

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670797

研究課題名(和文)骨細胞ネットワークを介したPTH新規作用 - ミニモデリングと骨基質溶解・石灰化 -

研究課題名(英文) Novel biological actions of PTH mediated by osteocyte network - mini-modeling and osteocytic osteolysis

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨における副甲状腺ホルモン(PTH)の二つの作用について検索を行った。第一点は、PTHの高頻度投与では多数の骨梁が誘導されるが、PTHの低頻度投与では骨梁数が増加しないものの、骨梁幅が増加することを明らかにした。前者は活発な骨リモデリングに依存する一方、後者はミニモデリング(破骨細胞の骨吸収に依存しない骨形成)と骨リモデリングの両方に依存することが推察された。第二点は、PTH投与後短時間において、骨細胞はその周囲の骨基質を溶解(骨細胞性骨溶解)し、また、再石灰化する可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have attempted to clarify the bipartite biological action of parathyroid hormone (PTH) on bone metabolism, -anabolic effects and osteocytic osteolysis. We have examined PTH-driven anabolic effects in mice at the regimens of high and low frequent administration. As a consequence, the high frequent PTH administration formed many trabeculae, whereas the low frequent administration induced thick trabeculae; the former seemed to be caused by accelerated bone remodeling, while the latter is resulted from both bone remodeling and mini-modeling (a manner of bone formation independent of osteoclastic bone resorption). Unlike the anabolic effect of PTH, enlarged osteocytic lacunae were observed after several hours of PTH administration - osteocytic osteolysis -, and then, calcium phosphates were deposited on walls of the once-enlarged lacunae.

研究分野：口腔組織学

キーワード：PTH 骨形成 骨細胞 骨細胞性骨溶解 ミニモデリング 骨リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、「骨細胞ネットワークを介した PTH 新規作用」として、次の二つの可能性について探索を進めた。第一点は、副甲状腺ホルモン (PTH) の間歇投与は、骨リモデリングだけではなくミニモデリング (破骨細胞の骨吸収に依存しない骨形成) を誘導することで、骨量増加を生じさせる可能性、第二点は、PTH 投与短時間において、骨細胞周囲の骨基質が溶解する可能性 (骨細胞性骨溶解) である。

第一点の背景としては、骨細胞ネットワークが骨芽細胞を抑制するスクレロステチンを産生すること、また、オステオプロテジェリンや RANKL を産生することで、破骨細胞形成の調節を行う可能性が報告されてきたことにある。また、我々は、以前の研究で、PTH 間歇投与における骨リモデリングは、破骨細胞の存在が必要であること、つまり、破骨細胞とのカップリンが成立しない状況では、骨リモデリングでは骨形成が誘導されないことを報告している。

第二点の背景としては、1960 年代に Belanger が osteocytic osteolysis (骨細胞性骨溶解) を提言してから、その可能性を指摘する報告が増えており、また、近年の観察機器の解像度が優れていることから、最新の機器を用いて解析することで、骨細胞性骨溶解の有無を明らかにできるものと考えた。

## 2. 研究の目的

PTH は間歇投与 (反復投与) による骨形成効果を有する一方で、一次的に骨細胞周囲の骨小腔を拡大させる可能性が論じられており、これらの現象を *in vivo* で解き明かすことにより、PTH の骨代謝に対する作用を明らかにすることを今回の目標とした。当初の具体的な計画 (研究期間内に何をどこまで明らかにするか) については、1) PTH が骨細胞ネットワークを介してミニモデリングを制御する現象 (PTH の骨形成メカニズム)、2) PTH が骨細胞周囲の骨基質を溶解・再石灰化する現象 (PTH の短期作用) を掲げた。

その結果、当初予定した研究を期間内に遂行でき、予想を上回る所見を得ることができた (以下、研究成果を参照)。平成 28 年 5 月の段階で、1) については、Endocrinology に accept、および、Odontology に in press であり、2) については、論文作成中である。

## 3. 研究の方法

### 1) PTH が骨細胞ネットワークを介したミニモデリングについて

モデル動物としては、野生型マウスに human PTH(1-34) 間歇投与を、2日に1回、1日に1回、2回、4回とし、投与量を 20 $\mu$ g/kg/day, 20 $\mu$ g/kg/dose, 80 $\mu$ g/kg/day, 80 $\mu$ g/kg/dose の計 16 群のモデルマウス (各群 6 匹) を作製して行うとともに、各種の組織化学、ならびに、microCT による三次元構造解析および光顕・電顕レベルに

て解析した。また、ミニモデリング誘導の解析としては、破骨細胞性骨吸収を誘導せず (前骨芽細胞の増殖・RANKL 発現抑制および骨細胞の RANKL 発現抑制)、bone lining cell を活性型骨芽細胞に誘導 (骨細胞によるスクレロステチン発現抑制)、骨形成をミニモデリングの定義に沿った arrest line の有無および連続なカルセイン標識の観察を行った。

### 2) PTH が骨細胞周囲の骨基質を溶解・再石灰化する可能性について

骨細胞周囲の骨溶解・石灰化現象については、野生型マウスと破骨細胞の存在しない RANKL<sup>-/-</sup> マウスを用いた。これらマウスに PTH(40 $\mu$ g-120 $\mu$ g/kg) を 1 回投与し、経時的に骨細胞周囲基質の溶解について、von Kossa 染色や透過型電子顕微鏡にて解析する一方、腎臓型 V-ATPase (d-subunit) などの免疫組織化学、および、原子間力顕微鏡を用いた骨基質のナノインデンテーションを行った。さらに、骨細胞周囲の再石灰化現象について、<sup>42</sup>Ca/<sup>44</sup>Ca を用いた同位体顕微鏡による探索を行った。

## 4. 研究成果

### 1) PTH が骨細胞ネットワークを介したミニモデリングについて

野生型マウスに human PTH(1-34) 間歇投与を、2日に1回、1日に1回、2回、4回、PTH の投与量 (1 か月間投与) を 20 $\mu$ g/kg/day, 20 $\mu$ g/kg/dose, 80 $\mu$ g/kg/day, 80 $\mu$ g/kg/dose のモデルマウスを作製したところ、PTH 投与頻度の高い群 (PTH を 1 日に 2 回または 4 回) では、多数の骨梁が形成されていたが、骨梁幅はコントロール群とあまり変わらなかった。一方、PTH 投与頻度の低い群 (PTH を 2 日に 1 回、または、1 日に 1 回) では、骨梁数は高頻度群に比べて有意に高い値を示さなかったが、太い骨梁幅を示した。よって、PTH 投与頻度が異なると、形成される骨の形態も異なることが強く示唆された。

骨細胞ネットワークが産生するスクレロステチンと FGF23 の局在を検討すると、PTH 投与頻度が高くなるほど、FGF23 陽性骨細胞が増加し、さらに、骨芽細胞も FGF23 陽性を示した (ただし、血中リン濃度は変化せず)。ところが、骨芽細胞抑制を示すスクレロステチン陽性骨細胞の数については、低頻度投与群と高頻度投与群において有意差を見出すことはできなかった。

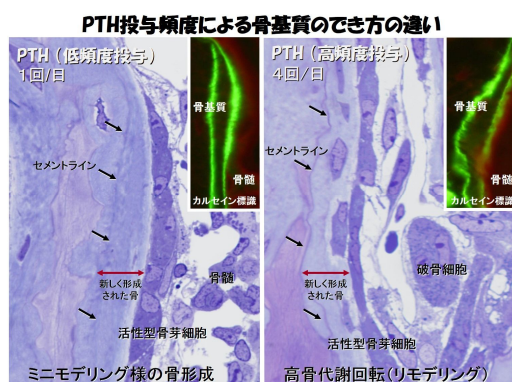
一方、局所的に膨隆した新生骨 (カルセイン標識) および arrest line などの特徴づけられるミニモデリングは、PTH 低頻度投与群で観察されたが、PTH 高頻度投与群では認められなかった。

その組織像を比較すると、PTH 高頻度投与群では、厚い前骨芽細胞層が発達しており、その中に多数の破骨細胞および破骨細胞前駆細胞と思われる細胞が局在したが、PTH 低頻度投与群では、前骨芽細胞層は発達せず、そのため、破骨細胞の数は上昇しなかった。このように、前骨芽細胞や破骨細胞の形成が亢進しない環境でミニモデリングが誘導されていると推察され

た。

我々はPTHを1回投与して、その後の様々な因子の発現について解析した。その結果、骨細胞から産生されるスクレロスチンは、一過性に発現が低下したが、その後、徐々に発現が回復した。また、破骨細胞誘導因子であるRANKLは一次的に発現が上昇したが、すぐに低下した。その一方、Runx2/osterixは一度上昇したあと、ある程度、持続し緩やかに低下することが明らかとなった。よって、組織化学的に、PTH間歇投与を1か月間行った段階では、スクレロスチン低下は認められなかったものと推察された。

以上、PTHの高頻度投与では多数の骨梁が誘導されること、しかし、PTHの低頻度投与では多数の骨梁が形成されないが、骨梁幅が増加することが強く示唆された。これらの原因として、骨形成メカニズムが、前者は活発な骨リモデリングに依存する一方、後者はミニモデリングと骨リモデリングの両方に依存すると推察された(下図)。



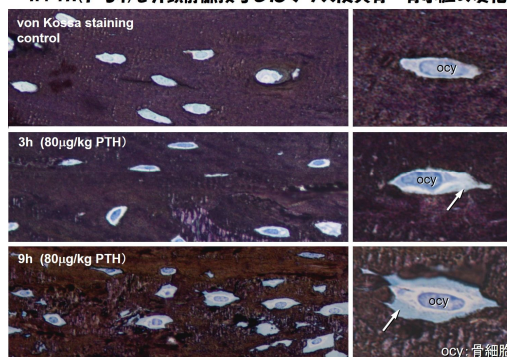
## 2) PTHが骨細胞周囲の骨基質を溶解・再石灰化する可能性について

野生型マウスとRANKL<sup>-/-</sup>マウスにPTH(40μg-120μg/kg)を1回投与し、経時的に骨細胞周囲骨基質の溶解について、von Kossa染色や透過型電子顕微鏡にて解析したところ、野生型マウスもRANKL<sup>-/-</sup>マウスも、PTH投与後には経時的に骨小腔が徐々に拡大していた。また、von Kossa染色で観察すると、有機性の骨基質(骨ミネラルが流出した骨基質)が露出してゆく様を観察することができた。さらに、V-ATPaseのd2-subunitの免疫染色をすると、PTH投与群では、いくつかの骨細胞にd2-subunit陽性反応を見出すことができた。よって、PTH投与後に、骨細胞が酸分泌を介して、周囲の骨ミネラルを脱灰している可能性が示唆された。さらにRANKL<sup>-/-</sup>マウスにおいて、このような現象が観察されたことは、PTH投与後に骨小腔が拡大する機序として、破骨細胞が分泌する基質分解酵素や酸による可能性を排除できるものと推察された。

ところが、PTH投与後に骨小腔の拡大を示した骨細胞は、骨幹端の一次骨梁などではなく、骨細胞ネットワークが規則的に張り巡らされている成熟骨である皮質骨に存在すること、また、すべての骨細胞が同様にPTHに反応して骨小腔

を拡大させるのではなく、グループを形成しているいくつかの骨細胞ネットワークであることも明らかになった(右図)。

h PTH(1-34)を外頸静脈投与したマウス皮質骨・骨小腔の変化



そこで、顕微鏡的に可視化できない変化が骨細胞周囲にあると推察し、骨小腔周囲の骨基質において、原子間力顕微鏡を用いたナノインデントーションを行った。その結果、PTH投与後の骨小腔周囲の骨基質における弾性率が低下していることが明らかとなった。このことは、組織学的に骨小腔周囲の骨基質ミネラルが流出しているにもかかわらず、基質の僅かな変化がその物性に影響を与えることが推測された。

さらに、骨細胞周囲の再石灰化現象を明らかにするために、PTH投与後のマウスに<sup>42</sup>Caまたは<sup>44</sup>Caを給餌し、これら安定同位体の骨小腔周囲の分布を同位体顕微鏡で検索した。その結果、PTH直後に骨基質ミネラルが流出したと思われるか所に、新たに<sup>42</sup>Caまたは<sup>44</sup>Caが蓄積している像を観察することができた。

以上より、骨細胞は、PTH投与後の短期間に、その周囲の骨基質を溶解、また、再石灰化する能力を有していると推察された。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計7件)

1. Yamamoto T., Hasegawa T., Sasaki M., Hongo H., Tsuboi K., Shimizu T., Ohta M., Haraguchi M., Takahata T., Oda K., Freitas PHL., Takakura A., Takao-Kawabata R., Isogai Y., Amizuka N.: Frequency of teriparatide administration affects the histological pattern of bone formation in mice. *Endocrinology*, in press <http://press.endocrine.org/toc/endo/0/0#early-release>
2. Simomura-Kuroki J., Farooq M., Sekimoto T., Amizuka N., Simomura Y.: Characterization of a PTH1R missense mutation responsible for Jansen type metaphyseal chondrodysplasia. *Odontology*, in press. DOI 10.1007/s10266-016-0247-4

