

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670674

研究課題名(和文)ミネラルリゼーション異常症の新規メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidating mechanisms of altered bone matrix mineralization

研究代表者

松尾 光一(MATSUO, Koichi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40229422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨のミネラルリゼーション(石灰化)は、カルシウムと無機リン酸からなるヒドロキシアパタイト結晶が、コラーゲン線維に付着することで進行する。ミネラルリゼーション異常症では、骨の力学的強度が低下する。チロシンキナーゼ型受容体EphAの遺伝子を欠損するマウスで起こるミネラルリゼーション異常は、「基質小胞」の中でヒドロキシアパタイトの結晶が成長して、膜を突き破ることができる「石灰化球」の異常であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone matrix mineralization (calcification) proceeds through organized deposition of calcium hydroxyapatite crystals on collagen fibers. Both hyper- and hypomineralization reduce bone mechanical properties. Mice lacking tyrosine kinase receptor EphA showed hypermineralization likely due to altered growth of mineralizing nodules.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨基質 ミネラルリゼーション 石灰化

## 1. 研究開始当初の背景

骨の石灰化(ミネラル化)は、カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )と無機リン酸( $\text{Pi}$ ,リン酸イオン溶液)からなるヒドロキシアパタイト結晶(生物学的アパタイトともいう)が、I型コラーゲン線維に付着して成長することで進行する。ミネラル化により、骨は、コラーゲン線維のもつしなやかさに加えて、ヒドロキシアパタイト結晶による強度を併せ持つようになる。つまり骨基質は、まるで鉄筋コンクリートのように力学的にも優れた複合材料であると言える。

石灰化の異常、すなわち低石灰化と、過度の石灰化は、どちらも骨の強度を低下させる。また、石灰化が骨にのみ起こり、動脈など骨以外での石灰化(異所性石灰化)が起こらないように、石灰化部位の制御も厳密に行われているものと考えられる。その適切なレベル、適切な部位での石灰化がどのように達成されているかについては、十分な理解が得られていない。

研究開始当初までに研究代表者らは、骨における ephrin と Eph という分子の相互作用を研究していた(Zhao et al, 2006, Cell Metabolism; Irie et al, 2009, J. Biol. Chem)。ephrin と Eph はどちらも細胞膜の表面に存在する分子で、Eph はチロシンキナーゼの活性をもつ受容体であり、ephrin はそのリガンドである。Eph ファミリーは最大のチロシンキナーゼ型受容体ファミリーであり、そのうちの EphB4 と EphA2 を中心に研究を進めてきた。またそのリガンドとしては、ephrinB2 や ephrinA2 の機能を解析した。最も特徴的なのは、通常のリガンドと受容体の場合には、受容体を発現する細胞に、細胞内シグナルが入り、リガンドを発現する細胞には細胞内シグナルは入らないのがふつうであるのに対して、ephrin-Eph の相互作用は双方向性で、リガンドを発現する細胞にもシグナルが入ることである。この ephrin-Eph の双方向性シグナルが、発生過程の骨形態形成、すなわち「骨のモデリング」や、成長した後で骨吸収と骨形成のバランスを調節する「骨リモデリング」において働いていることが、次々と明らかになってきた。ephrinB2 は破骨細胞と骨芽細胞に発現し、EphB4 は骨芽細胞に発現する。破骨細胞の ephrinB2 にシグナル(逆シグナル)が入ると骨吸収は抑制され、骨芽細胞の EphB4 にシグナルが入ると骨形成が促進された。Sims 研究室などの海外の研究者は、ephrinB2-EphB4 の相互作用が骨芽細胞間でも起こり、骨形成が促進されることを見出し、しかも ephrinB2 の発現量が、臨床で骨形成を促すために使用されている副甲状腺ホルモンにより増加することを報告している。

そのような状況の中、研究代表者らは、ephrin や Eph を欠損するマウスにおいては、ミネラル化の異常が認められるこ

とに気付いた。特に、チロシンキナーゼ型受容体 EphA2 を欠損するマウスでは石灰化が亢進していることを見出していた。

## 2. 研究の目的

チロシンキナーゼ型受容体 EphA2 を欠損するマウスでは石灰化が亢進しているという予備実験データを確認し、リガンド ephrin と受容体 Eph の相互作用の解析から、ミネラル化異常症の新規メカニズムを解明することを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) EphA2 欠損マウスの骨のマイクロ・コンピュータ断層撮影(CT)による解析

大腿骨・脛骨を成体の EphA2 欠損マウスと同腹の対照マウスから摘出し、筋肉などの軟部組織を除去したのち、70%アルコール中で固定して風乾した。マイクロCT(R\_mCT2, リガク)を用いて、10~20 ミクロン/ピクセルの解像度で撮像した。画像解析ソフトウェア(3D Bon、ラトック)を用いて骨パラメータを計測した。

