

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893007

研究課題名(和文) 感覚臓器としての骨の役割を探る

研究課題名(英文) The role of the bone as sensory organ

研究代表者

佐藤 真理 (sato, mari)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40546488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：成長板付近の軟骨細胞が産生する神経関連因子に注目し、骨から脳への神経刺激の入力機構を解明することを目的として本実験を行った。成長板軟骨細胞がTyrosine hydroxylase(TH)を産生することを骨組織の免疫蛍光染色で捉えたが、軟骨細胞株およびプライマリーの軟骨細胞ではTHを産生しておらず、他の神経関連因子であるBrain derived neurotrophic factor (BDNF)、Glial cell derived neurotrophic factor (GDNF)に注目して軟骨細胞での発現を検討したところ、軟骨細胞分化に伴ってGDNFの発現は著しく上昇することを見出した。

研究成果の概要(英文)：This study focused on neurotransmitter and neurotrophic factors derived from chondrocytes. Immunofluorescence staining of Tyrosine hydroxylase(TH) showed chondrocytes which were located close to growth plate produce TH in mouse skeletal tissues. However, it was showed by real time PCR analysis that chondrocyte cell line ATDC5 and primary chondrocytes did not express TH gene. Next, I examined the expression level of brain derived neurotrophic factor (BDNF) and glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) in chondrocytes. Both ATDC5 cells and primary chondrocytes expressed GDNF and GDNF expression was increased through the chondrocyte differentiation.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨細胞 神経関連因子

1. 研究開始当初の背景

骨に埋め込まれた骨細胞は、骨の中で細胞突起を長く伸ばして骨細胞同士でネットワーク構造を作り、メカノセンサーとしての役割を果たしている。細胞突起が埋まっている骨細管の中は組織液で満たされており、機械的刺激によって引き起こされる組織液の振動が骨細胞の細胞突起とずり応力を生じる。この刺激により prostaglandin E2 や sclerostin といった種々のシグナル分子が骨細胞から誘導され、骨表面の骨芽細胞や破骨細胞にシグナル伝達を行い骨代謝を制御している。さらに、これまでの申請者の研究から、メカノセンサーである骨細胞は骨組織だけではなく胸腺や脂肪組織といった遠隔臓器を、一部脳を介して制御していることが明らかとなった。その制御機構は明らかではないものの、神経系を介した制御機構の存在が示唆された。すなわち、骨細胞が感覚細胞として機械的刺激受容により神経伝達物質を放出することで求心性に脳へ神経伝達を行い、その神経刺激を受けて脳から遠心性に各臓器に神経刺激が入るといった未知の制御機構である。それを解明するために、申請者はまず骨から脳への求心性の神経制御機構を明らかにすべく、免疫染色にて骨組織の交感神経分布を調べた。その研究過程で、成長板付近の軟骨細胞が、カテコールアミン合成酵素である Tyrosine hydroxylase (TH) を発現していることを見出した。このことから、骨細胞は機械的刺激を受容ならびに増幅した上で何らかの神経伝達物質様因子の産生により近傍の軟骨細胞に情報伝達を行い、軟骨細胞が交感神経伝達物質を産生することで求心性に脳に情報伝達を行っているとの新たな仮説を導き出した。

2. 研究の目的

メカノセンサーである骨細胞を大量に埋め込んだ骨組織が、感覚臓器として複数の細胞で構成される神経情報伝達機構を持つと考え、メカノセンサーである骨細胞からの感覚刺激の伝達により、成長板付近の軟骨細胞で神経伝達物質の産生が誘導され、求心性神経を介して脳へと神経刺激が入力されるとの仮説を明らかにすることが研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスと骨細胞除去マウスの骨組織切片を用いて、免疫染色法により成長板軟骨の TH 産生発現変化を調べた。

(2) 幼若マウス(3週齢前後)、成体マウス(15週齢前後)、老齢マウス(40週齢前後)の骨組織切片を用いて、免疫染色法により成長板軟骨の TH 産生発現変化を検討中である。

(3) マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 およびマウスプライマリー成長板軟骨細胞を用いてリアルタイム PCR 法による TH 遺伝子の発現解析を行った。

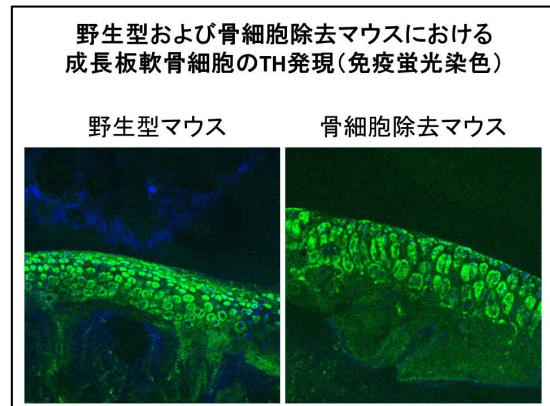
(4) glyoxylic acid 法により、成長板軟骨細胞が TH を利用して最終的にカテコラミンを合成しているか否かを調べた。

(5) マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 およびマウスプライマリー成長板軟骨細胞を用いて、神経成長因子である Brain derived neurotrophic factor (BDNF)、Glial cell derived neurotrophic factor (GDNF)、Artemin (ARTN)、Neurturin (NRTN) の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。(一部は解析中である)

(6) BDNF, GDNF, ARTN, NRTN のレセプターである RET およびコレセプターである TrkB, GFR 1, GFRα2, GFRα3 の発現を RT-PCR 法にて検討中である。

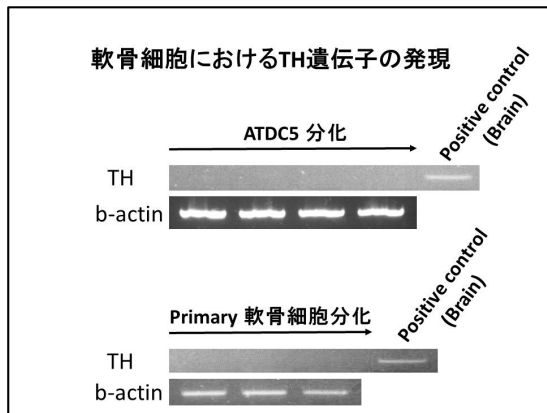
4. 研究成果

(1) 野生型マウスと骨細胞除去マウスの骨組織切片を用いて、免疫染色法により成長板軟骨の TH 産生発現変化を調べたところ、著しい変化は見られなかった(下図)。



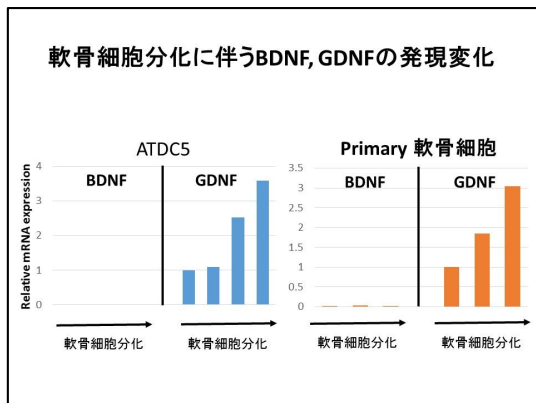
さらに、成長に伴う軟骨細胞の TH 発現変化を調べるために、幼若マウス(3週齢前後)、成体マウス(15週齢前後)、老齢マウス(40週齢前後)の骨組織切片を用いた免疫染色法により成長板軟骨の TH 産生発現変化を検討中である。

(2) マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 を分化試薬を用いて軟骨細胞に分化させ、TH 遺伝子発現を qPCR 法にて検討したが発現は見られなかった。次に、2-10週齢のマウス大腿骨成長板よりコラゲナーゼ処理にて軟骨細胞を抽出したものを培養し、TH 遺伝子発現を qPCR 法にて調べたが発現は見られなかった(下図)。



さらに、軟骨細胞が TH を利用して最終的にカテコラミンを合成しているか否かを調べるために、マウス大腿骨組織切片を用いて glyoxylic acid 法によりカテコラミン蛍光発現を検討した。コントロールサンプルである心臓組織ではカテコラミン蛍光が得られたが、骨組織ではサンプル調整が困難であり実験を遂行できなかった。

(3) 上記のように、invitro ならびに ex vivo の実験では TH 遺伝子発現が得られなかったため、他の神経関連因子である BDNF および GDNF に注目して軟骨細胞での発現を検討した。軟骨細胞株 ATDC5 では軟骨細胞分化に伴い、BDNF の発現に変化はなかったが GDNF の発現が著しく上昇した。同様にマウス大腿骨成長板より抽出したプライマリー軟骨細胞でも分化に伴って GDNF の発現が著しく上昇していた(下図)。



同様に、他の神経関連因子である ARTN および NRTN についても軟骨細胞分化における発現変化を検討中である。

(4) 軟骨細胞が産生する BDNF と GDNF がオートクラインに影響するのか、パラクラインに影響するのかを調べるために、BDNF と GDNF のレセプターRET およびコレセプターである TrkB, GFR 1 の発現を RT-PCR 法にて検討を行っている。

また、ARTN および NRTN の発現検討とともにそれらのコレセプターである GFR 2, GFR 3

の発現を検討中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

佐藤真理、骨が指揮する多臓器間協奏曲、日本生物物理学会北海道支部会・北海道分子生物学研究会・日本生化学会北海道支部 2014 年度合同シンポジウム、2014 年 11 月 19 日、北海道大学農学研究院(北海道札幌市)

佐藤真理、骨の見えざる手による全身制御、第 87 回日本生化学会大会シンポジウム、2014 年 10 月 16 日、国立京都国際会館(京都府京都市)、「骨と骨髄による全身制御」企画シンポジウム、座長・シンポジスト

佐藤真理、骨が指揮する多臓器間協奏曲、第 12 回 口腔医科学フロンティア、2014 年 3 月 8 日、東京医科歯科大学(東京都文京区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

・ホームページ：
<http://tenure-track.cris.hokudai.ac.jp/lab/kokusentan/>

・研究解説：佐藤真理、全身の健康における骨の役割を解明する、知のフロンティア第 3 号、平成 26 年 10 月、82-83 頁

・アウトリーチ活動：
佐藤真理、サイエンスカフェ苫小牧「ホネ

ノヒミツ」、2014年8月31日、苫小牧市美術博物館（北海道苫小牧市）プレゼンター

佐藤真理、独立行政法人 科学技術振興機構「女子中高生の理系進路選択支援プログラム」北海道大学 第三回「理科してみよう！～じっくりサイエンス！！～」、2013年11月9日、北海道大学（北海道札幌市）講義・実験指導担当

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 真理（ SATO MARI ）
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40546488