

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17011

研究課題名(和文)骨細胞の骨基質ミネラル維持・流出におけるPTHとビスホスホネートの相違的機序

研究課題名(英文) Distinction in the mechanism for administration of PTH and bisphosphonate in bone mineral metabolism induced by osteocytes

研究代表者

本郷 裕美 (Hongo, Hiromi)

北海道大学・歯学研究院・学術研究員

研究者番号：00778970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PTHを投与したマウスでは骨小腔周囲におけるリン酸カルシウムの溶出により、骨小腔の拡大が認められた。しかし、PTH投与後にカルセインや⁴²Ca安定同位体を投与したマウスの骨基質を観察すると、一度、骨小腔周囲のリン酸カルシウムが溶出した部位に、新たにカルシウムが沈着することが強く示唆された。このことから、骨細胞がPTHに反応して可逆的にリン酸カルシウムを溶出・沈着する可能性が推察された。一方、ALN投与でも同様に骨小腔の拡大が認められたが、PTH投与とは異なり、骨細胞のダメージや骨細胞ネットワークにおける細胞突起の断裂などが観察されたことから、不可逆的な抑制現象であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副甲状腺ホルモン(PTH)およびビスホスホネート製剤の1つであるアレンドロネート(ALN)は骨粗鬆症の治療薬、あるいは転移性骨腫瘍による骨吸収抑制剤として広く使用されている薬剤である。しかしその一方で、これらの薬剤が骨細胞に及ぼす影響について明らかにした報告はほとんどない。したがって、これらの頻用性の高い薬剤が及ぼす骨ミネラル代謝を明らかにすることは、今後の薬剤の使用において大きな意義をなすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：PTH-administered mice showed an outflow of bone minerals in the periphery of the osteocytic lacunae, resulting in the enlargement of the lacunae. However, when mice were injected with calcein or ⁴²Ca (stable Ca isotope) after the PTH administration, thus treated mice demonstrated calcium deposition onto the peripheral region of the osteocytic lacunae which previously showed an outflow of bone minerals. Therefore, PTH appears to reversibly erode and deposit calcium phosphates in the periphery of the osteocytic lacunae. In contrast, after ALN administration, many osteocytes seemed to be damaged, and the connectivity by cytoplasmic processes of osteocytic network was disrupted. Taken together, osteocytes seem to respond to PTH to erode and deposit calcium phosphates onto the lacunae, while osteocytes would be damaged by an excess amount of ALN, disrupting the connectivity of cytoplasmic processes of their network.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 骨細胞性骨溶解 PTH ビスホスホネート

1. 研究開始当初の背景

骨細胞の骨基質ミネラル維持・流出における PTH とビスホスホネートの相違的機序

申請者はこれまでに骨細胞に着目して研究を行ってきた。骨細胞は骨芽細胞が自ら産生した骨基質中に埋め込まれた細胞であり、骨小腔に局在する。骨細胞は細胞突起を伸ばし、骨基質表面に存在する骨芽細胞や隣り合う骨細胞同士とギャップ結合を介して連絡することで、骨基質中に無数に張り巡らされた機能的細胞ネットワーク(骨細胞・骨細管系)を形成している。骨幹端骨梁の骨細胞は形が丸く、配列も不規則であるのに対し、皮質骨の骨細胞は扁平な紡錘形を呈し、骨表面に対して平行に配列している。また、骨細胞・骨細管系は幼弱な骨幹端骨梁よりも、成熟骨である皮質骨において規則的配列を示すことがわかっている。

近年、骨細胞はメカニカルストレスを感知するメカニカルセンサーとして働くことが示唆されており、メカニカルストレスに応じた骨改造を可能にするには骨表面に局在する骨芽細胞だけでは不十分であること、骨基質内部に規則的に配列した骨細胞・骨細管系が必要であることが明らかとなっている。さらに骨細胞は血中リン濃度を低下させる FGF23 産生や sclerostin、また、Rankl を発現することで骨代謝調整を行うことが明らかとなっており、現在、注目を集めている細胞である。

申請者はこれまでに 1960 年代に Bélanger によって提唱された、副甲状腺ホルモン(PTH)の投与あるいは低Ca食給餌によって引き起こされる骨細胞性骨溶解(osteocytic osteolysis)について明らかにしてきた。これまでの実験として、野生型マウスおよび破骨細胞が存在しない Rankl^{-/-}マウスに外頸静脈から hPTH[1-34](80µg/kg)を投与し、皮質骨の骨細胞を観察した。すると、骨小腔は拡大するとともに、その外形は凹凸を示し、骨小腔内部には断片的な石灰化物や分解されたコラーゲン線維と思われる不定形構造物が認められた。さらに骨小腔周囲の骨基質を原子間力顕微鏡によるナノインデンテーションによりトポロジーと弾性係数を計測すると、PTH 投与で骨小腔周囲の弾性係数が低下し、物理的に脆弱化していることを明らかにしてきた。