(2) EphA2 欠損マウスの組織学的骨形態計測

非脱灰の長管骨をプラスチック樹脂(メチルメタクリレートなど)に包埋して薄切し、骨量や骨梁のパラメータ、骨密度、さらに破骨細胞数や骨芽細胞数を計測した。十分な数のマウスを用いて独立した実験を繰り返した。さらに骨芽細胞が生成し、まだミネラル化に至っていない、いわゆる類骨(オステオイド)の特殊染色(ピラヌエバ染色、Villanueva bone stain)による定量も行った。

(3) 頭蓋骨由来の骨芽細胞培養

頭蓋骨由来の骨芽細胞の初代培養を行った。新生仔マウスの頭蓋骨をコラゲナーゼ・ディズパーゼで繰り返し消化して骨芽細胞を骨から分離して回収した。これを培養増殖させた後、骨芽細胞分化と試験管内ミネラル化を誘導する培地を添加して培養した。この培地には、増殖に必要な胎児ウシ血清の他に、ミネラル化に必要なカルシウムイオン、無機リン酸、さらにコラーゲン線維の産生を促すアスコルビン酸(ビタミンC)も含まれる。

(4) 基質小胞の解析

頭蓋骨由来の骨芽細胞分化の実験系で、経時的に(例えば、0日、7日、14日、21日など)培養上清を回収、超遠心分離法や、エクソソーム(エキソソーム)精製キットを用いて「基質小胞(マトリックスベジクル)」の画分を得た。走査型電子顕微鏡で解析し、特にEDS(エネルギー分散型X線分光器)による元素分析により、カルシウムイオンと無機リン酸が、基質小胞に入っているかどうかを確認した。さらに、粒子の散乱光の強度を測

定することにより粒子の直径の分布を定量するナノ粒子解析装置(ナノサイト、日本カンタム・デザイン)を用いてサイズを評価した。

(5) 放射光施設を利用したX線顕微鏡を用いた解析

ミネラル化の程度を定量するために、放射光施設 SPring-8(兵庫県)において、タルボ型X線顕微鏡を用いたX線位相CTを活用した(東北大学・百生敦教授との共同研究)。空間分解能、約1ミクロンで、ピクセル分解能は約200nmで、骨小腔や骨細管、血管などを除いた、真の骨基質の骨密度を定量した。

(6) 骨強度の解析

長管骨の3点曲げ試験用に作られた力学試験機(室町機械)により、長管骨を用いて力学パラメーターを測定した。乾燥骨だけでなく、乾燥させずに保存した骨でも測定した。

(7) EphA2欠損マウスの網羅的遺伝子発現の解析

EphA2欠損マウスと同腹の対照マウスから摘出した長管骨を用いてマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 主な成果:

EphA2欠損マウス

EphA2欠損マウスでは、通常のCTによる測定、骨形態計測において、石灰化亢進が認められた。類骨が対照と比べて少なかったことも石灰化亢進の表れであると考えられた。

そのメカニズムとして、基質小胞の特質が石灰化度に影響を与えるのではないかという仮説の下に、電子顕微鏡やナノサイトを用いて、経時的に基質小胞の直径を解析した。脂質二重層で完全に覆われている基質小胞では、有意なサイズの違いが再現されず、ヒドロキシアパタイト結晶が脂質二重層を突き破って成長する過程にあると考えられる「石灰化球」の成長速度が、野生型マウスに比べてEphA2欠損マウス由来のサンプルで速いことが示唆された。一方、3点曲げ試験では、EphA2欠損マウスの長管骨の骨強度が、野生型マウスに比べて高いことが分かった。さらに、マイクロCTを用いた新たな解析でも、成長板直下のミネラル化亢進が裏付けられた。マイクロアレイを用いた解析により、EphA2欠損マウスにおいて、イオン輸送の異常と、ミネラル化亢進異常との関連が示唆された。

骨細管によるミネラル化抑制

EphA2欠損マウスの骨基質のミネラル化亢進の解析を高解像度で行うため、骨から、骨小腔や骨細管、血管を除いた部分について、

高い解像度で解析する実験系を確立した。これまでのところ、遺伝子変異に関する差異は明らかになっていないものの、骨の中に埋まっている無数の骨細胞から多数の樹状突起を入れている、直径200-600nm程度の骨細管について、その周囲の骨密度が低下している部分と低下していない部分が見つかった。このことは、骨細管周囲のミネラルの出入りがある直接的な証拠であると考えられた。骨小腔周囲の骨融解に関しては、それを支持する実験データが報告されているが、骨細管周囲の骨融解を捉えたのは世界でも初めてである(Nango et al., 2015, Bone)。

さらに、X線顕微鏡によるCTで、副甲状腺ホルモン投与による成長板直下のミネラル化の変化が可視化された。

(2) 国内外の位置づけとインパクト:

骨代謝の ephrin-Eph による制御に関する研究代表者らの論文(Zhao et al., 2006, Cell Metabolism)を契機に、オーストラリア、カナダ、中国との共同研究が展開されており、成果が上がっている。オーストラリアの Gronthos 研究室などで EphB/ephrinB の相互作用により骨髄ストローマ細胞が制御されているという発見につながった。このグループは骨折治癒過程も解析している。また、メルボルンの Sims 研とは平成28年度の若手研究者の受け入れを準備した。カナダの Martel-Pelletier 研では、変形性関節症のモデルマウスにおける Eph/ephrin の細胞内シグナルの意義を見出した。また、香港の Yang 研では、歯根膜線維芽細胞における Eph/ephrin の機能を見出した。このように、周辺領域を含め、国際的な共同研究が複数進んでいる。

(3) 今後の展望:

基質小胞のサイズ異常という当初の単純な仮説から、さらに基質小胞の二重膜を破って形成される石灰化球の存在、基質小胞とエクソソームの関係などのより深い解析をもとにした仮説の構築が必要になった。特に、EphA2欠損マウスにおいて、イオンの輸送に係るタンパク質の遺伝子の発現異常が見出されており、石灰化異常とイオンの輸送異常とが関連しているかどうかが今後の課題である。

ミネラル化を高解像度で可視化する技術は、視野を維持したままでさらに解像度がサブミクロンになるような開発が続いており、技術革新の最先端と連動したミネラル化機構の解明を続けていきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

1: Nango N, Kubota S, Hasegawa T, Yashiro W, Momose A, Matsuo K.

Osteocyte-directed bone demineralization along canaliculi.

Bone. 査読あり 2016;84:279-88.

doi: 10.1016/j.bone.2015.12.006.

2: Nguyen TM, Arthur A, Panagopoulos R, Paton S, Hayball JD, Zannettino AC, Purton LE, Matsuo K, Gronthos S. EphB4 Expressing Stromal Cells Exhibit an Enhanced Capacity for Hematopoietic Stem Cell Maintenance.

Stem Cells. 査読あり 2015;33(9):2838-49.

doi: 10.1002/stem.2069.

3: Valverde-Franco G, Hum D, Matsuo K, Lussier B, Pelletier JP, Fahmi H, Kapoor M, Martel-Pelletier J. The in vivo effect of prophylactic subchondral bone protection of osteoarthritic synovial membrane in bone-specific Ephb4-overexpressing mice.

Am J Pathol. 査読あり 2015 ;185(2):335-46.

doi:10.1016/j.ajpath.2014.10.004.

〔学会発表〕(計 31 件)

1: Nango Nobuhito, Kubota Shogo, Yashiro Wataru, Momose Atsushi, Ichinose Shizuko, Matsuo Koichi. Continuous Parathyroid Hormone Injection in Mouse Has Differential Effects on Osteoclast Activation in Primary and Secondary Spongiosa. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, October 9-12, 2015, シアトル (米国)

2: Gronthos Stan, Nguyen Thao, Purton Louise, Matsuo Koichi, Arthur Agnes. EphB/ephrin-B interactions regulate stromal cell fate determination and bone marrow support. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, October 9-12, 2015, シアトル (米国)

3: Chongshan LIAO, Chengfei ZHANG, Lijian JIN, Koichi MATSUO, Yanqi YANG. Expression of Eph-ephrin signalling in osteocytes under mechanical loading. 91st Congress of the European Orthodontic Society, June 13 - 18, 2015. ベニス (イタリア)

4: Minjie Li, Chengfei Zhang, Lijian Jin, Koichi Matsuo, Yanqi Yang. Influence of lipopolysaccharide on ephrin/Eph expression in human periodontal ligament fibroblasts. 91st Congress of the European Orthodontic Society, June 13 - 18, 2015. ベニス (イタリア)

5: Nobuhito Nango, Shogo Kubota, Wataru Yashiro, Atsushi Momose, Makoto Morikawa, Koichi Matsuo. Continuous PTH

Administration Stimulates Osteoclasts and Leads to Increased Cortical Bone Resorption at the Endosteal Surface, Widening of the Porosities, and Osteoclasts Contact with Osteocytes.

Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 12-15, 2014, ヒューストン (米国)

6: Valverde-Franco, G., Hum, D., Lussier, B., Matsuo, K., Pelletier, J.P., Kapoor, M. and Martel-Pelletier, J. The in vivo role of bone specific EphB4 receptor overexpression in osteoarthritic synovial membrane. WCO-IOF-ESCEO 2014 World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. April 2-5, 2014. セビリア (スペイン)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

慶應義塾大学医学部細胞組織学研究室

<http://wp4.matsuo-lab.com/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松尾 光一 (Koichi Matsuo)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号 : 40229422

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし