

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 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791760

研究課題名（和文）骨細胞・骨細管系による破骨細胞性骨吸収と骨細胞の生存・死滅の調節機構

研究課題名（英文）Osteocytic regulation on osteoclastic bone resorption and survival/death of osteocytes

研究代表者

鈴木 礼子 (SUZUKI REIKO)

北海道大学・大学院歯学研究科・専門研究員

研究者番号：90333723

研究成果の概要(和文):骨基質に埋め込まれている骨細胞は、骨芽細胞に作用し骨代謝回転を制御するスクレロスチン、ならびに、骨基質の石灰化結晶に結合する DMP-1(dentin matrix protein-1)といった因子を産生する。しかし、骨細胞は、その直上の破骨細胞の骨吸収に応じてスクレロスチン産生を抑制することで、骨芽細胞を介した破骨細胞性骨吸収ならびに骨改造を阻害しないようにすることが示唆された。

研究成果の概要(英文):Osteocytes are shown to synthesize sclerostin and dentin matrix protein-1 (DMP-1), which serve to inhibit osteoblastic activities and subsequent bone remodeling, and regulate surrounding mineralization by binding to calcium ion of calcium phosphate crystals in bone, respectively. In a state of accelerated bone resorption, osteocytes decreased sclerostin synthesis in accordance with stimulated osteoclastic activities. The decreased synthesis of sclerostin appears to be not interrupt accelerated osteoclastic bone resorption by mediating osteoblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：細胞・組織、骨細胞、破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨細胞は骨基質に埋め込まれている細胞であり、互いに細胞突起を介して連結されているため、グループとして機能すると考えられている(骨細胞・骨細管系)。近年、骨細胞が産生する因子

に注目が集まっており、骨芽細胞に作用し骨代謝回転を制御するスクレロスチン、骨基質の石灰化結晶に結合する DMP-1(dentin matrix protein-1)、そして、腎臓に作用し血中リン濃度を調節する FGF23(線維芽細胞増殖因子 23)が代表的な因子としてあげられる。特に、スクレロ

スチンは、骨芽細胞による骨形成抑制ばかりでなく、骨芽細胞の制御下にある破骨細胞の骨吸収をも調節する可能性が高く、骨細胞が骨改造の司令塔として機能するという考え方が提唱されている。

破骨細胞は骨基質を吸収する細胞であるが、これまでに、破骨細胞が分泌する基質分解酵素(例: 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ、カテプシンK, MMP-9 など)についての研究は活発に成されてきたが、基質内に存在する骨細胞の処理に関してはほとんど報告が成されてこなかった。しかしながら、破骨細胞は骨基質やその内部に存在する骨細胞を認識しながら骨基質を取り込み・分解すると考えられる。その指標としてマンノース受容体やその結合体であるN結合型ハイマンノース糖鎖の破骨細胞内分布がどのようになっているのか、骨細胞が取り込まれるか否かに関連させて解析する必要がある。

以上から、骨吸収を行う破骨細胞と骨基質内に局在する骨細胞との相互作用が学術的に重要かつ興味のある課題と考えられた。

2. 研究の目的

上記を踏まえて、本研究では、骨基質を吸収する破骨細胞と骨基質内に局在し破骨細胞による骨吸収を受ける骨細胞との相互作用について組織化学的に解明することを目的とした。

アプローチの仕方として、(1)破骨細胞が骨細胞を処理する場合に見られる細胞組織学的特長、特に骨細胞を取り込んでいると思われる破骨細胞におけるマンノース受容体やそれに結合するN結合型ハイマンノース糖鎖の細胞内分布の解析、(2)活発に骨吸収を行っている破骨細胞の直下に存在する骨細胞がどのような因子を産生して骨改造に影響を与えているかに注目して検索を進めた。特に(2)については、オステオプロテジェリン(OPG)欠損マウス(OPG^{-/-}マウス)における長管骨における破骨細胞と骨細胞との関連性、さらに、歯槽骨において歯の移動に伴い絶えず骨吸収を受ける側の骨細胞産生因子について組織化学的な解析を行った。

