

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659808

研究課題名(和文) 骨芽細胞系細胞に対するPTHとPTHrP作用の相違における新規アプローチ

研究課題名(英文) A new approach to the different biological function of PTH and PTHrP on osteoblastic cells

研究代表者

網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)

北海道大学・歯学研究科(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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺ホルモン(PTH)の間歇投与頻度が高い場合、前骨芽細胞の細胞増殖亢進および多数の破骨細胞形成を伴った活発な骨リモデリングが誘導され、また、投与頻度を下げると、前骨芽細胞の細胞増殖よりも骨芽細胞の骨基質合成が優位になることが明らかとなった。一方、同じ受容体に結合する副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)は骨髄ストローマ細胞や前骨芽細胞の増殖促進に作用するが、破骨細胞形成には大きく作用しない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that intermittent administration of PTH (parathyroid hormone) shows anabolic effects in bone, while continuous injection of PTH results in catabolic effects. When human PTH(1-34) was administered into mice with high frequency, actively-proliferating preosteoblasts, abundant osteoclasts and many mature osteoblasts forming bone matrices were observed, representing high bone turnover. However, when PTH(1-34) was administered with low frequency, preosteoblasts were not so proliferated, with less forming osteoclasts, and mature osteoblasts formed more bone. Meanwhile, the fetuses continuously overexpressing PTHrP (PTH-related peptide) showed a large number of preosteoblasts and bone marrow stromal cells without accompanying accelerated osteoclast formation, and a few mature osteoblasts formed bone matrix. Thus, PTH and PTHrP appear to differently show predominant effects to preosteoblastic and osteoblastic activities, despite their binding the common receptor.

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：副甲状腺ホルモン 副甲状腺ホルモン関連ペプチド 骨芽細胞 前骨芽細胞 骨リモデリング

1. 研究開始当初の背景

主要な骨代謝調節因子である副甲状腺ホルモン(PTH)および副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)は、共通の受容体(PTH/PTHrP受容体: PTH-R)に結合することが知られている。従って、これら PTHとPTHrP はともに同様の作用を示すことが報告されてきた。また、PTH に関しては、間歇投与で骨形成が優位に、また、持続注入で骨吸収が優位になることも知られている。

ところが、骨組織には、骨基質を合成する成熟した骨芽細胞の他に、その前駆細胞である前骨芽細胞が存在する。骨芽細胞は基質合成を行うが細胞増殖できず、一方、前骨芽細胞は細胞増殖できる細胞である。前骨芽細胞は、破骨細胞形成に重要な役割を果たす細胞であり、前骨芽細胞の数が増えることは、骨芽細胞に分化する細胞群のプールを増加させるとともに、破骨細胞形成系が亢進することも意味する。

同容量の PTHとPTHrP を投与した場合、血中カルシウム濃度を速やかに高い値まで上昇させることができるのは、PTHrP ではなく、PTHであるということが以前から知られており、ここに、PTHとPTHrP のターゲットは骨芽細胞や前骨芽細胞であるものの、それらの投与量・投与頻度が異なると、骨芽細胞による骨基質合成、または、骨髄ストローマ細胞を含めた前骨芽細胞による細胞増殖などへの作用が異なる可能性があげられる。

2. 研究の目的

本研究目的は、PTH と PTHrP のターゲットは骨芽細胞や前骨芽細胞であるにもかかわらず、それらの投与量・投与頻度が異なると、骨芽細胞による骨基質合成、あるいは、前骨芽細胞の細胞増殖への作用のどちらに影響を及ぼすのか明らかにすることである。そこで、PTHの間歇投与が骨形成を誘導することが知られていることから、その投与頻度を1回/2日、1回/1日、2回/1日、4回/1日と、2日1回から6時間ごとに1回の割合で humanPTH(1-34)をマウスに投与し、骨芽細胞と前骨芽細胞との作用を高頻度投与群(2回/1日、4回/1日)と低頻度投与群(1回/2日、1回/1日)に分けて

