹腔内投与した。PTH 投与後、マウスを4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定を施した後、右側大腿骨・胸大動脈・肝臓・腎臓を組織解析サンプルとして採取した。右側大腿骨は10%EDTA 溶液にて1か月脱灰した後、また、その他の臓器は脱灰操作を行わずに、アルコール脱水およびパラフィン包埋を行った。厚さ 5µm のパラフィン切片を作成し、各種組織化学解析に供した。また、左側大腿骨は、4.13%EDTA 溶液にて2か月間脱灰した後、オスミウム後固定を行い、アセトン脱水およびエポキシ樹脂包埋を行っ

た。準超薄樹脂切片を作成し、toluidine blue 染色を施す一方、超薄切片は、クエン酸鉛と酢酸ウラニルによる電子染色後透過型電子顕微鏡観察に供した。一方、左側脛骨からは、total RNA を抽出し、逆転写反応による cDNA 合成後、RT-PCR および real-timePCR 解析に供した。具体的な解析項目を以下に示す。

- (1) 免疫組織化学(endomucin,  $\alpha$ smooth muscle actin:  $\alpha$ SMA, ephrinB2, EphB4, tissue non-specific Alkaline Phosphatase: TNALP, c-kit, PTH/PTHrP receptor, VEGF, Flk-1:VEGF 受容体 2)
- (2) toluidine blue 染色(準超薄切片)
- (3) 透過型電子顕微鏡観察(超薄切片)
- (4) RT-PCR、real-timePCR 法による遺伝子発現解析(*Endomucin*, *asma*, *Ephrinb2*, *Ephb4*, *Pthr*)
- (5) 血管の管腔径(長径・短径)、血管の管腔面積、EphB4 陽性血管数、 $\alpha$ -SMA 陽性血管数、endomucin 陽性血管数、ALP 陽性細胞面積(組織量比)、骨芽細胞面(骨面比)、VEGF 陽性細胞面積(組織量比)の計測、および、t 検定による統計解析

#### 4 . 研究成果

##### (1) PTH 間歇投与による骨特異的血管および血管周囲細胞の変化(骨組織)

生後6週齢マウスに溶媒を投与した control 群、および、human PTH[1-34]を投与した PTH 投与群の大腿骨遠位骨幹端部を観察すると、PTH 投与群では、endomucin 陽性血管の数が増加しており、血管の管腔径(長径)や管腔面積が有意に増加していた。また、 $\alpha$ SMA 陽性血管平滑筋細胞で取り囲まれた血管(動静脈)が増加するとともに、endomucin 陽性血管の周囲に多数の $\alpha$ SMA 陽性 stromal 細胞が観察された(図1)。

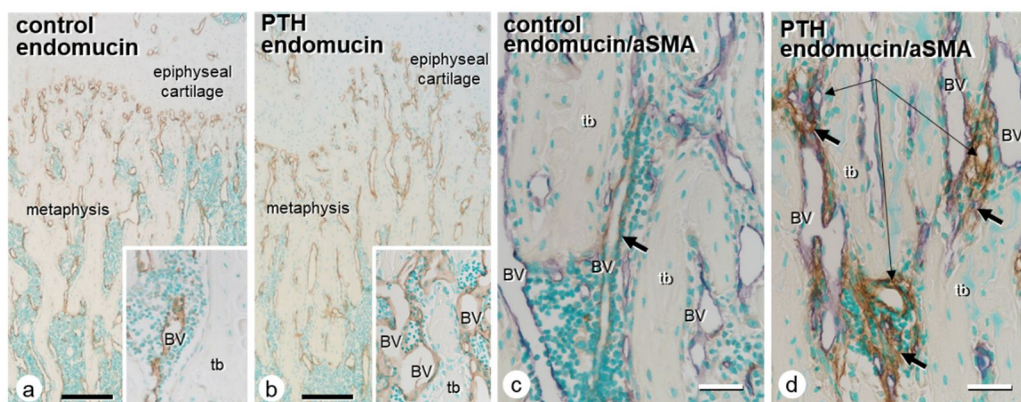


図1: control および PTH 間歇投与マウス骨組織における endomucin 免疫染色像(a, b、茶色)と、endomucin/  $\alpha$ SMA 二重染色像(c, d、endomucin: 青紫色、  $\alpha$ SMA: 茶色)を示す。

動脈系血管内皮細胞が発現する膜蛋白である ephrin B2 と静脈系血管内皮細胞が発現する EphB4 は、骨芽細胞と破骨細胞のカップリングファクターとしても知られていることから、骨特異的血管および血管周囲細胞における ephrin B2 と EphB4 の局在を検索した。その結果、control 群、PTH 投与群いずれにおいても、endomucin 陽性血管が EphB4 陽性反応を示していた。一方、ephrin B2 陽性反応は、control 群では、おもに骨表面の骨芽細胞に認められるのに対し、PTH 投与群では、骨芽細胞のみならず血管周囲の $\alpha$ SMA 陽性細胞にも観察された(図2)。また、これら免疫染色像と矛盾なく、PTH 投与群では、control 群と比較して、*Endomucin*, *asma*, *Ephrinb2*, *Ephb4* の遺伝子発現が有意に上昇していた。

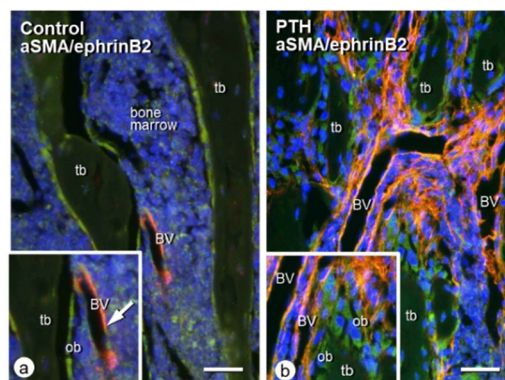


図2: control および PTH 間歇投与マウス骨組織における  $\alpha$ SMA/ephrinB2 二重染色像を示す(  $\alpha$ SMA: 赤色、ephrinB2: 緑色、核: 青色)

PTH 投与により増加した血管周囲の SMA 陽性細胞に注目して解析を行うと、これら SMA 陽性細胞は、骨芽細胞系細胞のマーカである TNALP 陽性を示す一方、未分化間葉系細胞のマーカである c-kit 陽性反応を示していた(図3a-d)。これらのことから、PTHを間歇投与すると、血管周囲に未分化間葉系細胞が増加すること、また、その一部は骨芽細胞系細胞へ分化しつつある可能性が推測された。同部位の微細構造観察を行うと、PTH 投与群では、骨表面の骨芽細胞と血管の間を埋めるように、多数の stromal 細胞が局在し、これらの多くは細胞内小器官を発達させていた。このような stromal 細胞は、細胞突起を伸ばし、周囲の間質細胞や骨芽細胞と細胞間接触をしていた。一方、一部の stromal 細胞は長い細胞突起を伸ばした紡錘形の外形を示しており、様々な微細構造を呈する細胞が局在すると推測された(図3e-h)。さらに、PTH 投与群の骨組織では、*Pthr* 遺伝子の発現が有意に上昇するとともに、骨芽細胞や血管内皮細胞および血管周囲細胞で、PTH 受容体や VEGF、Flk-1(VEGF 受容体 2)の陽性反応が認められたことから、これら細胞群が骨特異的血管数増加に寄与しているものと推測された。

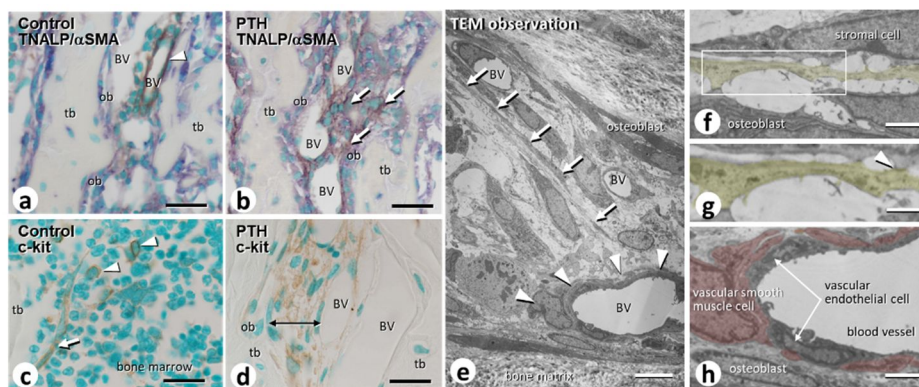


図3: control および PTH 間歇投与マウス骨組織における TNALP/ SMA 二重染色像(a, b, TNALP: 青紫色、 SMA: 茶色)、c-kit 免疫染色像(c, d, 茶色)、PTH 投与マウス血管周囲細胞の透過型電子顕微鏡像を示す。

以上より、PTH 間歇投与は、骨特異的血管の数や管径を増加させるとともに、血管周囲に局在する SMA 陽性細胞の増殖を促進すること、また、SMA 陽性細胞は血管平滑筋細胞や骨芽細胞系細胞へと分化する可能性が示唆された。

これら研究成果は、Calcified Tissue International 誌 108 巻 3 号(391-406 頁)に掲載された。

## (2) PTH 間歇投与による骨特異的血管および血管周囲細胞の変化(骨組織以外の臓器)

骨特異的血管のマーカである endomucin は、骨組織以外の肝臓や腎臓、肺などの全身の様々な組織の血管でも認められるとの報告がある。このことから、PTH の血管や血管周囲細胞への影響は骨組織特異的であるのか、あるいは、骨組織以外の臓器でも起こりえるのか検討を行った。その結果、control マウス、PTH 間歇投与マウスの両方で、腎臓の糸球体や尿細管周囲毛細血管、肝臓の中心静脈、洞様毛細血管、大動脈の血管内皮細胞の一部で endomucin 陽性反応が認められた。また、SMA 陽性反応は、腎臓のいくつかの動静脈や大動脈中膜で認められる。しかし、いずれの臓器においても endomucin 陽性血管の周囲に、SMA 陽性細胞は認められなかった(図4)。このことから、SMA 陽性血管周囲 stromal 細胞の増殖には、血管内皮細胞のみならず血管周囲の微細環境が寄与する可能性があると考えられ、今後さらなる検討が必要であると考えられた。本研究成果は、Journal of Oral Biosciences 誌に掲載予定である。

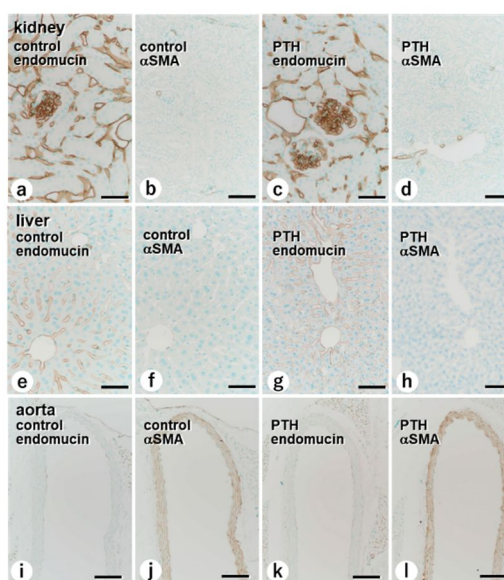


図4: control および PTH 間歇投与マウス腎臓・肝臓・大動脈における endomucin 免疫染色像(茶色)と、SMA 免疫染色像(茶色)を示す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhao S., Hasegawa T., Hongo H., Yamamoto T., Abe M., Yoshida T., Haraguchi M., Freitas PHL., Li M., Tei K., Amizuka N.	4. 巻 108
2. 論文標題 Intermittent PTH administration increases bone specific-blood vessels and surrounding stromal cells in murine long bones.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Calcif Tissue Int.	6. 最初と最後の頁 391-406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-020-00776-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hongo H., Hasegawa T., Saito M., Tsuboi K., Yamamoto T., Sasaki M., Abe M., Freitas PHL., Yurimoto H., Udagawa N., Li M., Amizuka N.	4. 巻 68
2. 論文標題 Osteocytic Osteolysis in PTH-treated Wild-type and Rankl-/- Mice Examined by Transmission Electron Microscopy, Atomic Force Microscopy, and Isotope Microscopy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem.	6. 最初と最後の頁 651-668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155420961375.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagai T., Hasegawa T., Yimin, Yamamoto T., Hongo H., Abe M., Yoshida T., Yokoyama A., Freitas PHL., Li M., Yokoyama A., Amizuka N.	4. 巻 155
2. 論文標題 Immunocytochemical assessment of cell differentiation of podoplanin-positive osteoblasts into osteocytes in murine bone.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 369-380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-020-01937-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsuchiya E., Hasegawa T., Hongo H., Yamamoto T., Abe M., Yoshida T., Zhao S., Tsuboi K., Udagawa N., Freitas PHL., Li M., Kitagawa Y., Amizuka N.	4. 巻 70
2. 論文標題 Histochemical assessment on the cellular interplay of vascular endothelial cells and septoclasts during endochondral ossification in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy.	6. 最初と最後の頁 201-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfaa047.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hasegawa T., Yamamoto T., Sakai S., Miyamoto Y., Hongo H., Qiu Z., Abe M., Takeda S., Oda K., Freitas PHL., Li M., Endo K., Amizuka N.	4. 巻 67
2. 論文標題 Histological effects of the combined administration of eldecalcitol and a parathyroid hormone in the metaphyseal trabeculae of ovariectomized rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Histochem Cytochem.	6. 最初と最後の頁 169-184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1369/0022155418806865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hasegawa T., Miyamoto Y., Abe M., Qiu Z., Yamamoto T., Yimin, Yoshida T., Yoshino H., Hongo H., Yokoyama A., Sasaki M., Kuroshima S., Hara K., Kobayashi M., Akiyama Y., Maeda T., Freitas PHL., Li M., Amizuka N.	4. 巻 68
2. 論文標題 Histochemical examination on principal collagen fibers in periodontal ligaments of ascorbic acid-deficient ODS-od/od rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy.	6. 最初と最後の頁 349-358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfz021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 長谷川智香、趙 申、吉野弘菜、阿部未来
2. 発表標題 骨血管連関からみた骨芽細胞系細胞の分化 .
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川智香
2. 発表標題 骨組織に対する副甲状腺ホルモン作用の多様性 .
3. 学会等名 第41回日本骨形態計測学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部未来、山本知真也、本郷裕美、網塚憲生、長谷川智香
2. 発表標題 副甲状腺ホルモン間歇投与による皮質骨多孔化の組織化学的検索.
3. 学会等名 第62 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川智香、邱 紫セン、宮本幸奈、山本知真也、網塚憲生
2. 発表標題 骨特異的血管と骨細胞における組織化学・電顕イメージング.
3. 学会等名 第39回日本骨形態計測学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川智香、本郷裕美、山本知真也、網塚憲生
2. 発表標題 骨血管連関における細胞間コミュニケーション.
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------