

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19585

研究課題名（和文）骨形成の新規様式ミニモデリング：骨細胞からの“ミニモデリングファクター”を探る

研究課題名（英文）Minimodeling - a novel manner of bone formation: Investigation of "minimodeling factors" from osteocytes

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ミニモデリングは、破骨細胞の骨吸収に依存せずに骨芽細胞を活性化させて骨形成を誘導する様式である。本研究では、卵巣摘出ラットに活性型ビタミンDアナログ（エルデカルシトール）を投与して、ミニモデリング部位を検索した。その結果、ミニモデリングの発生箇所・頻度は、骨幹端よりも骨端の骨梁で多いこと、骨端部の骨梁はメカニカルストレスを受けること、また、ミニモデリング部位ではスクレロスチン陽性骨細胞の割合が有意に低下することが示された。よって、エルデカルシトールのミニモデリング誘導作用は、メカニカルストレスを受ける部位でスクレロスチン産生を抑制することで生じると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミニモデリングは、骨リモデリングとは異なる様式で骨形成を誘導する。これまでに、抗スクレロスチン抗体がミニモデリングを誘導することが知られているが、本研究では、エルデカルシトールがメカニカルストレスのかかる部位においてスクレロスチン産生を有意に抑制して、ミニモデリングを誘導することから、ミニモデリング誘導因子としてメカニカルストレスが強く示唆された。今回の結果は、骨粗鬆症治療において、薬剤治療だけでなく運動療法も組み合わせることで効率的にミニモデリングを誘導し骨量増加につながる可能性が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have attempted to examine minimodeling-based bone formation in the epiphyses and metaphyses of the long bones of eldcalcitol (ELD)-administered ovariectomized (OVX) rats. ELD administration increased bone volume by minimodeling in OVX rats. The epiphyses, rather than metaphyses, of the ELD group showed significantly higher frequency of minimodeling-based bone formation. The epiphyseal trabeculae seem to receive the mechanical stress from the joint, when compared to metaphyseal trabeculae extended from the growth plate cartilage. The percentage of sclerostin-positive osteocytes was significantly reduced in the minimodeling-induced new bone in the epiphyses but not in the metaphyses of the ELD groups. Taken together, it seems likely that ELD could efficiently induce minimodeling-based bone formation in the epiphyseal trabeculae which would easily receive the mechanical stress from the joint.

研究分野：口腔組織学、微細構造学、骨代謝学

キーワード：ミニモデリング 骨細胞 骨リモデリング エルデカルシトール スクレロスチン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、活性型ビタミンDアナログであるエルデカルシトールが破骨細胞を抑制するとともに、局所的に隆起した新生骨が既存骨の上に形成されることを世界で初めて発見し、またそれは、以前にFrostが報告したミニモデリング minimodeling の様式で形成されることを見出した。肉眼レベルで認められるモデリング modeling (骨の形作り) はいわゆる macroscopic modeling と呼ばれるのに対して、顕微レベルのモデリングは microscopic modeling と呼ばれる。microscopic modeling の中でも、特に骨梁に誘導されるモデリングをミニモデリングという。

ミニモデリングは破骨細胞の骨吸収を伴わず、骨形成のみを誘導するといった理想的な骨形成様式を有するため、重篤な骨粗鬆症患者には大きな福音となる。一方、骨細胞から産生されるスクレロスタチンは骨芽細胞を抑制するが、スクレロスタチン抗体(ロモソズマブ)が骨粗鬆症治療薬として使用されており、その作用機序としてモデリングによる骨形成が報告されている(スクレロスタチン抗体は骨梁のミニモデリングだけでなく皮質骨のモデリングも誘導することが知られている)。ところが、エルデカルシトールとスクレロスタチンシグナルの遮断との関連性はいまだ明らかになっていない。さらに、エルデカルシトールで誘導されるミニモデリングは、骨のどの部位に誘導されやすいのか、また、スクレロスタチンとは異なる、どのような要因によって誘導されるのか、まだ解明に至っていない。

