

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791784

研究課題名（和文）副甲状腺ホルモンの骨芽細胞とその前駆細胞に対する細胞学的作用の相違について

研究課題名（英文）cytological evaluation on different effect of parathyroid hormone (PTH) in osteoblasts and preosteoblasts

研究代表者

李 敏啓 (LI MINQI)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60447612

研究成果の概要（和文）：野生型マウスにおいて、副甲状腺ホルモン（PTH）の間歇投与は前骨芽細胞の増殖を促進し骨形成を上昇することが観察された。一方、*c-fos*<sup>-/-</sup>マウスにおいて前骨芽細胞の増殖が認められたが、骨基質形成は観察されなかった。従って、PTH の間歇投与による骨芽細胞の前駆細胞の増殖を促進するが、これらの前駆細胞から骨芽細胞に分化する過程には破骨細胞の存在が必要と推測された。

研究成果の概要（英文）：PTH administration led to significant increases in the pre-osteoblastic proliferation in both the wild-type and *c-fos*<sup>-/-</sup> mice. The pre-osteoblasts present on the bone surfaces did not seem to be actively producing bone matrix in *c-fos*<sup>-/-</sup> mice. We concluded that the absence of osteoclasts might hinder PTH-driven bone anabolism and that osteoclastic presence may be necessary for full osteoblastic differentiation and enhanced bone formation after the intermittent PTH administration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：解剖学、細胞・組織、遺伝子、歯学、骨

## 1. 研究開始当初の背景

PTH の間歇投与による骨形成作用は、PTH 投与後に血清アルカリホスファターゼなどの骨形成マーカーが速やかに上昇することから、PTH は骨芽細胞の分化促進を誘導すると考えられてきた。これを利用して、骨粗鬆症治療薬への応用が試みられている。しかし、PTH には骨芽細胞系細胞の増殖作用や骨髄 niche 形成 (Calvi et al., Nature 2003)、骨

芽細胞・骨細胞のミネラル調節 (Tatsumi, Li et al., Cell Metab, 2007) に対する作用 (骨細胞性骨溶解) といった報告も存在し、必ずしも一致した見解を得ていない。

## 2. 研究の目的

骨代謝に重要なホルモンである副甲状腺ホルモン (PTH) の骨形成作用における細胞機序は未だ明らかにされていない。そこで、

「PTH は、成熟型骨芽細胞、前骨芽細胞、骨髄間質細胞といった骨形成系細胞 1 つ 1 つにどのような細胞機能を誘導し、また、破骨細胞の存在下でどのように骨形成作用を示すのか？」の解明に向けて遺伝子組み換えマウスを応用した検索を細胞組織学的に行う。

### 3. 研究の方法

平成 2 1 年度

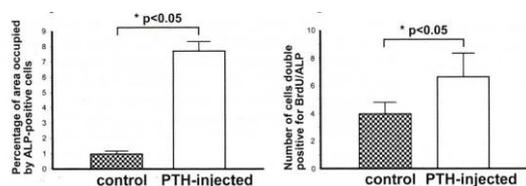
PTH を野生型マウスに間歇投与することで、成熟型骨芽細胞とその前駆細胞（前骨芽細胞と骨髄間質細胞を含む）に対する PTH の作用効果を、細胞増殖と細胞分化に注目して微細構造学的に解析した。具体的には、透過型電子顕微鏡観察や各種の免疫組織化学手法によって成熟型骨芽細胞、前骨芽細胞、骨髄間質細胞など、分化段階に応じた細胞群を解析した。

平成 2 2 年度

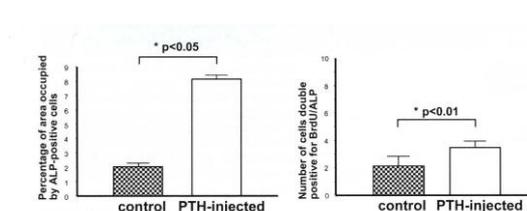
骨リモデリングが活発に行われている環境における骨芽細胞・前骨芽細胞の分化・増殖などの細胞活性は高く、一方、破骨細胞が存在しない環境では骨形成系細胞の活性は低い。そこで、破骨細胞の影響を排除した状況で、PTH が骨髄間質細胞・前骨芽細胞・骨芽細胞にどのような影響を与えるのか解析するために、破骨細胞が存在しない *c-fos*<sup>-/-</sup>マウスに PTH を間歇投与した。前年度と同じように透過型電子顕微鏡観察や各種の免疫組織化学手法によって成熟型骨芽細胞、前骨芽細胞、骨髄間質細胞の細胞構造学的変化を解析した。

### 4. 研究成果

野生型マウスに PTH 間歇投与によって ALP 陽性細胞や BrdU/ALP 陽性細胞数はコントロール群に比べて著しく増加し、骨形成も上昇したことが分かった(下図)。

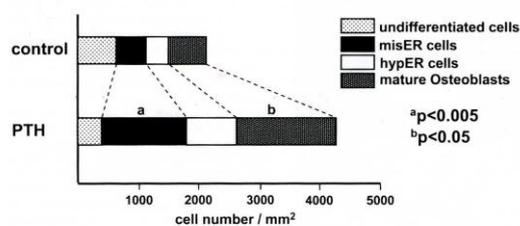


*c-fos*<sup>-/-</sup>マウスに PTH 間歇投与によって ALP 陽性細胞や BrdU/ALP 陽性細胞数はコントロール群に比べて著しく増加したが、明らかな骨形成が観察されなかった(下図)。

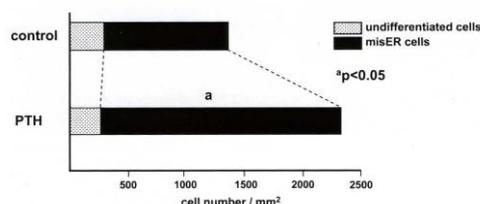


両群において PTH 間歇投与してから、各コントロール群に比べて多数の ER-poor 細胞は骨基質の表面に観察された(下図)。

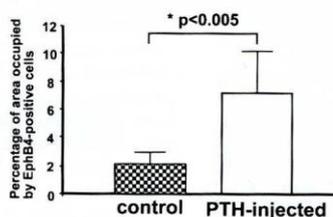
野生型マウス



*c-fos*<sup>-/-</sup>マウス



野生型マウスにおいて EphrinB2/ALP や EphB4/TRACP の免疫組織化学により ER-poor 前骨芽細胞と破骨細胞との協同作用があることが推測された(下図)。



以上のことから、PTH の間歇投与による骨芽細胞の前駆細胞の増殖を促進するが、さらに、これらの前駆細胞から骨芽細胞に分化する過程には破骨細胞の存在が必要と推測された。

### 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 7 件)

- ① Li M, Seki Y, Freitas HLP, Nagata M, Kojima T, Sultana S, Ubaidus S, Maeda T, Shimomura-Kuroki J, Henderson J, Tamura M, Liu Z, Guo Y, Yamamoto T, Oda K, Takagi R, Amizuka N. FGFR3 down-regulates PTH/PTHrP receptor gene expression by mediating JAK/STAT signaling in chondrocytic cell line. *J Electron Microsc.* 59(3):227-236, 2010. 査読有
- ② 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 with characteristics of histological criteria for preosteoblasts in mouse tibial metaphysis. *J Electron Microsc.* 59(5):427-436, 2010. 査読有
- ③ Masuki H, Li M, Guo Y, Hasegawa T, Liu Z, Suzuki R, Oda K, Yamamoto T, Kawanami M and Amizuka N: Immunolocalization of DMP-1 and sclerostin in the epiphyseal trabecule and diaphyseal cortical bone of osteoprotegerin deficient mice. *Biomedical Res.* 31(5):307-318, 2010. 査読有
- ④ Li M, Hasegawa T, Masuki H, Liu Z, Guo Y, Suzuki R, Yamamoto T, Freitas PHL and Amizuka N: Ultrastructural Assessment of Mineral Crystallization and Collagen Mineralization in Bone. *J. Oral Biosci.* 52(2):94-99, 2010. 査読有
- ⑤ 網塚憲生、李 敏啓、田村正人、織田公光：骨・軟骨に対する PTH/PTHrP 作用における形態学的知見 *Clin Calcium. 医薬ジャーナル社* 19, 935-943, 2009. 査読無
- ⑥ Freitas PHL, Li M, Ninomiya T, Nakamura M, Ubaidus S, Oda K, Udagawa N, Maeda T, Takagi R, Amizuka N: Intermittent PTH administration stimulates pre-osteoblastic proliferation without leading to

enhanced bone formation in osteoclast-less c-fos(-/-) mice. *J Bone Miner. Res.* 24(9):1586-1597, 2009. 査読有

- ⑦ Ubaidus S, Li M, Sultana S, de Freitas PH, Oda K, Maeda T, Takagi R, Amizuka N.: FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *J Electron Microsc.* 58(6):381-392, 2009. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① Li M, Hasegawa T, Nakamura S, Sasaki M, Liu Z, Guo Y, Suzuki R, Yamamoto T and Amizuka N: Histochemical assessment of altered bone tissue in transgenic mice overexpressing parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) driven by type I collagen promoter. The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Metro Toronto Convention Centre, South Building Toronto, ON, Canada, October 17, 2010.
- ② 李 敏啓、長谷川智香、柳 鑄晟、増木英郎、佐々木宗輝、田幡千尋、小守壽文、山本恒之、網塚憲生：骨芽細胞特異的 PTHrP トランジェニックマウスの骨組織における解析. 第 52 回歯科基礎医学会、タワーホール船堀、東京、2010 年 9 月 21 日。
- ③ 李 敏啓、郭 穎、小守壽文、網塚憲生：骨芽細胞特異的 PTHrP 過剰発現マウスの骨組織における組織化学的解析. 第 28 回日本骨代謝学会、京王プラザホテル、東京、2010 年 7 月 23 日。
- ④ 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、2010 年 5 月 14 日。
- ⑤ Amizuka N, Li M, Freitas PHL, Liu Z, Guo Y, Suzuki R, Yamamoto T: Histological assessment for PTH/PTHrP signaling on osteoblasts. 14th international

congress of endocrinology, Kyoto International Conference Center, Kyoto, JAPAN, March 28, 2010.

- ⑥ 網塚憲生、長谷川智香、中村沙也香、Paulo Freitas、柳 鑄晟、郭 穎、鈴木礼子、李 敏啓：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 22 回北海道骨粗鬆症研究会、北海道大学医学部臨床講義棟 大講堂、札幌、2010 年 1 月 23 日。
- ⑦ 網塚憲生、長谷川智香、Paulo Freitas、柳 鑄晟、郭 穎、鈴木礼子、李 敏啓：副甲状腺ホルモン間歇投与による前骨芽細胞の分化増殖について。第 22 回北海道骨粗鬆症研究会、北海道大学医学部臨床講義棟 大講堂、札幌、2010 年 1 月 23 日。

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

[http://www.den.hokudai.ac.jp/anatomy2/hokudai\\_d/index.html](http://www.den.hokudai.ac.jp/anatomy2/hokudai_d/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

李 敏啓 (LI MINQI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：60447612

(2) 研究分担者  
なし。

(3) 連携研究者  
なし。