3. 研究の方法

野生型マウス、あるいは OPG^{-/-}マウスを4%パラホルムアルデヒド灌流固定を行い、大腿骨・脛骨

および下顎骨(歯槽部)を摘出して、同固定液または2%パラホルムアルデヒド+2.5%グルタルアルデヒド固定液に浸漬固定を行った。

これらのサンプルは、光学顕微鏡レベルでの組織化学には10%EDTA溶液、電子顕微鏡観察には5%EDTA溶液にて脱灰し、それぞれ通法に従って、パラフィンおよびエポキシ樹脂に包埋した。

組織化学解析としては、マンノース受容体における免疫組織学、ならびに、骨細胞が産生するスクレロスチンとDMP-1、および、骨芽細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)と破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)の他、エストロゲン受容体 α や鍍銀染色(骨細管系の可視化)の組織化学を行った。

一方、エポキシ樹脂の超薄切片を作製してウラン・鉛染色を施した後、透過型電子顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

本年度の研究は、破骨細胞の骨吸収に伴って、骨基質に包埋されている骨細胞が破骨細胞によって取り込まれ、そのまま消化・分解されてしまうのかという点、第二点は骨細胞から破骨細胞や骨改造に働きかける機序が組織化学的に解明することができるかという点に焦点をあてた。以下、研究アプローチに沿って、研究成果を記す。

(1) 破骨細胞による骨細胞の取り込み、およびその認識機構について

連続準超薄切片を光学顕微鏡で観察すると、骨基質中の骨細胞が破骨細胞に取り込まれている状態、すなわち、活発に骨吸収を行っている破骨細胞の刷子縁から破骨細胞内部に取り込まれる像を観察することができた(図1)。また、透過型電子顕微鏡で観察すると、破骨細胞内に取り込まれた骨細胞は細胞が崩壊しており、破骨細胞が産生する様々な分解酵素で消化されつつあることが強く示唆された(図2)。

しかしながら、マンノース受容体の免疫組織化学を行ったところ、破骨細胞特異的に陽性反応を観察することができなかった。これらの結果は、破骨細胞が骨細胞を取り込む現象はマクロファージが異物認識する機構とは異なる可能性を

示唆していると推測される。その一方で、技術的な問題点の否定できないため、現在、続けて検索を行っている。

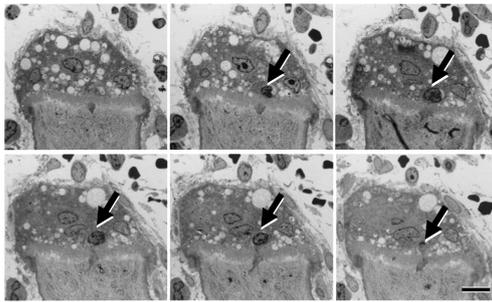


図1: 破骨細胞に取り込まれた骨細胞(矢印)の連続切片像。骨細胞が破骨細胞内部に存在することが分かる

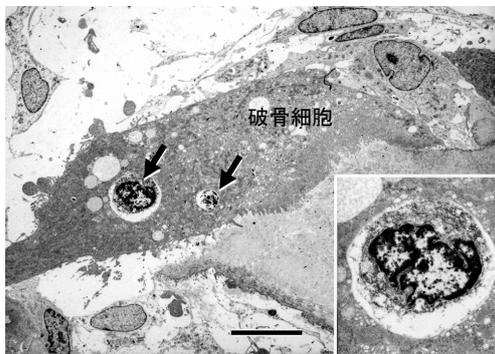


図2: 破骨細胞に取り込まれた骨細胞(矢印)。枠内は矢印の拡大像を示す。取り込まれた骨細胞は崩壊を示す。

(2) 骨細胞から破骨細胞および骨改造に作用する可能性

近年、骨細胞の機能が明らかにされており、骨細胞が産生するスクレロチンは骨芽細胞の機能を抑制することが明らかにされている。一方、骨芽細胞は骨形成ばかりでなく、破骨細胞の分化やその後の骨吸収、すなわち骨改造にも作用することが示唆されている。

そこで、(2)の研究を①オステオプロテジェリン(OPG)遺伝子欠損マウスにおける骨細胞の産生因子、②常時、圧迫を受ける歯槽骨吸収側の骨基質における骨細胞の産生因子、の2つにわけて解析した。