したがって、申請者は、骨細胞・骨細管系は骨基質溶解能を有し、骨ミネラルの維持・調整を行う可能性があるかと推察している。

しかし一方で、申請者は、ビスホスホネート(アレンドロネート)投与によっても、骨小腔と骨細管の拡大、ならびに、骨細胞の細胞突起の短縮および骨細胞ネットワークの断裂を観察している。このことは申請者にとって想定していなかった現象であり、本研究では、PTH で誘導される骨小腔の拡大とアレンドロネート投与で誘導される骨小腔の拡大とを比較する研究計画を立てた。

なお、ビスホスホネート製剤でも、アレンドロネートはハイドロキシアパタイトとの親和性が高く骨吸収面に集積するのに対し、ミノドロネートは酸性環境においてハイドロキシアパタイトと結合せず、骨形成面に局在する性質を持つ骨小腔の拡大を誘導しなかった。そこで申請者は、ハイドロキシアパタイトとの結合性が高いアレンドロネートによる骨小腔の拡大機序と PTH による骨小腔の拡大機序は異なるのではないかと推察している。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに、副甲状腺ホルモン(PTH)投与あるいは授乳期による血中カルシウム欠乏によって骨細胞が周囲の骨基質を溶解し(骨細胞性骨溶解)その後、石灰化沈着を誘導する潜在的可能性を示唆してきた。本研究では、申請者のこれまでの研究をさらに展開し、骨細胞による骨溶解には2つの経路、つまり、生理学的に血中カルシウム調節因子、つまりホルモンとして機能している PTH による可逆的反応(骨小腔基質の溶解と石灰化)および、本来、生体には存在しないビスホスホネートなどによる不可逆的作用(骨小腔溶解・拡大のみ)の可能性について研究目的を定めた。

3. 研究の方法

以下のマウスを作成し、組織学的・微細構造学的に解析した。

- ・ PTH (80µg/kg) をマウス外頸静脈から投与し 3, 6, 9 時間後のマウス
- ・ アレンドロネート (1mg/kg) をマウス外頸静脈から 1 回投与し 12, 24, 36, 48, 72, 96 時間および 10 日後のマウス
- ・ アレンドロネート (1mg/kg) を 10 日間連続腹腔内投与したマウス

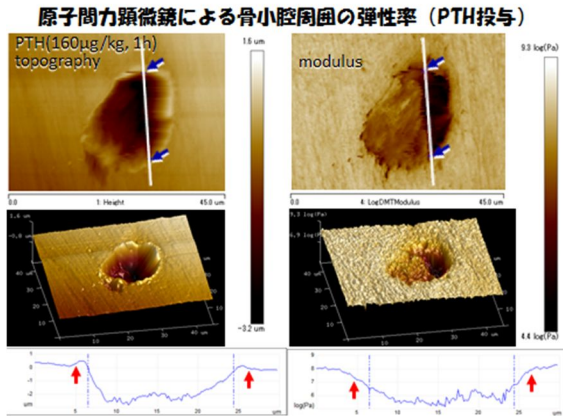
上記3種類のマウスの大腿骨・脛骨を摘出し、骨細胞と骨小腔を各種の組織化学、透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscopy: TEM)や原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy: AFM)などによる微細構造・ナノインデンテーション解析のほか、骨細胞の細胞骨格や細胞外基質の微細分布を STED/SIM といった超高解像共焦点レーザー顕微鏡などで検索したところ、以下の(1)~(3)の研究成果が得られた。

4. 研究成果

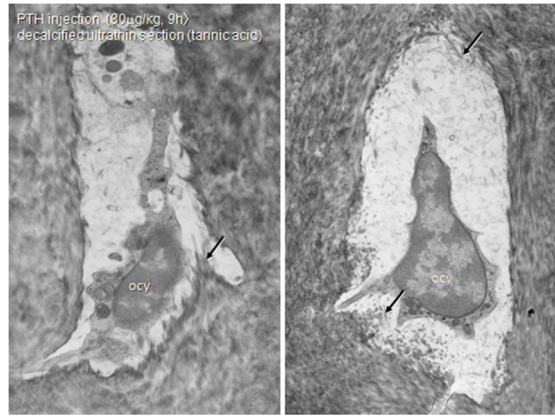
(1) PTH およびアレンドロネート投与マウスにおける骨細胞周囲の骨基質の変化について

PTH 投与後の骨小腔周囲の骨基質の変化

PTH 投与 1 時間後の骨細胞周囲の骨基質を AFM にて観察すると、骨小腔の外形は変化せずとも、骨小腔周囲の弾性率が低下していることがわかった(図 1)。さらに PTH 投与 9 時間後の骨小腔周囲の骨基質を、石灰化をみることができる von Kossa 染色にて観察すると、骨小腔周囲に青く抜けた未石灰化基質が露出していた。さらに同様の部位を TEM 観察すると、骨小腔壁は粗造となり凹凸を示し、やや拡大し、拡大した骨小腔内部には石灰化物の断片やコラーゲン線維が分解したと思われる綿毛状の不定形構造物が観察された(図 2)。

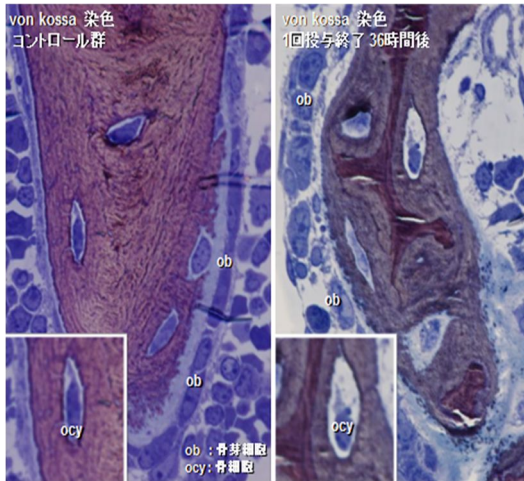


(図 1)



(図 2)

アレンドロネート投与後の骨小腔周囲の骨基質の変化



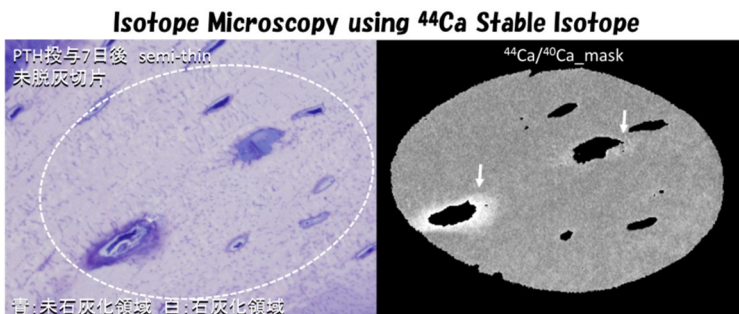
(図 3)

アレンドロネートを単回投与すると、投与後 36 時間で骨小腔周囲はやや拡大し、骨細胞も自身も萎縮していることが認められた(図 3)。さらに TEM 観察すると骨細胞と骨小腔の間に間隙が見られるものや、骨小腔内にコラーゲン線維の短編が見られるものが存在し、骨細胞は細胞内小器官が乏しくなっていた。

さらに骨細胞から伸びる細胞突起も細くなっており、骨細管と細胞突起の間隙が拡大しているのが観察された。骨細胞のアクチン線維をローダミン・ファロイジンにて染色し、また、コンドロイチン 4 硫酸の免疫染色を施し STED にて観察すると、アレンドロネート単回投与後、経時的に骨細胞の細胞突起のコンドロイチン 4 硫酸の陽性反応は減弱し、アクチン陽性の細胞突起が断裂していることが観察された。

(2) PTH 投与後の骨小腔周囲へのカルシウムの沈着

PTH 投与して 5 日後から 7 日後の間に安定同位元素である ^{44}Ca を含んだ餌を給餌し、同位体顕微鏡にて観察すると、骨小腔周囲に ^{44}Ca 安定同位体の沈着を同位体顕微鏡にて観察した(図 4)。



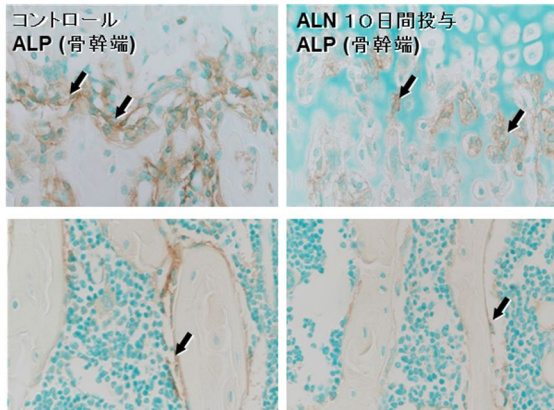
(図 4)

準超薄切片では骨小腔の外形はいびつな形を呈しているが、そのいびつな形をした骨小腔周囲に ^{44}Ca 安定同位体が沈着していることから、骨基質が一度溶解し、その後、カルシウム沈着が誘導されていることが示唆された。

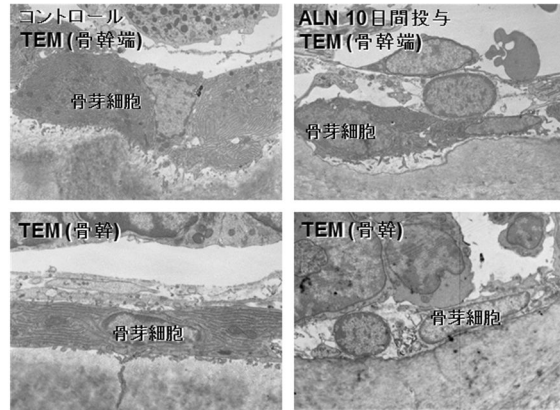
(3) アレンドロネート投与後の変化

アレンドロネート 10 日間連続投与後、骨芽細胞の活性を ALP 染色にて検索すると、それらの骨芽細胞は ALP 陽性反応が著しく減弱していることが示された (図 5)。

さらに TEM にて骨芽細胞の微細構造を観察すると、コントロール群の骨芽細胞はふくよかな丸い形を呈し細胞内小器官が発達しているのに対し、アレンドロネート投与群の骨芽細胞では細胞形態が扁平となり、細胞内小器官も減少し活性が落ちていることが示唆された (図 6)。

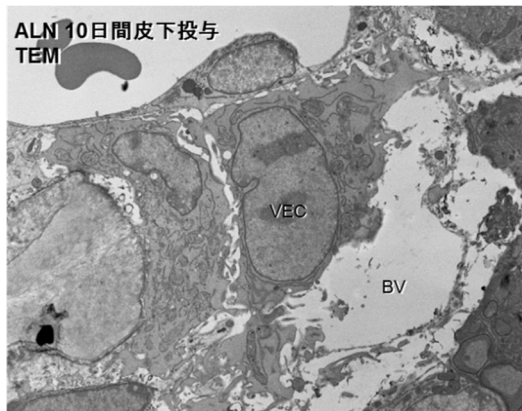


(図 5)



(図 6)

骨特異的血管のマーカである endomucin の検索を行うと、アレンドロネート単回投与・10 日間連続投与ともに endomucin 陽性の血管の数・血管腔の大きさともに継時的に減少していることが明らかになった。



(図 7)

さらに TEM 観察すると、血管壁が厚く粗造であり、血管内皮細胞が血管内腔に向かって小突起を伸ばしていた。また、肥厚した血管壁の一部には、小型のミトコンドリアや小胞が観察された。また血管内皮細胞内皮は、周囲に向かって細胞突起を伸ばし、複雑な管腔構造を形成して、一方、血管壁が断裂し、管腔構造が乱れている血管も観察された (図 7)。

以上より、PTH などの血中カルシウム調節因子では骨基質溶解と石灰化が可逆的に起こるが、アレンドロネートは直接的に骨細胞にダメージを与えるため非可逆的な骨小腔の拡大が誘導されることが強く示唆された。また、アレンドロネートは骨芽細胞や血管にも影響を及ぼすことから、血管内皮細胞・骨芽細胞・骨細胞が各種の細胞間結合やギャップ結合を介して、機能的グループを形成することを考えると、アレンドロネートの頻繁投与は骨組織にとって、必ずしも有益に作用しない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hongo H, Sasaki M, Hasegawa T, Tsuboi K, Qiu Z, Amizuka N.	4. 巻 38 (2)
2. 論文標題 Isotope microscopic assessment for localization of 15N-minodeonate in bone.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hokkaido Journal of Dental Science.	6. 最初と最後の頁 123-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Qiu Z, Miyamoto Y, Yamamoto T, Hongo H, Abe M, Yoshida T, Yoshino H, Sasaki M, Nagai T, Naznin K, Yokoyama A, Zhao S, Mae T, Kirikoshi S, Moritani Y, Haraguchi M, Freitas PHL, Li M, Amizuka N., Hasegawa T.	4. 巻 39 (1)
2. 論文標題 The diversity of preosteoblastic morphology - Preosteoblastic response to parathyroid hormone -	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hokkaido Journal of Dental Science.	6. 最初と最後の頁 2-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Qiu Z, Miyamoto Y, Hongo H, Hasegawa T.	4. 巻 39 (1)
2. 論文標題 Roles of toll-like receptor 2 in osteoclastogenesis in chronic bone diseases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hokkaido Journal of Dental Science.	6. 最初と最後の頁 22-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hongo H, Mae T, Moritani Y, Kirikoshi S, Morimoto Y, Hashimoto K, Hasegawa T, Yoshida Y, Amizuka N.
2. 発表標題 Histological examination on new bone formation by combinations of tricalcium phosphates and phosphorylated-pullulan (PPL) composite.
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Sapporo, Japan. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hasegawa T, Miyamoto Y, Hongo H, Yamamoto T, Amizuka N.
2 . 発表標題 Paradoxical mineralization in bone and aorta induced by defective FGF23/klotho signaling - Histological examination on kl/kl and aklotho-/- mice - .
3 . 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Sapporo, Japan. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yoshida T, Hongo H, Miyamoto Y, Yamamoto T, Amizuka N., Hasegawa T.
2 . 発表標題 Histochemical assessment of mandibular alveolar bones and tibiae in obese type II diabetic SDT Cg-Leprfa fatty rats.
3 . 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Sapporo, Japan. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Mae T, Miyamoto Y, Hongo H, Yamamoto T, Qiu Z, Yamazaki Y, Amizuka N, Hasegawa T.
2 . 発表標題 Immunolocalization and expression of membrane transporters and enzymes involved in calcification of bone by intermittent PTH administration.
3 . 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Sapporo, Japan. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Qiu Z, Hasegawa T, Hongo H, Yamamoto T, Li M, Yimin, Amizuka N.
2 . 発表標題 Histological analysis on osteoclastic function in TLR2-deficient mice.
3 . 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Sapporo, Japan. (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 吉野弘菜、長谷川智香、邱 紫せん、坪井香奈子、本郷裕美、網塚憲生
2. 発表標題 アレンドロネートが骨芽細胞系細胞と骨特異性血管に及ぼす組織学的影響 .
3. 学会等名 第123回日本解剖学会 東京
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川智香、邱 紫せん、山本知真也、本郷裕美、松井 功、網塚憲生
2. 発表標題 Fgf23遺伝子欠損マウスの骨基質石灰化異常におけるSIBLING familyの関与 .
3. 学会等名 第38回日本骨形態計測学会 大阪
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川智香、邱 紫せん、山本知真也、本郷裕美、松井 功、網塚憲生
2. 発表標題 Fgf23遺伝子欠損マウスの骨基質石灰化異常におけるSIBLING familyの局所作用 .
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会 長崎
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本恒之、長谷川智香、本郷裕美、網塚憲生
2. 発表標題 破骨細胞のゴルジ装置の立体形態：酵素細胞化学を用いた光学顕微鏡およびオスミウム浸軟法を用いた走査型電子顕微鏡による研究 .
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会 長崎
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川智香、宮本幸奈、本郷裕美、山本知真也、網塚憲生
2. 発表標題 FGF23/klothoシグナルによる基質石灰化制御機構 .
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会 福岡
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本郷裕美、坪井香奈子、長谷川智香、網塚憲生
2. 発表標題 新規肥満2型糖尿病モデルでSDT fatty ラットの骨組織解析について .
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会 福岡
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川智香、宮本幸奈、邱 紫せん、山本知真也、本郷裕美、松井 功、網塚憲生
2. 発表標題 基質石灰化におけるFGF23-klothoとSIBLING familyの連関 Fgf23遺伝子欠損マウスを用いた組織化学・微細構造解析 .
3. 学会等名 第20回日本骨粗鬆症学会 長崎
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 邱 紫せん、長谷川智香、本郷裕美、山本知真也、李 敏啓、伊 敏、網塚憲生
2. 発表標題 Toll like receptor(TLR)2遺伝子欠損マウスの破骨細胞における組織化学的検索 .
3. 学会等名 第20回日本骨粗鬆症学会 長崎
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本郷裕美、坪井香奈子、長谷川智香、網塚憲生
2. 発表標題 新規肥満2型糖尿病モデルSDT fatty ラットにおける骨組織異常について.
3. 学会等名 第20回日本骨粗鬆症学会 長崎
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----