解析をすることを主要目的とした。

また、PTHrP は胎生期に様々な組織から合成されているが、PTH は充分量が分泌されていない。一方、成獣期では PTH 分泌は正常に行われるため、PTH 分泌がほとんど行われていないマウス胎仔に PTHrP 過剰発現を行い、PTHrP の恒常的な過剰分泌の状態を作成し、PTH の高頻度投与群の骨組織の状態と比較・検討した。

さらに、追加実験として、PTH、PTHrP 受容体(PTH-R)は、通常、二量体を形成することで機能するという報告がなされており、果たして PTH-R が二量体を形成しているのかタンパクレベルで検索した。

3. 研究の方法

生後6週齢雄性マウスに humanPTH(1-34)を4回/日、2回/日(以上、高頻度群)、1回/2日、1回/2日(以上、低頻度群)で2週間、腹腔内投与した。また、PTH の投与量として、1回の投与量が 80 μ g/kg または 20 μ g/kg の群、および、1日の総投与量が 80 μ g/kg または 20 μ g/kg となる群を作成した(各群 n=6)。

これらのマウスを2週間後に固定する4日前と1日前とでカルセイン投与し、その後、パラホルムアルデヒド固定を施し、通法にてパラフィンまたはエポキシ樹脂への包埋を行った。解析項目として、アルカリホスファターゼ(ALP)、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)、オステオカルシン、オステオポンチン、ならびに、PCNA(proliferating cell nuclear antigen)の組織化学を行った。また、一部のエポキシ樹脂包埋したサンプルは透過型電子顕微鏡観察を行い、カルセイン標識用には、MMA 包埋を行ったサンプルを薄切片とした後、蛍光顕微鏡観察を行った。

一方、PTHrP transgenic マウス作成は、骨芽細胞特異的 Col1a1 プロモーターに full length PTHrP cDNA を組み込んだベクターを作成し、マイクロインジェクションを卵子に行い、レシピエント母体マウスに移植した。胎生18日齢で大使を上記と同様の方法で固定し、同様の解析を行った。

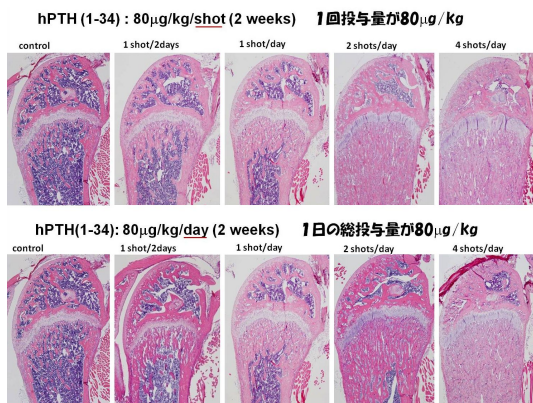
PTH-R の二量体形成については、野生型(正常)の PTH-R ならびに恒常活性を示すことで常にシグナルが送られる Jansen 型変異

PTH-R^{H223R} 遺伝子をそれぞれ Flag および HAtag を付けて、発現ベクターに組み込んだ。それらを HEK293T 細胞に遺伝子導入し、過剰発現させた。その後、同細胞からのサンプルを用いて、Western blot および免疫沈降、さらに human PTH(1-34)添加による cAMP 産生について解析した。

4. 研究成果

(1) PTH の間歇投与の頻度の違いが骨芽細胞および前骨芽細胞に及ぼす影響の違い

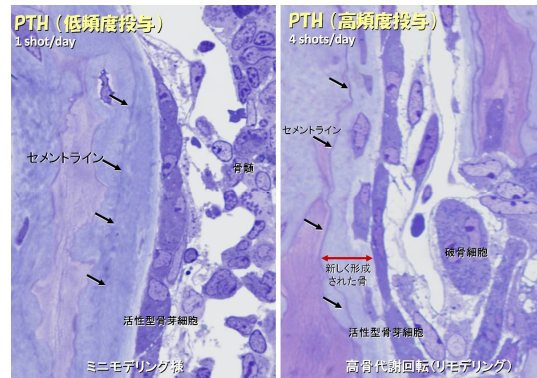
1回の投与量が 80 μ g/kg または 20 μ g/kg の群、および、1日の総投与量が 80 μ g/kg または 20 μ g/kg となる群を作成したが、2週間後における骨形成量は、PTH の1日当たり、または1回あたりの投与量による違いはほとんどなく、むしろ、PTH の投与頻度(1日に何回投与するか)に依存して、骨量が増加することが明らかになった。つまり、このことは、PTH の半減期が1時間にも満たないことから、PTH-R からのシグナル伝達の頻度が重要である可能性、また、投与した PTH はすでに生体内で過剰量となっている可能性が示唆された。



骨組織の顕微解析を行うと、PTH 高頻度投与群(2回/1日、4回/1日)では、多数の不規則な骨梁が形成されており、鋸歯状の骨表面やオステオポンチン・オステオカルシン陽性セメントラインを示していた。骨梁周囲には ALP 強陽性前骨芽細胞の厚い細胞層と多数の TRAP 陽性破骨細胞が局在したことから、活発な骨リモデリングが推測された。一方、PTH 低頻度投与群(1回/2日、1回/1日)では前骨芽細胞による細胞層はあまり発達せず、滑

らかな骨表面とセメントラインが認められ、比較的太い骨梁が形成されていた。また、前骨芽細胞層の発達が悪いことに伴って、破骨細胞形成の有意な亢進は認められなかった。

以上から、PTH 間歇投与による骨形成の機序は、その投与頻度によって、骨芽細胞または前骨芽細胞に与える影響がことなること、さらに、PTH の1日または1回投与量よりも、投与頻度が、これらの細胞群のどちらに優位に作用するか異なることが強く示唆された。



(2) PTH 高頻度投与と PTHrP 過剰発現マウスの比較

PTHrP 過剰発現マウス胎仔(成獣マウスでは比較が難しいため、上述参照)では、多数の前骨芽細胞が存在し、一方、骨基質合成を行う成熟骨芽細胞はあまり認められなかった。von Kossa 染色で石灰化骨基質を検索すると、野生型マウスに比べて、transgenic マウスの骨基質はごく僅かにしか形成されていないことが明らかにされた。また、厚い前骨芽細胞層が形成されているにも関わらず、破骨細胞の数は少なく、骨リモデリングがほとんど行われていないことが示唆された。

PTH と PTHrP が PTH-R に同じ親和性と活性を持って作用するという過去の論文、ならびに、PTHrP 過剰発現マウスでは常に PTHrP が産生されていることを考えると、今回の我々の所見は、PTH の高頻度投与は前骨芽細胞に対して、活発な細胞増殖と破骨細胞形成を誘導して高代謝回転を示す骨リモデリングを誘導するのに対して、PTHrP は前骨芽細胞の細胞増殖に作用するが、その後の破骨細胞形成や前骨芽細胞から成熟した骨芽細胞への分化は亢進しないか、抑制することが推察された。

以上から、PTH は高頻度で投与されると、骨

代謝回転を亢進させながら血中カルシウム濃度を上昇させるホルモンであるのに対して、PTHrP はいわゆる局所因子として機能するものであり、成熟した骨芽細胞よりも、前駆細胞である前骨芽細胞に作用する傾向が高い、つまり、前骨芽細胞のニッチ形成に作用すると推測された。

(3) PTH-R の二量体形成の相違と骨芽細胞および前骨芽細胞への作用

PTH-R の二量体形成でシグナルが伝えられることから、骨芽細胞および前骨芽細胞で PTH-R の二量体形成の度合いが異なっており、従って、PTH または PTHrP の作用が異なるのか作業仮説を立てた。

生体内の骨芽細胞と前骨芽細胞を分けて、PTH-R の二量体形成を検索する前段階の研究として、HEK293T 細胞に野生型(正常)の PTH-R ならび Jansen 型変異 PTH-R^{H223R} 遺伝子をそれぞれ Flag および HA tag を付けて、過剰発現させたところ、同じ分子量に Flag/HA tag で免疫沈降されるバンドを検出した。さらに human PTH(1-34) 添加で両方の PTH-R を発現させた細胞で高い cAMP 産生を示した。従って、PTH-R が二量体を形成したほうが効率よくシグナルを送ることができると考えられる。現在、PTH-R の二量体化は、骨芽細胞と前骨芽細胞とでどのようになっているのか、引き続き研究を継続している。

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 4件)

1. Hasegawa T., Amizuka N., Yamada T., Liu Z., Miyamoto Y., Yamamoto T., Sasaki M., Hongo H., Suzuki R., Freitas PHL., Yamamoto T., Oda K., Li M.: Sclerostin is differently immunolocalized in metaphyseal trabeculae and cortical bones of mouse tibiae. *Biomed Res.* 34(3):153-159, 2013.