① オステオプロテジェリン(OPG)遺伝子欠損マウスにおける骨細胞の産生因子

OPG^{-/-}マウスは破骨細胞が活性化しており活発な骨吸収を行う環境を示すため、骨吸収が激しい状態での骨細胞の生存・死滅を高い頻

度で組織化学的に観察できると考えられる。その結果、OPG^{-/-}マウスでは、多くの骨細胞が歪な形を示して濃縮したり、死滅することで多数の空の骨小腔が観察された(図3)。

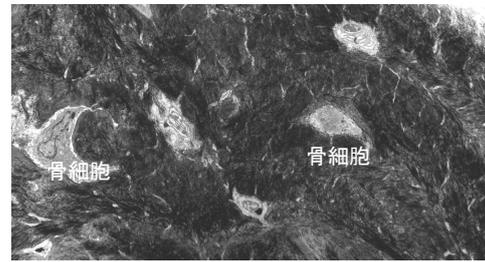


図3: OPG^{-/-}マウスの骨基質に認められる骨細胞と骨細胞管系。歪な形をした骨細胞が不規則に存在しているのが分かる。

このように、透過型電子顕微鏡で観察すると、骨改造を活発に受けた骨基質から骨細胞が生理的に骨小腔から抜け出すことは難しく、多くの場合には、網目状に張り巡らされたセメントラインによって細胞ダメージを受けていることが強く示唆された。

一方、OPG^{-/-}マウスでは、DMP-1とスクレロチンの発現が低下していることが明らかにされた。特に、スクレロチン産生については、破骨細胞の骨吸収亢進は骨芽細胞とのRANKLシグナルが亢進していると考えられ、骨細胞はそのような骨芽細胞を抑制しないと考えられる(Masuki, Suzuki et al., BioMed. Res, 2010)。つまり、骨細胞は骨表面上の骨改造の状態を認識して、それに合わせてスクレロチンを産生・分泌する機構があると考えられた。

② 歯槽骨吸収側の骨基質における骨細胞の産生因子

①の結果から、骨細胞は骨表面上の骨形成または骨吸収を認識して、それに同調するように機能するのか検索した。

そのモデルとして、常時、骨吸収が行われる歯槽骨の圧迫側(下顎第一臼歯・根間中隔近心面)を選択し、正常と卵巣摘出ラットを作製し組織化学的に検索した。正常ラットにおいて、下顎第一臼歯・根間中隔近心面では TRAP 陽性破骨細胞が骨表面上に局在するとともに、ALP 陽性の骨芽細胞も局在しており骨改造が認められた。

根間中隔近心面側の骨細胞を観察すると、スクレロチン陽性反応を有さない骨細胞はごく表層であることが観察された。一方、卵巣摘出により骨代謝回転が上昇した場合の下顎第一臼

歯・根間中隔近心面では、さらに多数の TRAP 陽性破骨細胞と ALP 強陽性骨芽細胞が骨表面上に局在し、非常に活発な骨改造を示した。また、同部位における骨細胞が広範囲わたってスクレロスチン陽性反応を有さないことも認められた。

この現象の機序として、エストロゲン欠乏が骨細胞のアポトーシスを誘導し、スクレロスチン産生を抑制する可能性も考えられたが、TUNEL 法や電顕観察では骨細胞のアポトーシスは確認されなかった。一方、活発な骨改造が行われた結果、骨細胞・骨細管系の規則的配列が乱れてしまい、そのような部位における骨細胞からのスクレロスチン産生が著しく低下していることが明らかとなった(Guo, Suzuki et al., *J Electron Microscopy*, 2012)。

従って、破骨細胞の骨吸収および骨芽細胞との骨改造を骨細胞が認識し、それに同調する機序が作用して、骨細胞からのスクレロスチン産生が低下することが推察された。

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9件)