3. Liu Z., Yamamoto T., Hasegawa T., Hongo H., Tsuboi K., Tsuchiya E., Haraguchi M., Abe M., Freitas PHL., Kudo A., Oda K., Li M., Amizuka N.: Immunolocalization of osteocyte-derived molecules during bone fracture healing of mouse ribs. *Biomed Res.* 37(2):141-151, 2016. DOI: 10.2220/biomedres.37.141.
  4. Azuma K., Shiba S., Hasegawa T., Ikeda K., Urano T., Horie-Inoue K., Ouchi Y., Amizuka N., Inoue S.: Osteoblast-Specific  $\gamma$ -Glutamyl Carboxylase-Deficient Mice Display Enhanced Bone Formation with Aberrant Mineralization. *J Bone Miner Res.* 30(7):1245-1254, 2015. DOI:10.1002/jbmr.2463.
  5. Liu H., Guo J., Wei S., Lv S., Feng W., Cui J., Hasegawa T., Hongo H., Yang Y., Li X., Oda K., Amizuka N., Li M.: Expression of matrix Gla protein and osteocalcin in the developing tibial epiphysis of mice. *Histol Histopathol.* 30(1):77-85, 2015. DOI: 10.14670/HH-30.77
  6. Saito M., Grynpas MD., Burr DB., Allen MR., Smith SY., Doyle N., Amizuka N., Hasegawa T., Kida Y., Marumo K., Saito H.: Treatment with eldcalcitol positively affects mineralization, microdamage, and collagen crosslinks in primate bone. *Bone.* 73:8-15, 2015. DOI: 10.1016/j.bone.2014.11.025.
  7. Tabata C., Hongo H., Sasaki M., Hasegawa T., Freitas PHL., Yamada T., Yamamoto T., Suzuki R., Oda K., Li M., Yamamoto T., Kudo A., Iida J., Amizuka N.: Altered distribution of extracellular matrix proteins in the periodontal ligament of periostin-deficient mice. *Histol Histopathol.* 29(6):731-742, 2014. DOI: 10.14670/HH-29.731
- [学会発表] (計 13 件)
1. Hongo H., Sasaki M., Saito M., Udagawa N., Amizuka N.: Histochemical examination on bone matrix surrounding osteocytic lacunae in mice with PTH administration and in lactating mice fed with calcium insufficient diet. Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS) 2015 Joint ANZBMS, MEPSA and MBSANZ Annual Scientific Meeting, Hobart, Tasmania, 2015.11.1-4, Program & Abstracts: 63, 2015. ホバート (オーストラリア)
  2. Hongo H., Sakai S., Yamoto T., Hasegawa T., Takeda S., Endo K., Saito H., Amizuka N.: Histochemical examination on bone of postmenopausal model rats with switched administration from PTH to eldcalcitol. The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2015 Annual Meeting, Seattle, USA, 2015, 10.9-12, Program & Abstracts: 179, 2015. シアトル (アメリカ合衆国)
  3. Hongo H., Sasaki M., Saito M., Udagawa N., Amizuka N.: Histochemical examination on osteocytes and their lacunae after PTH administration or during lactation of mice fed with calcium deficient diet. The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2015 Annual Meeting, Seattle, USA, 2015, 10.9-12, Program & Abstracts: 83, 2015. シアトル (アメリカ合衆国)
  4. 山本知真也、長谷川智香、本郷裕美、原口真衣、織田公光、網塚憲生: PTH の投与頻度の違いによるリモデリング・ミニモデリングを基盤とした骨形成. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 新潟 2015 年 9 月 11-13 日 プログラム・抄録集: 199, 2015. 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)
  5. 網塚憲生、長谷川智香、坪井香奈子、本郷裕美、原口真衣、山本知真也: オーバービュー: 骨を観る - 組織化学・微細構造学からバイオイメージングへの展開 - . サテライトシンポジウム 6 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 新潟 2015 年 9 月 11-13 日 プログラム・抄録集: 98, 2015. 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)
  6. 網塚憲生、山本知真也、本郷裕美、長谷川智香: 細胞組織学からみた骨粗鬆症治療薬の作用機序. シンポジウム 2 第 35 回日本骨形態計測学会 倉敷 2015 年 6 月 4-6 日 プログラム・抄録集: S47, 2015. 倉敷市芸文館 (岡山県・倉敷市)
  7. Amizuka N., Hasegawa T., Hongo H., Yamamoto T.: Histological aspects on the biological function of osteocytes. 13<sup>th</sup> Congress of the International Society of Bone Morphometry, Tokyo, Japan, 2015.4.27-29, Program & Abstracts :20, 2015. パレスホテル東京 (東京都・千代田区)
  8. 本郷裕美、佐々木宗輝、齋藤雅美、宇田川信之、網塚憲生: 副甲状腺ホルモン投

与後、または、カルシウム欠乏食で飼育されたマウスの授乳期における骨小腔周囲の骨基質の組織学的検索。第120回日本解剖学会総会・全国学術集会第92回日本生理学会大会合同大会 プログラム・抄録集:S185, 2015. 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

9. Yamamoto T., Hasegawa T., Sakai S., Takeda S., Oda K., Li M., Endo K., Amizuka N.: Effects of the Combination of Eldecacitol, an Analog of Active Vitamin D3, and Parathyroid Hormone in Ovariectomized Rat Bones. The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2014 Annual Meeting, Houston, USA, 2014.9.12-15, Program & Abstracts: S314, 2014.ヒューストン(アメリカ合衆国)
10. Hasegawa T., Saito M., Doyle N., Chouinard L., Smith SY., Yamamoto T., Oda K., Saito H., Amizuka N.: ASBMR 2014 Annual Meeting, Plenary Poster Session: Eldecacitol, a new-generation vitamin D3 analog, increases trabecular bone via “minimodeling” in ovariectomized cynomolgus monkeys. The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2014 Annual Meeting, Houston, USA, 2014.9.12-15, Program & Abstracts: S106, 2014.ヒューストン(アメリカ合衆国)
11. 網塚憲生: 副甲状腺ホルモン製剤に対する骨の細胞群の反応 - 組織学的知見 - 。イブニングセミナー2-1 第32回日本骨代謝学会学術集会 大阪 2014年7月24-26日 プログラム・抄録集:193, 2014. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
12. 網塚憲生、本郷裕美、坪井香奈子、山本知真也、長谷川智香: 骨細胞・骨細管系における形態学的アプローチ。カレントコンセプト 5-1 骨代謝制御における骨細胞の役割 第32回日本骨代謝学会学術集会 大阪 2014年7月24-26日 プログラム・抄録集:163, 2014. 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
13. 山本知真也、田中祐介、長谷川智香、坂井貞興、武田 聡、本郷裕美、佐々木宗輝、遠藤弘一、網塚憲生: 骨粗鬆症モデルラットを用いた副甲状腺ホルモン(PTH)とエルデカルシトール併用投与の効果。第34回日本骨形態計測学会 札幌 2014年6月12-14日 日本骨形態計測学会雑誌 24(2):S109, 2014. さっぽろ芸文館(北海道・札幌市)

(図書)(計5件)

1. 網塚憲生、長谷川智香、原口真衣、山本知真也、本郷裕美: 5.モデリングとリモデリングの違いは何ですか「骨」を知る53の質問~ウェルエイジングをサポートするために~」編集:太田博明 医薬ジャーナル社 東京 pp.24-27, 2015.
2. 網塚憲生、長谷川智香: 骨・硬組織の染色法・微細構造解析 第3部3章 keyword (2)(3) 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典 日本骨代謝学会・編集 羊土社 東京 pp.304-309, 2015.
3. 網塚憲生、長谷川智香: 軟骨内骨化と膜性骨化 第1部 概説4 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典 日本骨代謝学会・編集 羊土社 東京 pp.30-35, 2015.
4. 網塚憲生、長谷川智香: モデリング、リモデリングとミニモデリング 第1部 概説5 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典 日本骨代謝学会・編集 羊土社 東京 pp.36-41, 2015.
5. 網塚憲生、長谷川智香、山本知真也、宮本幸奈、佐々木宗輝、本郷裕美: ビタミンDの作用 活性型ビタミンD3製剤(エルデカルシトール)による骨リモデリング制御 編者:岡野登志夫「ビタミンDと疾患改訂版 -基礎の理解と臨床への応用-」 医薬ジャーナル社 東京 pp.88-99, 2014.

[産業財産権]

○出願状況(計 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 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

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