2. 研究の目的

ミニモデリングは、破骨細胞の骨吸収に依存せずに骨芽細胞を活性化させて骨形成を誘導する様式であるが、ミニモデリングの発生機序についてはいまだ明らかになっていない。ところで、骨端部の骨梁は関節面からのメカニカルストレスを受け骨強度に関与するが、骨幹端の骨梁は成長板軟骨から伸びだしており自由端となっていることから、メカニカルストレスに対する骨強度よりも骨成長に関与していると考えられる。そこで、本研究では、活性型ビタミンDアナログ(エルデカルシトール)を卵巣摘出ラットに投与して、骨幹端と骨端の骨梁におけるミニモデリングを比較解析することで、メカニカルストレスがミニモデリングの発生箇所・機序に及ぼす影響について検索を進めた。また現在、骨粗鬆症治療薬として、スクレロスタチン中和抗体であるロモソズマブが骨芽細胞を活性化させてモデリングを誘導することが知られている。そこで、メカニカルストレスの程度が異なる骨端骨梁と骨幹端骨梁においてスクレロスタチン産生抑制を解析することで、メカニカルストレスがミニモデリングを誘導するファクターの1つになっている可能性を検索した。

3. 研究の方法

本研究では、原発性骨粗鬆症モデルである卵巣摘出(OVX)ラットを作成し、そこに30ng/kgあるいは90ng/kgの濃度のエルデカルシトール(ELD)を投与した群(ELD群)、卵巣偽手術群(Sham群)、そして、OVX後にエルデカルシトールを投与しない対象群(OVX群)の3つのモデルラットを作成して、組織化学的に検索した。方法としては、生後6週齢の雌性Wistar-ImanichiラットにOVXを施し、同時に、30ng/kg(ELD30群)または90ng/kg(ELD90群)のエルデカルシトールを2か月にわたって投与した。また、固定6日前にカルセイン投与(6mg/kg)、2日前にテトラサイクリン投与(20mg/kg)を行った。medetomidine/midazolam/butorphanol3種混合麻酔のもと、これらラットの大腿骨・脛骨を摘出し、さらに骨端および骨幹端に分けてパラフィン包埋ならびにMMA包埋を行い、アルカリホスファターゼ(ALP)、スクレロスタチン、カテプシンK、ED1、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)などの組織化学解析を行った。また、骨密度、骨量(BV/TV)、骨梁幅(Tb.Th)、骨梁数(Tb.N)、ならびに、TRAP陽性破骨細胞数とALP陽性骨芽細胞数における骨形態計測を行った。さらに、骨端と骨幹端に分けてミニモデリングの発生頻度を組織学的・形態計測学的に解析するとともに、ミニモデリング部位におけるスクレロスタチン陽性・陰性骨細胞の統計解析を実施した。また、ミニモデリング部位における骨細胞ネットワークの配列における幾何学的な規則性について共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 卵巣摘出ラットにおける ELD 投与後の骨密度および骨形態計測解析

大腿骨における骨密度は、Sham 群に比べて OVX 群で有意に低下したが、ELD30 群・ELD90 群では OVX 群に比べて有意に上昇していた。脛骨の骨幹端における骨形態計測解析では、BV/TV ならびに Tb.N は、骨密度と同様に、Sham 群に比べて OVX 群で有意に低下したが、ELD30 群・ELD90 群では OVX 群に比べて有意に上昇していた(図 1)。しかし、骨端部における骨形態計測解析では、OVX を行っても BV/TV および Tb.N は低下せず、一方で、ELD30 群・ELD90 群では BV/TV と Tb.Th が Sham 群や OVX 群に比べて上昇していた(図 1)。このことは、TRAP 陽性破骨細胞数および ALP 陽性骨芽細胞領域の解析結果とも矛盾しておらず、骨幹端では OVX によって破骨細胞数が増加するが ELD 投与でその数が減少すること、しかし、ELD 投与後でも ALP 陽性骨芽細胞領域は有意に変わらなかったが、骨端部の ALP 陽性骨芽細胞領域は上昇する結果となった。この結果は、骨幹端と骨端では OVX による骨量変化が異なること、また、ELD による骨形成効果も異なることが示唆された。

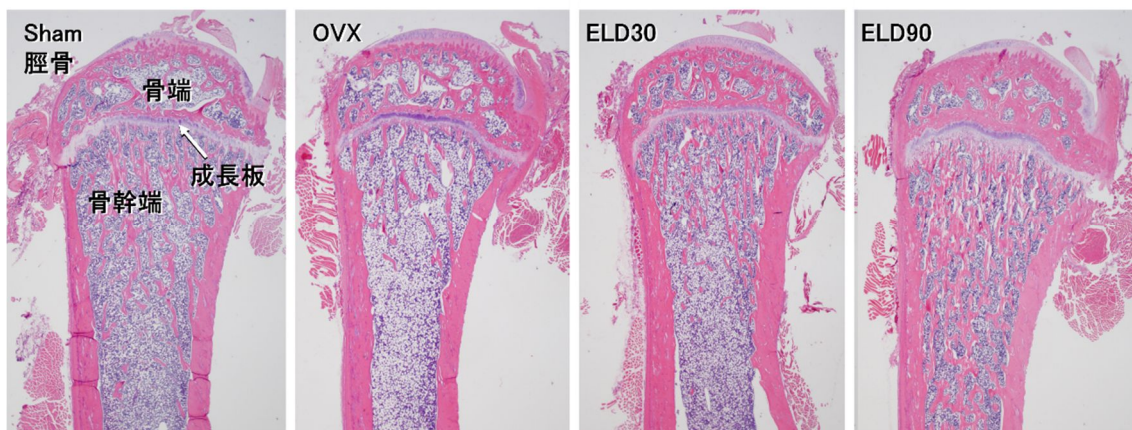


図1 Sham 群、OVX 群、ELD30 群、ELD90 群のラット脛骨における組織像

成長板直下の骨幹端骨梁を観察すると、Sham 群に比べて、OVX 群では減少しており、ELD30 群および ELD90 群では増加している。一方、骨端を観察すると、Sham 群、OVX 群では骨梁の数や太さに大きな違いは認められず、ELD90 群では太い骨梁が観察される。

(2) 卵巣摘出ラットにおける ELD 投与後のミニモデリングと骨リモデリング

骨幹端と骨端における remodeling-based bone formation (RBF)、および、minimodeling-based bone formation (MBF) をセメント線または休止線の存在、および、カルセイン・テトラサイクリン標識で識別することで、RBF と MBF 部位を同定し、それらの発生頻度について統計解析を行った。その結果、骨幹端の Sham 群と OVX 群では、RBF が MBF より有意に高く、また、ELD を投与しても RBF が MBF を上回っていた。ところが、骨端の Sham 群と OVX 群では RBF が MBF より高い値を示したが、ELD 投与では、MBF が RBF より有意に高い値を示した。この結果から、骨幹端よりも骨端において効率よく MBF を誘導することが示唆された。

(3) 卵巣摘出ラットにおける ELD 投与後のスクレロスチン陰性骨細胞について

さらに、RBF、ならびに、MBF 部位において、スクレロスチン産生抑制を解析するために、スクレロスチン陰性骨細胞の割合を統計解析した。その結果、骨幹端における MBF 領域のスクレロスチン陰性骨細胞の割合は、Sham 群、OVX 群、ELD 群でほとんど変わらなかったのに対して、骨端の MBF 領域のスクレロスチン陰性骨細胞の割合は、Sham 群で 45%ほど、OVX 群で 30%、ELD 群で 15%程度に減少していた (Sham 群と ELD90 群で有意差あり)。よって、骨幹端よりも骨端において ELD はスクレロスチンを効率的に抑制する可能性が示唆された。

それでは、何故、骨幹端よりも骨端において、ELD はスクレロスチン抑制を示すのか検討したところ、骨端は関節軟骨に繋がり、また、周囲の骨梁・皮質骨に連結していることから、関節におけるメカニカルストレスを直接受ける部位であること、一方で、骨幹端の骨梁は、成長板軟骨(ラットは終生、成長板軟骨を有する)から延びだしており自由端となっていることから、メカニカルストレスに対する骨強度よりも骨成長に関与することが推察された。

以上、これまでに、抗スクレロスチン抗体がミニモデリングを誘導することが知られているが、本研究では、それだけでなく、メカニカルストレスのかかる部位においてスクレロスチン産生が有意に抑制され、ミニモデリングが好発することから、ミニモデリング誘導因子としてメカニカルストレスが強く示唆された。よって、ミニモデリングは骨にかかる内部応力変化に対応した骨細胞ネットワークによる誘導が推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito Shizu, Hamai Ryo, Shiwaku Yukari, Hasegawa Tomoka, Sakai Susumu, Tsuchiya Kaori, Sai Yuku, Iwama Ryosuke, Amizuka Norio, Takahashi Tetsu, Suzuki Osamu	4. 巻 129
2. 論文標題 Involvement of distant octacalcium phosphate scaffolds in enhancing early differentiation of osteocytes during bone regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 309 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2021.05.017	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 -
1. 著者名 Takahata Masahiko, Shimizu Tomohiro, Yamada Satoshi, Yamamoto Tomomaya, Hasegawa Tomoka, Fujita Ryo, Kobayashi Hideyuki, Endo Tsutomu, Koike Yoshinao, Amizuka Norio, Todoh Masahiro, Okumura Jun-ichiro, Kajino Tomomichi, Iwasaki Norimasa	4. 巻 40(4)
2. 論文標題 Bone biopsy findings in patients receiving long-term bisphosphonate therapy for glucocorticoid-induced osteoporosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 613 ~ 622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-022-01323-9	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 -
1. 著者名 Yamamoto Tomomaya, Hasegawa Tomoka, Freitas Paulo Henrique Luiz de, Hongo Hiromi, Zhao Shen, Yamamoto Tsuneyuki, Nasoori Alireza, Abe Miki, Maruoka Haruhi, Kubota Keisuke, Morimoto Yasuhito, Haraguchi Mai, Shimizu Tomohiro, Takahata Masahiko, Iwasaki Norimasa, Li Minqi, Amizuka Norio	4. 巻 42(5)
2. 論文標題 Histochemical characteristics on minimodeling-based bone formation induced by anabolic drugs for osteoporotic treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 161 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.42.161	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 Tomoka, Hongo Hiromi, Yamamoto Tomomaya, Amizuka Norio	4. 巻 -
2. 論文標題 Morphological Assessment of the Biological Effects of Eldecalcitol	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Osteoporotic Fracture and Systemic Skeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 413 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-16-5613-2_27	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 -

1. 著者名 Sasaki Sumire, Shiozaki Yuji, Hanazaki Ai, Koike Megumi, Tanifuji Kazuya, Uga Minori, Kawahara Kota, Kaneko Ichiro, Kawamoto Yasuharu, Wiriyasermkul Pattama, Hasegawa Tomoka, Amizuka Norio, Miyamoto Ken-ichi, Nagamori Shushi, Kanai Yoshikatsu, Segawa Hiroko	4. 巻 12
2. 論文標題 Tmem174, a regulator of phosphate transporter prevents hyperphosphatemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-10409-3	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 -

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(4)
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 Tomoka, Tokunaga Shin, Yamamoto Tomomaya, Sakai Mariko, Hongo Hiromi, Kawata Takehisa, Amizuka Norio	4. 巻 164(4)
2. 論文標題 Evocalcet Rescues Secondary Hyperparathyroidism-driven Cortical Porosity in CKD Male Rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqad022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endo/bqad022	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 -

1. 著者名 Muneyama Takafumi, Hasegawa Tomoka, Yimin, Yamamoto Tomomaya, Hongo Hiromi, Haraguchi-Kitakamae Mai, Abe Miki, Maruoka Haruhi, Ishizu Hotaka, Shimizu Tomohiro, Sasano Yasuyuki, Li Minqi, Amizuka Norio	4. 巻 in press
2. 論文標題 Histochemical assessment on osteoclasts in long bones of toll-like receptor 2 (TLR2) deficient mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2023.04.002	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 長谷川智香、山本知真也、本郷裕美、阿部未来、網塚憲生	4. 巻 -
2. 論文標題 骨細胞ネットワークと骨細胞分化の組織学・微細構造学	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 第41回日本骨形態計測学会記録集	6. 最初と最後の頁 64～65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 網塚憲生、長谷川智香、本郷裕美、山本知真也	4. 巻 -
2. 論文標題 組織学からみた骨粗鬆症治療薬の骨リモデリングとモデリング	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 第41回日本骨形態計測学会記録集	6. 最初と最後の頁 62～63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 網塚憲生、長谷川智香、本郷裕美、山本知真也
2. 発表標題 骨形成促進剤で誘導されるmodeling-based/remodeling-based bone formationの組織学
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 長谷川智香
2. 発表標題 骨細胞ネットワークの微細構造と骨基質石灰化
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 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 網塚憲生、槇野彰人、山本知真也、長谷川智香
2. 発表標題 アバロパラチドまたはテリパラチドを投与した動物モデルの組織学的知見
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川智香、山本知真也、阿部未来、槇野彰人、網塚憲生
2. 発表標題 テリパラチド/アバロパラチドで誘導されるリモデリングとモデリングの微細構造 - 動物モデル実験による組織解析
3. 学会等名 第24回日本骨粗鬆症学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川智香、山本知真也、本郷裕美、福田千恵、津田英資、網塚憲生
2. 発表標題 モデリングまたは骨リモデリング領域における破骨細胞の機能と分化メカニズム
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023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 吉野弘菜、長谷川智香、網塚憲生
2. 発表標題 アレンドロネート投与後における骨特異的血管の組織化学的变化
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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 長谷川智香、山本知真也、本郷裕美、網塚憲生	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 661
3. 書名 最新の骨粗鬆症学（第2版） 骨粗鬆症の最新知見	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Researchmap 網塚憲生 https://researchmap.jp/read0009367</p>
--

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
研究協力者	長谷川 智香 (HASEGAWA Tomoka)		
研究協力者	本郷 裕美 (HONGO Hiromi)		

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