

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390488

研究課題名（和文） 骨細胞・骨細管系による骨基質ミネラル維持機構の解明

研究課題名（英文） Cellular mechanism of maintaining bone minerals by osteocyte lacunar-canalicular system

研究代表者

網塚 憲生 (AMIZUKA NORIO)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：30242431

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、骨に無数に張りめぐらされている骨細胞ネットワーク（骨細胞・骨細管系）が骨基質ミネラルの調節・維持および骨リモデリングに対してどのような細胞学的作用を示すのか *in vivo* で解明することである。本研究によって明らかにされた点は以下である。1) 骨細胞・骨細管系の配列における幾何学的規則性は、成熟骨である皮質骨で発達しており、そのような規則的に配列した骨細胞からはスクレロスチンやFGF23といった因子が多量に産生されること、2) オステオプロテジェリン遺伝子欠損マウスや *klotho* 遺伝子欠損マウスといった骨代謝回転が異常を示す状態では、骨細胞・骨細管系の配列が不規則となり、DMP-1 やスクレロスチンなどの産生が影響を受けることも明らかにしている。3) さらに、規則的な骨細管系に存在する骨細胞は、副甲状腺ホルモンに反応して、周囲の骨基質ミネラルを溶出する可能性も得られた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research project is to clarify whether osteocyte lacunar canalicular system (OLSC) would maintain bone minerals and affect bone remodeling *in vivo*. Our findings demonstrated that 1) OLCS is geometrically well-distributed in mature cortical bone, but not, in immature trabecular bone. Sclerostin and fibroblast growth factor (FGF) 23, which are osteocyte-derived factors, are abundantly synthesized in osteocytes in the well-arranged OLSC, 2) osteoprotegerin deficient mice and *klotho* deficient mice bearing abnormal bone remodeling showed irregularly distributed OLCS, which affects the synthesis of sclerostin and dentin matrix protein-1 (DMP-1), and 3) the administration of parathyroid hormone induced enlarged osteocytic lacunae, i.e., release of bone minerals, indicating osteocytic osteolysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：細胞・組織、解剖学、骨細胞、骨、歯学

1. 研究開始当初の背景

骨細胞の細胞性ネットワーク（骨細管系）は三次元的に規則的な構造を示し、物質輸送、内部応力の感知、骨芽細胞の機能調節をおこなうと考えられている。骨細管系は骨リモデリングによってより規則的・機能的な構造となるのが、我々の以前の研究（基盤研究B）にて解明されている。

その一方で、近年、骨細胞が産生する様々な因子が発見されており、スクレロスチンは骨細胞から産生されて骨表面の骨芽細胞を抑制する因子であること、線維芽細胞増殖因子（FGF）23は、骨細胞から産生されて、循環系を介して腎臓におけるリンの再吸収の抑制および活性型ビタミンD合成を抑制することが、さらに、dentin matrix protein-1（DMP-1）は骨基質のリン酸カルシウム結晶との親和性が高く、骨小腔・骨細管周囲の基質石灰化に関与すること、が多くの論文で明らかにされている。

我々のグループも、ジフテリア毒受容体を骨細胞に特異的に発現させたトランスジェニックマウスを用いて、骨細胞が死滅するときに骨基質ミネラルの流出が起こること、klotho 遺伝子欠損マウスでは骨組織における骨細胞の状態および骨基質石灰化が極めて悪いことを報告してきた。さらには、近年、徳島大学との共同研究で、腎臓におけるNaPi IIa/IIc 二重欠損マウスではFGF23の産生が上昇していることなど、国際的に活発に解析を進めている。

2. 研究の目的

上記の我々の研究成果および他の研究グループの発表を踏まえて、本研究では「骨に無数に張りめぐらされている骨細胞・骨細管系が、骨基質ミネラルの調節・維持および骨リモデリングに対してどのような細胞学的作用を示すのか in vivo で解明することを目的とした。

3. 研究の方法

研究目的を達成するため、実験系をいくつかの項目に細分した（下記参照）

(1) 実験1：骨細管系の規則性と骨細胞産生

因子(FGF23)との組織化学的関連性

野生型マウスにおける骨細胞・骨細管系の規則性を鍍銀染色・アルカリフォスファターゼ（ALP）・酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRAP）の三重染色、DMP-1 および FGF23 の免疫染色、さらに、カルセイン投与による骨形成速度と鍍銀染色による骨細胞・骨細管系の規則性について解析を行った。

(2) 実験2：骨代謝異常マウスにおける骨細管系と骨細胞産生因子(スクレロスチン、FGF23, DMP-1)について

i) オステオプロテジェリン（osteoprotegerin: OPG）遺伝子欠損マウスを材料に、DMP-1 とスクレロスチン（sclerostin）の産生局在を骨細胞・骨細管系との比較で検索を行った。

ii) klotho 遺伝子欠損マウスを材料に、骨細胞の微細構造と DMP-1、FGF23、スクレロスチンの局在を検討するとともに、未脱灰切片を用いた透過型電子顕微鏡解析を行った。

(3) 実験3：骨細胞による周囲基質ミネラルの溶出に関する微細構造学的研究

(2)までの研究成果の結果（次項を参照）、骨細胞性骨溶解の可能性が高いと判断された。従って、野生型マウスおよび破骨細胞の骨吸収が行われない c-src 遺伝子欠損マウスの外頸静脈に 40mg/kg human PTH(1-34) を投与し、数時間後の骨小腔とその周囲の骨基質を解析した。

4. 研究成果

(1) 実験1：骨細管系の規則性と骨細胞産生因子(FGF23)との組織化学的関連性

鍍銀染色・アルカリフォスファターゼ（ALP）・酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRAP）の三重染色によって、骨改造の指標である骨芽細胞（ALP）と破骨細胞（TRAP）を染め分けながら、その場における骨細胞・骨細管系の配列を組織化学的に解明した。その結果、骨が形成されているが、比較的幼弱である骨

幹端の一次骨梁の領域では、骨細胞・骨細管系の規則性は悪く、基質内部に存在する軟骨基質が障壁となるため、骨細胞の突起による連結性は著しく低下していることが明らかとなった。一方、成熟骨である皮質骨では、骨細胞の細胞体は骨の長軸方向に配列しており、細胞突起を骨表面に対して垂直に伸ばすなど幾何学的にも高度の規則性を有していた(図1)。

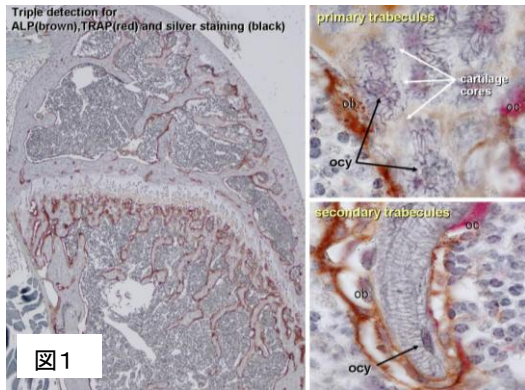


図1

以上を踏まえた上で、FGF23 と DMP-1 の産生を免疫組織化学で行ったところ、DMP-1 は骨細胞・骨細管系の規則性にかかわらず、骨細胞(骨小腔)および骨細管に局在したが、FGF23 は骨細管系が規則的な皮質骨では多量に産生されていたが、骨細管系が不規則な一次骨梁ではほとんど認めなかった(図2)。

このことは、循環系にのって腎臓におけるリン再球種を抑制する FGF23 は、成熟した骨、すなわち皮質骨から主に産生されること、また、このことは、骨梁の骨細胞ではなく、成熟骨の骨細胞が全身のリン濃度調節に関与していることを強く示唆していると推測された。

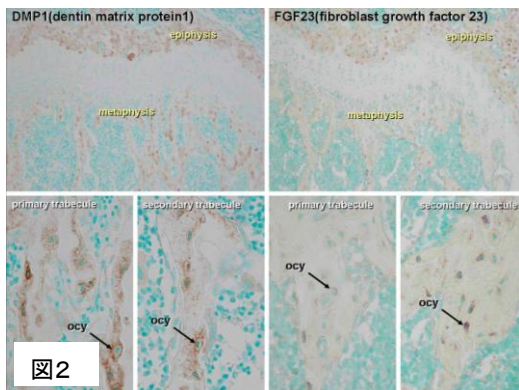


図2

(2)実験2: 骨代謝異常マウスにおける骨細管系と骨細胞産生因子(スクレロスタチン, FGF23, DMP-1)について

i) オステオプロテジェリン(osteoprotegerin: OPG)遺伝子欠損マウスを用いた解析

オステオプロテジェリン(OPG)欠損マウスでは、破骨細胞の分化・形成および骨吸収活性が亢進していること、また、それに伴って骨芽細胞による骨形成活性も上昇していることを、我々は明らかにしている(Amizuka et al., J Electron Microscopy, 2003)。本研究では、鍍銀染色により、OPG 欠損マウスのような骨改造が活発に行われた骨基質では、非常に不規則な骨細胞・骨細管系が観察されること、また、骨細管系が分断化されるために骨細胞が障害を受けている像も観察された。この活発な骨改造は皮質骨にも及んでおり、正常では整然とした規則正しい骨細管系であるのに対して、OPG 欠損マウスでは不規則な骨細管系が認められた。しかし、不規則な骨細管系にも関わらず、DMP-1 の産生には影響がでないこと、一方、骨芽細胞を抑制するスクレロスタチンは産生が低下しており、そのような骨細胞周囲の骨表面では多数の活性型骨芽細胞と破骨細胞を観察した。

ii) klotho 遺伝子欠損マウスを用いた解析

Klotho 遺伝子欠損マウスは、以前の申請者の検索で骨基質ミネラルが溶出してしまっていることを報告したが(Suzuki, Amizuka et al., J Anat, 2008)、その理由は未解明のままであった。今回、微細構造学的に検索したところ、骨細胞は骨小腔内に不定形構造物を含ませていること、免疫電顕で確認したところ、それは多量の DMP-1 であることが明らかとなった。ところが、多量の DMP-1 が産生されている骨小腔内部には、骨基質石灰化結晶が侵入しており、骨細胞が傷害されている像を観察することができた。さらに、骨細胞が障害されたり、細胞残渣となり石灰化基質で埋め尽くされたしまった領域の骨基質には、石灰化結晶が溶出してしまう傾向が認められた(図3)。これらの解析により、klotho 欠損状態では、骨細胞が多量の DMP-1 を産生するため、そこに石灰化結晶が誘導されて骨細胞が障害・細胞死を受けること、また、その領域の骨基質におけるミネラル維持が不可能になることが強く示唆された。

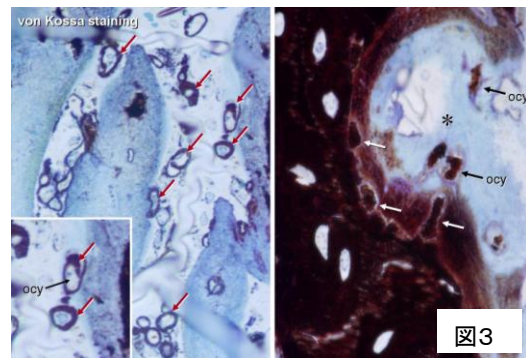
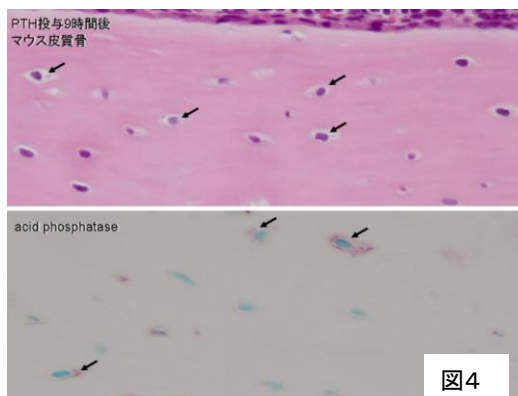


図3

(3) 実験3：骨細胞による周囲基質ミネラルの溶出に関する微細構造学的研究

1960年代に Bélanger は副甲状腺ホルモン(PTH)投与後の骨細胞性骨溶解を報告しており、骨細胞による直接的な基質ミネラル調整が示唆されたが、これまでに一致した見解がなされていない。しかし、我々の近年の報告(研究成果(1)および(2))から、少なくとも骨細胞が骨基質ミネラルの維持・調節を行っていると考えられ、その有無を明らかにする必要が生じた。ところが、成熟骨では規則的配列を示す骨細管系が、幼弱骨では不規則な骨細管系が発達しており、骨細胞機能に関しては成熟骨と幼弱骨を区別して検索する必要があると思われる。そこで我々は、野生型マウスおよびc-src遺伝子欠損マウスを用いて、PTHを外頸静脈から直接投与し、数時間後の皮質骨および骨幹端骨梁の骨細胞の変化について組織化学的に解析した。

その結果、PTH投与6時間後の皮質骨骨細胞では骨小腔の拡大が観察され、その周囲にはvon Kossa陽性を示さない未石灰化骨基質が局在した。一方、PTH投与後の骨幹端部骨梁では骨小腔の拡大は認められなかった。PTH投与後の皮質骨骨細胞には酸性フォスファターゼ活性が検出されるとともに(図4)、腎臓型 vacuolar H⁺-ATPase の d2 サブユニット陽性反応を観察したが、破骨細胞に特異的な a3 サブユニットは認めなかった。またPTH投与後の皮質骨骨細胞にはFGF23強陽性反応が観察された。以上より、皮質骨の骨細胞は、PTH投与により破骨細胞とは異なる機序によって周囲の骨基質溶解を行うことが推測され、骨基質ミネラル調節を積極的に行っている可能性が示唆された。現在、c-src遺伝子欠損マウスでも同様の所見を得ているが、匹数を増やすため、現在も継続して解析中である。



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 18 件)

1. Hongo H., Hasegawa T., Sasaki M., Suzuki R., Yamada T., Shimoji S., Yamamoto T., Amizuka N.: Bone-Orchestrating Cells, Osteocytes. *Hokkaido Journal of Dental Science*. 32:93-103, 2012.
2. Yamamoto T., Hasegawa T., Sasaki M., Hongo H., Guo Y., Tabata C., Liu Z., Li M., Amizuka N.: Structure and formation of the twisted plywood pattern of collagen fibrils in rat lamellar bone. *J Electron Microsc.* 61: 113-121, 2012.
3. Amizuka N., Hasegawa T., Oda K., Freitas PHL., Hoshi K., Li M., Ozawa H.: Histological aspects of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification. *Front Biosci*. E4:2085-2100, 2012.
4. Amizuka N., Hongo H., Sasaki M., Hasegawa T., Suzuki R., Tabata C., Ubaidus S., Masuki H., Guo Y., Freitas PHL., Oda K., Li M.: The distribution of osteocytic lacunar-canalicular system, and immunolocalization of FGF23 and sclerostin in osteocytes. *J Oral Biosci*. 54: 37-42, 2012.
5. Haga M., Nozawa-Inoue K., Li M., Oda K., Yoshie S., Amizuka N., Maeda T.: A morphological analysis on the osteocytic lacunar canalicular system in bone surrounding dental implants. *Anat Rec*. 294(6):1074-1082, 2011.
6. Freitas PHL., Hasegawa T., Takeda S., Sasaki M., Tabata C., Oda K., Li M., Saito H., Amizuka N.: Eldecalcitol, a second-generation vitamin D analog, drives bone minimodeling and reduces osteoclastic number in trabecular bone of ovariectomized rats. *Bone*. 49(3):335-342, 2011.
7. Hasegawa T., Li M., Hara K., Sasaki M., Tabata C., Freitas PHL., Hongo H., Suzuki R., Kobayashi M., Inoue K., Yamamoto T., Oohata N., Oda K., Akiyama Y., Amizuka N.: Morphological assessment of bone mineralization in tibial metaphyses of ascorbic acid-deficient ODS rats. *Biomed Res*. 32(4):259-269, 2011.
8. Kii I., Nishiyama T., Li M., Matsumoto K., Saito M., Amizuka N., Kudo A.: Incorporation of tenascin-C into the

- extracellular matrix by periostin underlies an extracellular meshwork architecture. *J Biol Chem*. 285(3):2028-2039, 2010.
9. Li M., Seki Y., Freitas PHL., Nagata M., Kojima T., Sultana S., Ubaidus S., Maeda T., Shimomura-Kuroki J., Henderson J., Tamura M., Liu Z., Guo Y., Yamamoto T., Oda K., Takagi R., Amizuka N.: FGFR3 down-regulates PTH/PTHrP receptor gene expression by mediating JAK/STAT signaling in chondrocytic cell line. *J Electron Microsc.* 59(3):227-236, 2010.
 10. Narimatsu K., Li M., Freitas PHL., Sultana S., Ubaidus S., Kojima T., Liu Z., Guo Y., Suzuki R., Yamamoto T., Oda K., Amizuka N.: Ultrastructural observation on cells meeting the histological criteria for preosteoblasts – a study in the mouse tibial metaphysis. *J Electron Microsc.* 59(5):427-436, 2010.
 11. Tanabe H., Takayama I., Nishiyama T., Shimazaki M., Kii I., Li M., Amizuka N., Katsube K., Kudo A.: Periostin associates with Notch1 precursor to maintain Notch1 expression under a stress condition in mouse cells. *PLoS ONE*. 5(8): e12234, 2010.
 12. Li M., Hasegawa T., Masuki H., Liu Z., Guo Y., Suzuki R., Yamamoto T., Freitas PHL., Amizuka N.: Ultrastructural Assessment of Mineral Crystallization and Collagen Mineralization in Bone. *J Oral Biosci*. 52(2):94-99, 2010.
 13. Masuki H., Li M., Hasegawa T., Suzuki R., Guo Y., Liu Z., Oda K., Yamamoto T., Kawanami M., Amizuka N.: Immunolocalization of DMP1 and sclerostin in the epiphyseal trabecule and diaphyseal cortical bone of osteoprotegerin deficient mice. *Biomed Res*. 31(5):307-318, 2010.
 14. Segawa H., Onitsuka A., Kuwahata M., Hanabusa E., Furutani J., Kaneko I., Tomoe Y., Aranami F., Matsumoto N., Ito M., Matsumoto M., Li M., Amizuka N., Miyamoto K.: Type IIc sodium-dependent phosphate transporter regulates calcium metabolism. *J Am Soc Nephrol*. 20(1):104-113, 2009.
 15. Segawa H., Onitsuka A., Furutani J., Kaneko I., Aranami F., Matsumoto N., Tomoe Y., Kuwahata M., Ito M., Matsumoto M., Li M., Amizuka N., Miyamoto K.: Npt2a and Npt2c in mice play distinct and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. *Am J Physiol Renal Physiol*. 297(3):F671-678, 2009.
 16. Ubaidus S., Li M., Sultana S., de Freitas PH., Oda K., Maeda T., Takagi R., Amizuka N.: FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *J Electron Microsc.* 58(6):381-392, 2009.
 17. Freitas PHL., Li M., Ninomiya T., Nakamura M., Ubaidus S., Oda K., Udagawa N., Maeda T., Takagi R., Amizuka N.: Intermittent PTH administration stimulates pre-osteoblastic proliferation without leading to enhanced bone formation in osteoclast-less c-fos(-/-) mice. *J Bone Miner Res*. 24(9):1586-1597, 2009.
 18. Amizuka N., Li M., Hara K., Kobayashi M., de Freitas PH., Ubaidus S., Oda K., Akiyama Y.: Warfarin administration disrupts the assembly of mineralized nodules in the osteoid. *J Electron Microsc.* 58(2):55-65, 2009.
- [学会発表] (計 10 件)
1. Amizuka N., Hongo H., Sasaki M., Hasegawa T.: 骨細胞の細胞生理学における形態学的アプローチ. 大会企画シンポジウム「骨形成と骨吸収の先端研究から探る、骨修復促進のストラテジー」第 89 回日本生理学会大会 長野県松本文化会館 (松本) 2012 年 3 月 29 日-31 日
 2. 網塚憲生: 骨細胞機能における形態学的アプローチ. Meet-the-experts 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 大阪国際会議場 (大阪) 2011 年 7 月 28-30 日 プログラム抄録集:38, 2011.
 3. 網塚憲生、長谷川智香、佐々木宗輝、田幡千尋、山本恒之、李 敏啓、和田悟史: 骨細胞の機能における形態学的知見. シンポジウム「骨基質ミネラル調節における生理学と形態学。」第 88 回日本生理学会大会第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会 パシフィコ横浜会議センター(横浜) 2011 年 3 月 30 日 プログラム 2011:143, 2011.
 4. Amizuka N.: Invited speaker Histological assessment for the biological functions of PTH and PTHrP in skeletal tissue. Research Unit of Metabolic bone disease in Korean Endocrine Society, Pusan, Korea, 2011.7.22-24, Program & Abstracts:23-36, 2011.
 5. Sasaki M., Tabata C., Hasegawa T., Li M.,