2. Kojima T., Hasegawa T., Freitas PHL., Yamamoto T., Sasaki M., Horiuchi K., Hongo H., Yamada T., Sakagami N., Saito N., Yoshizawa M., Kobayashi T., Maeda T., Saito C., Amizuka N.: Histochemical aspects for vascular invasion at the erosion zone of epiphyseal cartilage in MMP-9 deficient mice. *Biomedical Res.* 34(3):119-128, 2013.
3. Amizuka N., Hasegawa T., Oda K., Freitas PHL., Hoshi K., Li M., Ozawa H.: Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification. *Front Biosci.* 4:2085-2100, 2012.
4. Amizuka N., Sasaki M., Hongo H., Hasegawa T., Yamada T., Yamamoto T., Freitas PHL., Li M.: The biological function of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in osteoblastic cells. *Progress in Photonics: Materials, Nano-and Bio-Imaging, and Communications* 65-69, 2012.

[学会発表](計 6件)

1. 山本知真也、佐々木宗輝、長谷川智香、網塚憲生: 副甲状腺ホルモン(PTH)間歇投与における投与量・投与頻度が骨形成に及ぼす影響について. 第15回日本骨粗鬆症学会 骨ドック・健診分科会 大阪 2013年10月11-13日 *Osteoporosis Jpn.* 21(suppl 1): 255, 2013.
2. 山本知真也、佐々木宗輝、本郷裕美、長谷川智香、山田珠希、山本恒之、網塚憲生: 副甲状腺ホルモン間歇投与の頻度が骨の細胞動態に及ぼす影響について. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会 岡山 2013年9月20-22日 *J Oral Biosci.* 55(suppl):119, 2013.
3. 本郷裕美、山田珠希、宇田川信之、網塚憲生: 副甲状腺ホルモン投与による骨

細胞周囲の骨基質改変について. 第
55 回歯科基礎医学会学術大会・総会
岡山 2013 年 9 月 20-22 日 *J Oral
Biosci.* 55(suppl):119, 2013.

4. 山本知真也、佐々木宗輝、本郷裕美、田
中祐介、長谷川智香、山田珠希、山本恒
之、網塚憲生: 副甲状腺ホルモンの間
歇投与頻度が骨の細胞群に及ぼす作用
-モデル動物を用いた形態学的検索- .
第33回日本骨形態計測学会 浜松
2013年7月4-6日 日本骨形態計測学会
雑誌 23(1):S83, 2013.
5. 本郷裕美、山田珠希、山本知真也、中野
貴由、宇田川信之、網塚憲生: 副甲状
腺ホルモン投与による骨細胞性骨溶解
に関する微細構造学的検索. 第 33 回
日本骨形態計測学会 浜松 2013 年 7
月 4 日-7 月 6 日 日本骨形態計測学会
雑誌 23(1):S26, 2013.
6. 下村 - 黒木淳子, 竜 佑宗, 松田貴絵,
田中聖至, 織田公光, 網塚憲生: Jansen
型 PTH/PTHrP 受容体の機能異常の解
析, 第 54 回歯科基礎医学会学術大会な
らびに総会, 平成 24 年 9 月 14-16 日, 郡
山, *J Oral Biosci.* 55(suppl): 165, 2012.

〔図書〕(計 1 件)

1. 網塚憲生 第10章 顎骨 口腔組織発
生学 第2版 (脇田 稔、前田健康、中
村浩彰、網塚憲生 編) 医歯薬出版株
式会社 東京 印刷中

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：30242431

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし