

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16928

研究課題名(和文)骨細胞ネットワークによる骨基質石灰化の制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Assessment for the regulatory mechanism of osteocyte network on bone mineralization

研究代表者

本郷 裕美 (Hongo, Hiromi)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：00778970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：高Pi・高Ca血症を示すkl/klマウスおよび糖尿病モデルであるSDT fattyラットを用いて、骨細胞ネットワークによる骨基質石灰化制御について解析した。kl/klマウスの骨細胞は石灰化抑制機能を持つSIBLING family蛋白であるDMP-1、osteopontin陽性反応が観察され、SDT fattyラットの骨細胞はDMP-1だけでなくosteocalcinも陽性を示し、ともに未石灰化基質が観察された。以上より、病的状態によって骨細胞・骨細胞管系の機能が破綻すると、骨基質における石灰化維持やミネラルバランス調節が異常をきたすことから、骨細胞は骨基質石灰化に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに骨細胞が基質小胞性石灰化を積極的に調整してゆくという概念について明確に述べた論文や研究はなく、本研究は骨細胞ネットワークがDMP-1やosteocalcinなどのリン酸カルシウム結晶結合蛋白の分泌制御を中心に、基質小胞性石灰化に関与する可能性を強く示唆している。また、石灰化異常に関する病態はくる病・骨軟化症だけでなく、低ホスファターゼ症や腎疾患などに付随する異所性石灰化・心血管イベントなど多岐にわたって認められる現象であり、これらの病態を解明・改善する一助となる研究といえる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the regulation of bone matrix calcification by osteocytic networks in hyperphosphatemic/hypercalcemic kl/kl mice and diabetic model SDT fatty rats. Osteocytes of kl/kl mice showed positivity of DMP-1 and osteopontin, a SIBLING family protein with a calcification inhibitory function, osteocytes from SDT fatty rats revealed immunoreactivity of not only DMP-1 but also osteocalcin and showed unmineralized bone matrix in both groups. Thus it suggested that osteocytes were involved in the calcification of bone matrix, since the disruption of the osteocytic lacunae-canalicular system due to pathological conditions results in abnormal calcification maintenance and mineral balance regulation in the bone matrix.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨基質石灰化 骨細胞 基質小胞性石灰化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 骨細胞ネットワークによる骨基質石灰化の制御メカニズムの解明

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であり、骨小腔という空間に存在している。骨細胞は細胞突起を伸ばし、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)を形成する。さらに、骨細胞は血中リン濃度を低下させる FGF23 や sclerostin 分泌、結晶性カルシウムと結合して石灰化を促進させる DMP-1 産生、Rankl を介して骨代謝調節を行っている注目すべき細胞である。

一方、骨芽細胞は骨基質表面に局在する細胞であり、Ⅰ型コラーゲンのほか、osteocalcin、osteopontin、骨シアロタンパク質などの非コラーゲン性タンパク質や、デコリンやプロテオグリカンなどの骨基質タンパクを合成、分泌し、さらに基質小胞を分泌することで骨基質石灰化が開始し、基質小胞内部で形成されたリン酸カルシウム結晶塊が外界に露出することで、周囲のコラーゲン線維に石灰化を波及させていく。

申請者はこれまでに、PTH 投与によって皮質骨に存在する骨細胞周囲の骨基質が一過性に溶解する現象である骨細胞性骨溶解が起こりえること、またその後、一時的に拡大した骨小腔周囲には Ca 沈着が起こることを明らかにすることで、骨細胞ネットワークが骨基質ミネラル Ca/Pi 維持に関与することを報告してきた。加えて、申請者は同位体顕微鏡(isotope microscopy)を用いて、骨基質における Ca の安定同位体元素の元素マッピング解析を実施している。

これまでの申請者の研究結果より、骨芽細胞は基質小胞を分泌し、それに付随した酵素・膜輸送体などで、ある程度の石灰化は誘導されるが、その後の Ca/Pi 輸送・供給、膜輸送体・酵素活性の変遷、結晶性カルシウム結合タンパクによる石灰化調節は骨細胞が積極的に関与するのではないかという、学術的可能性があると推察した。

### 2. 研究の目的

本研究における「骨細胞が基質小胞性石灰化を積極的に調節していく」という概念を明確に述べた論文や、それを *in vivo* で証明した確固たる所見や論文は報告されていない。成熟した緻密骨では、骨細胞ネットワークの細胞突起は骨芽細胞と連絡しているが、石灰化が誘導される類骨層(オステオイド)では、骨細胞の細胞突起は骨細管から類骨層へと開放されており、このことは骨細胞ネットワークからの Ca/Pi 供給が類骨層に向けてなされていることが推測される。

骨細胞は、ピロリン酸(Pi: 石灰化抑制)を合成する ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP)発現を上昇する一方で、アルカリホスファターゼ(ALPase)が急激に低下するなど、過剰な石灰化を制御する可能性、また Ca/Pi 輸送に関与する可能性を有している。骨芽細胞直下の類骨層には石灰化骨基質の骨細管が開口し、骨細胞からの細胞突起が露出するため、類骨層では、骨芽細胞からだけでなく、骨細胞・骨細管系からのタンパク質・ミネラル輸送を受ける可能性が高いと思われる。

さらに、血糖値(インシュリン産生)に応じて、骨細胞が osteocalcin 産生を亢進することが報告されており、骨細胞が骨石灰化を積極的に調節する可能性が示唆されている。そこで、本研究では、骨細胞が骨小腔や骨細管周囲の石灰化だけでなく、基質小胞性石灰化を調節する可能性を明らかにすることを目的と定めた。

### 3. 研究の方法

以下のマウスを用いて、組織化学的・微細構造学的に解析した。

(1) 高 Ca 血症・高 Pi 血症を示す *k1/k1* マウスおよび低 Ca・低 Pi 餌給餌マウス 4~7 週齢の *k1/k1* マウスに普通食と塩酸セベラマーを加えた低リン食を給餌した。

(2) 糖尿病モデルである SDT fatty ラット

約 8 週齢で糖尿病を発症し、早期に糖尿病性眼疾患・腎疾患といった種々の合併症を示し、40 週齢以降で骨密度の低下をきたすことから生後 42 週齢の SDT fatty ラットおよびコントロールとして同週齢の SD ラットを用いた。

これらのマウスの大腿骨・脛骨を摘出し、PFA にて固定後、必要に応じてパラフィン包埋、エポキシ樹脂包埋した。それぞれ切片を作製し、H-E 染色、各種免疫組織化学(ALP、Podoplanin、ENPP-1、DMP-1、osteocalcin) von Kossa 染色、透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscopy: TEM) 遺伝子発現を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 高 Ca 血症・高 Pi 血症を示す *kl/kl* マウスおよび低 Ca・低 Pi 餌給餌マウス

*kl/kl* マウスに塩酸セベラマーを加えた低リン食を給餌し、吸収されるリンの量を少なくした状態における骨を組織化学的に検索した。通常食において、*kl/kl* マウスは体長が短い、低リン食給餌により野生型と同程度まで回復する(図1)。

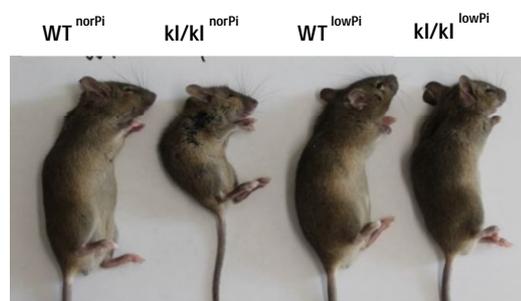


図 1

H-E 染色にて観察すると、*kl/kl* マウス通常食群では空の骨小腔が増加しており、石灰化制御に関与する DMP-1 の免疫染色を行うと、骨細胞に DMP-1 強陽性反応が観察された(図2)。さらに、骨細胞の初期マーカーである podoplanin と骨芽細胞のマーカーである ALP の二重染色を行うと、podoplanin 陽性反応が骨細胞のみならず、骨表面の骨芽細胞にも観察されたことから、骨芽細胞から骨細胞への早熟な分化が推測された。このような骨基質の石灰化を観察すると、*kl/kl* マウス通常食群では青色に染まる未石灰化骨基質が広範囲にわたって広がり、その中には石灰化を受けた骨細胞が埋め込まれていた(図3)。

一方、*kl/kl* マウス低リン食給餌群では、空の骨小腔は減少し、骨細胞の DMP-1 強陽性反応は野生型と同程度になり、骨基質石灰化は改善することがわかった。

#### 通常食・低リン食給餌 *wild-type*, *kl/kl* マウス大腿骨の組織学的変化

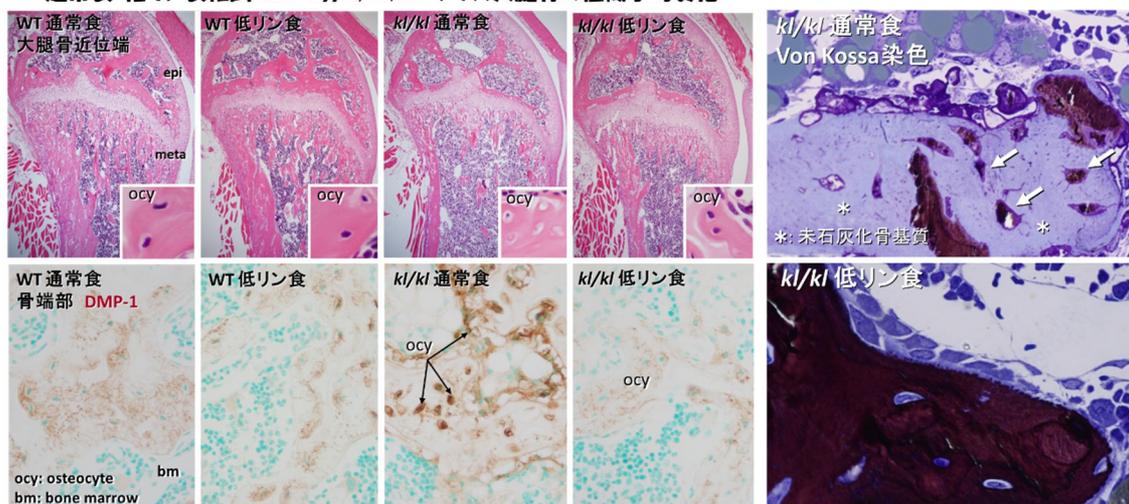


図 2

図 3

次に局所のリン酸イオン調節を担う ALP ならびに ENPP1 の免疫染色を行うと、*kl/kl* マウス通常食群は ALP 強陽性を示す骨芽細胞が一部で減弱し、一方で非常に強い ENPP1 陽性反応を認めることから、この部位では石灰化を抑制するピロリン酸の過剰産生が推察される。

このことから、骨芽細胞直下の基質小胞や石灰化球の形成について、透過型電子顕微鏡で観察すると、野生型マウスの活性型骨芽細胞直下の類骨層には多数の石灰化球が認められたのに対し、*kl/kl* マウス通常食では、骨芽細胞は基質小胞を形成するが、その後石灰化球の形成が進行せず、広く未石灰化領域が出現する可能性が示された(図4)。

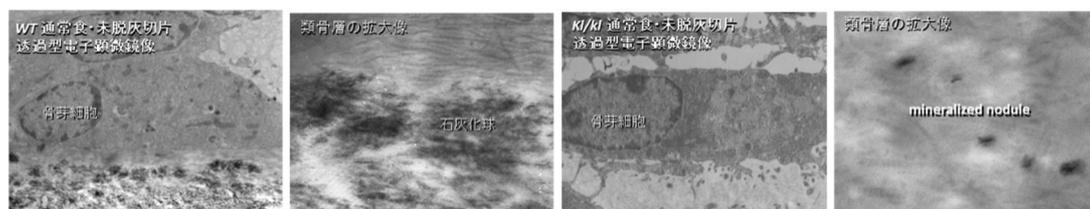


図 4

一方で、低リン食を給餌することで骨細胞が正常に機能し、石灰化異常が解消されることから、骨芽細胞が基質小胞を分泌するだけでなく、骨細胞からの骨基質石灰化調節因子の関与が重要であることが示唆された。

## (2) 糖尿病モデルである SDT fatty ラット

糖尿病モデルである SDT fatty ラットはコントロールである SD ラットと比較して骨梁が減少しており、糖尿病背骨粗鬆症を呈していた。そこで、骨組織を解析するために TRAP 染色および ALP 免疫染色を行うと、両群ともに成長軟骨直下に赤色で染色される TRAP 陽性破骨細胞が観察され（図 5）、骨表面に ALP 陽性骨芽細胞が観察された。

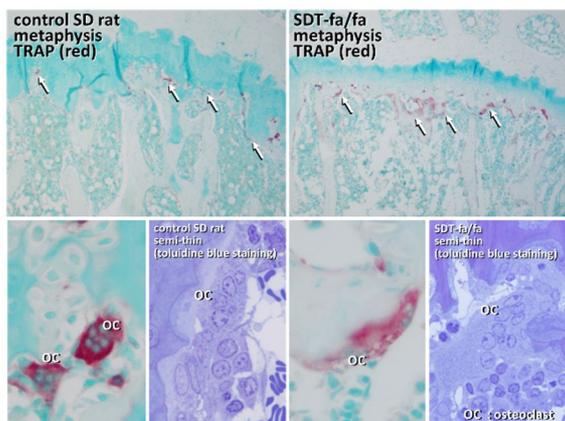


図 5

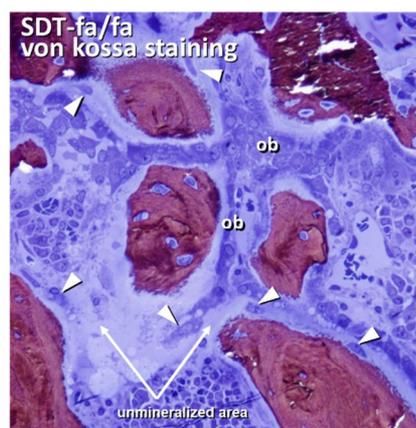


図 6

そこで骨の石灰化状態を検索すると SDT fatty ラットでは骨基質上に細胞体のふくよかな活性型骨芽細胞が局在するだけでなく、その直下には厚い未石灰化領域が形成されており、その中には多数の細胞が埋め込まれていた（図 6）。

骨基質石灰化に関する DMP-1 と osteocalcin を検索すると、SDT fatty ラットでは骨小腔周囲に DMP-1 が蓄積し、骨細管における陽性反応は減弱し、不均一となった（図 7）。同様に osteocalcin も SDT fatty ラットの骨小腔において強い陽性反応を示した（図 8）。

したがって SDT fatty ラットにおいて、高血糖によりインシュリン高値が骨細胞に作用して osteocalcin や DMP-1 の発現を上昇させ、骨の石灰化に影響を与えている可能性が示唆された。

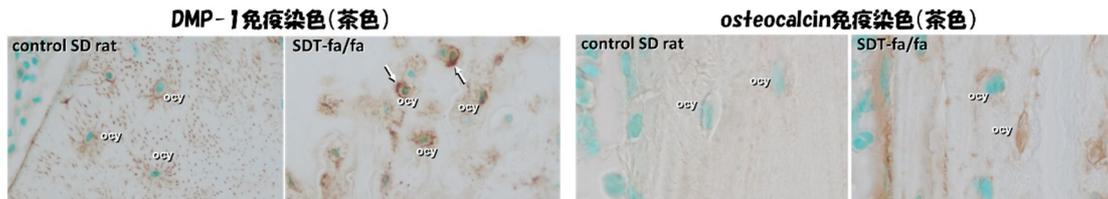


図 7

図 8

以上より、骨基質石灰化は、骨芽細胞が分泌した基質小胞から石灰が開始されるが、その後、基質小胞が石灰化球に成長し、石灰化を誘導するには骨細胞が分泌する骨基質タンパクが重要な役割を担っており、骨細胞分泌蛋白の骨小腔への蓄積・不均一な局在は骨石灰化を阻害することから、骨細胞は積極的に基質小胞性石灰化に関与している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 9件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Yokoyama Ayako, Hasegawa Tomoka, Hiraga Toru, Yamada Tamaki, Yimin, Hongo Hiromi, Yamamoto Tomomaya, Abe Miki, Yoshida Taiji, Imanishi Yasuo, Kuroshima Shinichiro, Sasaki Muneteru, de Freitas Paulo Henrique Luiz, Li Minqi, Amizuka Norio, Yamazaki Yutaka	4. 巻 39
2. 論文標題 Altered immunolocalization of FGF23 in murine femora metastasized with human breast carcinoma MDA-MB-231 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 810～823
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-021-01220-7	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 HASHIMOTO Keiji, HASEGAWA Tomoka, YAMAMOTO Tomomaya, HONGO Hiromi, IMIN Y, ABE Miki, NASOORI Alireza, NAKANISHI Ko, MARUOKA Haruhi, MORIMOTO Yasuhito, KUBOTA Keisuke, SHIMIZU Tomohiro, HARAGUCHI Mai, TAKAHATA Masahiko, IWASAKI Norimasa, LI Minqi, FUJISAWA Toshiaki, AMIZUKA Norio	4. 巻 42
2. 論文標題 Histological observation on the initial stage of vascular invasion into the secondary ossification of murine femoral epiphyseal cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 139～151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.42.139	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 Yamamoto Tomomaya, Hasegawa Tomoka, Mae Takahito, Hongo Hiromi, Yamamoto Tsuneyuki, Abe Miki, Nasoori Alireza, Morimoto Yasuhito, Maruoka Haruhi, Kubota Keisuke, Haraguchi Mai, Li Minqi	4. 巻 63
2. 論文標題 Comparative immunolocalization of tissue nonspecific alkaline phosphatase and ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 in murine bone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 259～264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2021.08.001	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 Yamamoto Tsuneyuki, Takahashi Shigeru, Hasegawa Tomoka, Hongo Hiromi, Amizuka Norio	4. 巻 64
2. 論文標題 Morphological variety of capillary ends invading the epiphyseal plate in rat femora using scanning electron microscopy with osmium maceration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 346～351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2022.04.006	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 Maruoka Haruhi, Hasegawa Tomoka, Yoshino Hirona, Abe Miki, Haraguchi-Kitakamae Mai, Yamamoto Tomomaya, Hongo Hiromi, Nakanishi Ko, Nasoori Alireza, Nakajima Yuhi, Omaki Masayuki, Sato Yoshiaki, Luiz de Freitas Paulo Henrique, Li Minqi	4. 巻 64
2. 論文標題 Immunolocalization of endomucin-reactive blood vessels and -smooth muscle actin-positive cells in murine nasal conchae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 337 ~ 345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.05.001	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 Moritani Yasuhito, Hasegawa Tomoka, Yamamoto Tomomaya, Hongo Hiromi, Yimin, Abe Miki, Yoshino Hirona, Nakanishi Ko, Maruoka Haruhi, Ishizu Hotaka, Shimizu Tomohiro, Takahata Masahiko, Iwasaki Norimasa, Li Minqi, Tei Kanchu, Ohiro Yoichi, Amizuka Norio	4. 巻 64
2. 論文標題 Histochemical assessment of accelerated bone remodeling and reduced mineralization in Il-6 deficient mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 410 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.10.001	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 Hongo Hiromi, Yokoyama Ayako, Yamada-Sekiguchi Tamaki, Yamamoto Tomomaya, Yoshino Hirona, Abe Miki, Haraguchi-Kitakamae Mai, Luiz de Freitas Paulo Henrique, Hasegawa Tomoka, Li Minqi	4. 巻 64
2. 論文標題 Histochemical assessment on osteocytic osteolysis in lactating mice fed with a calcium-insufficient diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 422 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.09.003	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 Maruoka Haruhi, Yamamoto Tomomaya, Zhao Shen, Hongo Hiromi, Abe Miki, Ishizu Hotaka, Yoshino Hirona, Luiz de Freitas Paulo Henrique, Li Minqi, Hasegawa Tomoka	4. 巻 64
2. 論文標題 Histological functions of parathyroid hormone on bone formation and bone blood vessels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 279 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.08.002	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 Tomoka, Hongo Hiromi, Yamamoto Tomomaya, Abe Miki, Yoshino Hirona, Haraguchi-Kitakamae Mai, Ishizu Hotaka, Shimizu Tomohiro, Iwasaki Norimasa, Amizuka Norio	4. 巻 23
2. 論文標題 Matrix Vesicle-Mediated Mineralization and Osteocytic Regulation of Bone Mineralization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9941 ~ 9941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23179941	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森本康仁、長谷川智香、本郷裕美、久保田恵亮、阿部未来、丸岡春日、吉田靖弘、菅谷勉、網塚憲生
2. 発表標題 リン酸三カルシウム (TCP) およびリン酸化プルラン (PPL) 含有新規骨補填材を用いた骨再生 .
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田恵亮、長谷川智香、本郷裕美、森本康仁、阿部未来、丸岡春日、吉田靖弘、横山敦郎、網塚憲生
2. 発表標題 リン酸化多糖体とTCP混合補填材を用いたインプラント周囲骨再生における組織学的検索 .
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川智香、山本知真也、本郷裕美、小守壽文、網塚憲生
2. 発表標題 型コラーゲンプロモーターを用いた組織非特異的アルカリフォスファターゼ過剰発現マウス大腿骨骨端軟骨における石灰化抑制について .
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島悠斐、山本知真也、本郷裕美、網塚憲生、長谷川智香
2. 発表標題 PTH間歇投与マウス大腿骨におけるpodoplanin/PHOSPHO1陽性骨芽細胞の局在.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本康仁、長谷川智香、山本知真也、本郷裕美、久保田恵亮、吉田靖弘、菅谷 勉、網塚憲生
2. 発表標題 リン酸三カルシウム(TCP)およびリン酸化プルラン(PPL)含有新規骨補填材を用いた骨再生.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田恵亮、長谷川智香、山本知真也、本郷裕美、森本康仁、阿部未来、丸岡春日、吉田靖弘、横山敦郎、網塚憲生
2. 発表標題 リン酸化多糖体とTCP混合補填材を用いたインプラント周囲骨再生における組織学的検索.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本康仁、長谷川智香、本郷裕美、久保田恵亮、阿部未来、丸岡春日、吉田靖弘、菅谷 勉、網塚憲生
2. 発表標題 新規骨補填材リン酸化プルラン(PPL)周囲における骨再生.
3. 学会等名 第41回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋悠斐、山本知真也、本郷裕美、Nasoori Alireza、網塚憲生、長谷川智香
2. 発表標題 骨代謝回転状態によるpodoplanin/PHOSPHO1 陽性骨芽細胞の局在変化.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川智香、徳永 紳、山本知真也、本郷裕美、酒井まり子、網塚憲生
2. 発表標題 エボカルセトは骨細胞異常で誘導される皮質骨多孔化を抑制する：二次性副甲状腺機能亢進症の皮質骨多孔化はPTH-Piループで誘導される骨細胞性骨溶解と骨小腔石灰化抑制により発症する - エボカルセトによる皮質骨多孔化抑制の検討.
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川智香、徳永 紳、山本知真也、本郷裕美、酒井まり子、川田剛央、網塚憲生
2. 発表標題 エボカルセトは骨細胞異常で誘導される皮質骨多孔化を抑制する：二次性副甲状腺機能亢進症を伴う慢性腎臓病モデルラットを用いた動物実験.
3. 学会等名 第24回日本骨粗鬆症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本郷裕美、姚 斉、長谷川智香、網塚憲生
2. 発表標題 新規肥満2型糖尿病モデルSDT fatty ラットにおける骨組織の解析.
3. 学会等名 日本解剖学会第68回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中鉢奈都子、原田天乃、本郷裕美、菅谷 勉
2. 発表標題 水が湿潤したファイル到達不可根管における根管充填方法の違いがメタクリル酸エステル系接着性シーラーの根管充足性に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本歯科保存学会2022年度秋季学術大会（第157回）第24回日韓歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2022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