- Yamamoto T., Inoue N., Amizuka N.: Histochemical examination on the distribution of DMP-1, MGP and osteocalcin in *klotho*^{-/-} mice. The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, 2011.9.16-20, Program & Abstracts: 258, 2011.
6. Haga M., Nozawa-Inoue K., Li M., Yoshie S., Amizuka N., Maeda T.: Long-term response of the bone to the titanium implant in the rat maxilla. The 6th Congress of the Asian Academy of Osseointegration, Seoul, Korea, 2010.11.12-14, AAO 2010 Program & Abstracts:172-173, 2010.
7. 佐々木宗輝、李 敏啓、増木英郎、長谷川智香、田幡千尋、織田公光、山本恒之、井上農夫男、網塚憲生: *Klotho* 遺伝子欠損マウスの脛骨骨端部における骨細胞産生蛋白の局在について. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 タワーホール船堀(東京) 2010 年 9 月 20-22 日 *J Oral Biosci.* 52(suppl):104, 2010.
8. 増木英郎、李 敏啓、郭 穎、長谷川智香、柳 鑄晟、鈴木礼子、織田公光、山本恒之、川浪雅光、網塚憲生: オステオプロテジェリン遺伝子欠損マウスにおける骨細胞産生蛋白の局在. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 タワーホール船堀(東京) 2010 年 9 月 20-22 日 *J Oral Biosci.* 52(suppl):147, 2010.
9. Amizuka N., Li M., Freitas PHL., Liu Z., Guo Y., Suzuki R., Yamamoto T.: Histological assessment for PTH/PTHrP signaling on osteoblasts. 14th international congress of endocrinology (ICE 2010), Kyoto, Japan, 2010.3.26-30, Program & Abstracts:S244-245, 2010.
10. Amizuka N.: Histological assessment for biological function of osteocytic lacunar-canalicular system. 連携機能を活用した口腔からQOL向上を目指す連携研究・国際シンポジウム, Niigata, Japan, 2010.2.9.

[図書] (計 4 件)

1. 長谷川智香、本郷裕美、佐々木宗輝、山田珠希、網塚憲生: 「骨転移のバイオオロジーとマネージメント」 編者:米田俊之 医薬ジャーナル社 東京 印刷中
2. 網塚憲生: 口腔科学「骨の解剖生理」(監修:戸塚靖則、高戸 毅) 朝倉書院 東京 印刷中
3. 網塚憲生: 骨組織 「トートラ解剖学 第 2

版」(監訳:小澤一史、千田隆夫、高田邦明、佐藤 宏) 丸善株式会社 東京 pp.148-171, 2010.

4. 網塚憲生: 電子顕微鏡; 蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡; 免疫組織化学と組織化学 「口腔組織・発生学 第1版第3刷」 医歯薬出版株式会社 東京 pp.382-392, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://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・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 30242431

(2) 研究分担者 (2009 年-2010 年)

李 敏啓 (LI MINQI)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 60447612

(3) 連携研究者

織田 公光 (ODA KIMIMITSU)
新潟大学・大学院歯学総合研究科・教授
研究者番号: 10122681

宇田川 信之 (UDAGAWA NOBUYUKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70245801