- ① Sasaki M., Hongo H., Hasegawa T., Suzuki R., Liu Z., Freitas PHL., Yamada T., Oda K., Yamamoto T., Li M., Totsuka Y., Amizuka N.: Morphological aspects of the biological function of the osteocytic lacunar canalicular system and of osteocyte-derived factors. *Oral Science International*. 9 (1):1-8, 2012.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1348864312000092> 査読有
- ② 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(2):93-103, 2012.
<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/48704> 査読有
- ③ Guo Y., Li M., Liu Z., Sasaki M., Hasegawa T., Hongo H., Tabata C., Suzuki R., Oda K., Yamamoto T., Kawanami M., Amizuka N.: Immunolocalization of sclerostin synthesized by osteocytes in relation to bone remodeling in the interradicular septa of ovariectomized rats. *J Electron Microsc.* 61(5): 309-320, 2012
doi: 10.1093/jmicro/dfs052 査読有
- 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(1):37-42,2012.
[http://www.journaloforalbiosciences.org/article/S1349-0079\(12\)00008-4/fulltext](http://www.journaloforalbiosciences.org/article/S1349-0079(12)00008-4/fulltext) 査読有
- ⑤ 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.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/32/4/32_4_259/_article 査読有
- ⑥ 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.
doi: 10.1093/jmicro/dfq021. 査読有
- ⑦ 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.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/joralbiosci/52/2/52_2_94/_article 査読有

- ⑧ Yamamoto T., Li M., Liu Z., Guo Y., Hasegawa T., Masuki H., Suzuki R., Amizuka N.: Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. *Odontology*. 98(2):102-109, 2010.
doi: 10.1007/s10266-010-0134-3. 査読有
- ⑨ 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.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/biomedres/31/5/31_5_307/_article 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 本郷裕美、佐々木宗輝、長谷川智香、鈴木礼子、下地伸司、網塚憲生：副甲状腺ホルモン投与による骨細胞性骨溶解に関する組織化学的検索。第117回日本解剖学会総会・全国学術集会 ベルクラシック甲府(山梨県) 2012年3月26-28日 プログラム・抄録集: 111, 2012.
- ② 本郷裕美、佐々木宗輝、長谷川智香、郭穎、虎谷 彌、田幡千尋、鈴木礼子、李敏啓、網塚憲生：副甲状腺ホルモン投与による骨細胞性骨溶解の可能性について。第53回歯科基礎医学会学術大会 長良川国際会議場(岐阜県) 2011年9月30日-10月2日 *J Oral Biosci*. 53(suppl): 131, 2011.
- ③ 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 タワーホール船橋(東京都) 2010年9月20-22日 *J Oral Biosci*. 52(suppl): 147, 2010.
- ④ 長谷川智香、李 敏啓、井上貴一朗、田幡千尋、佐々木宗輝、鈴木礼子、織田公光、山本恒之、大畑 昇、網塚憲生：アスコルビン酸欠乏ラットの歯根膜異常における組織化学的検索。第52回歯科基礎医学会学術大会 タワーホール船橋(東京都) 2010年9月20-22日 *J Oral Biosci*. 52(suppl): 124, 2010.
- ⑤ 山本恒之、李 敏啓、郭 穎、柳 鑄晟、増木英郎、長谷川智香、鈴木礼子、網塚憲生：有細胞セメント質層板構造に関する走査型および透過型電子顕微鏡検索。第52回歯科基礎医学会学術大会 タワーホール船橋(東京都) 2010年9月20-22日 *J Oral Biosci*. 52(suppl): 147, 2010.
- ⑥ 宮本幸奈、李 敏啓、長谷川智香、柳 鑄晟、郭 穎、鈴木礼子、沢村祥子、宇田川信之、山本恒之、網塚憲生：RANKL 遺伝子欠損マウスの骨芽細胞系細胞における組織学的解析。第30回日本骨形態計測学会 米子コンベンションセンター(鳥取県) 2010年5月13-15日 日本骨形態計測学会雑誌 20(1):S73, 2010.
- ⑦ 李 敏啓、長谷川智香、柳 鑄晟、郭 穎、鈴木礼子、沢村祥子、山本恒之、網塚憲生：type I collagen promoter を用いた PTHrP Tg マウスの骨芽細胞における解析。第30回日本骨形態計測学会 米子コンベンションセンター(鳥取県) 2010年5月13-15日 日本骨形態計測学会雑誌 20(1):S74, 2010.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

無し

○取得状況(計0件)

無し

[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

鈴木 礼子(SUZUKI REIKO)

北海道大学・大学院・歯学研究科・専門研究員

研究者番号:90333723

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし