

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19628

研究課題名(和文)骨芽細胞から骨細胞へのスイッチングにおけるON-OFF機構の新規解明

研究課題名(英文)Analysis on ON-OFF switching for osteocytic differentiation

研究代表者

網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：30242431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨芽細胞がpodoplanin陽性を示すと、骨細胞へのスイッチングが誘導される可能性を明らかにした。骨芽細胞におけるpodoplaninからのシグナルは細胞膜を裏打ちするEMR familyのリン酸化がアクチン再構築を誘導することで、骨芽細胞から骨細胞への分化における細胞骨格の変化を誘導すると考えられた。骨リモデリング部位では、CD44(破骨細胞の細胞膜に局在)がpodoplanin陽性骨芽細胞のEMR familyのリン酸化を促進することが示唆されたが、モデリング部位では、CD44は骨芽細胞から骨細胞への分化に関与しないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究では、骨芽細胞と骨細胞が機能的グループを形成しており、それら細胞が存在する微細環境や骨の代謝に応じて、骨芽細胞から骨細胞への分化が時空的に調節されていることを明らかにした研究である。その結果、骨リモデリング部位では骨代謝回転、すなわち、骨吸収を担う破骨細胞が有するCD44によって骨細胞分化が、一部、影響を受けるが、骨代謝回転に依存しないモデリング部位における骨細胞分化はCD44に影響されないことが示唆された。近年、骨細胞研究における新展開が期待されており、本研究の学術的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, osteoblasts in the verge of differentiating into osteocytes expressed podoplanin on their cell membranes. Osteoblasts with podoplanin immunoreactivity on their cell surfaces demonstrated phosphorylated ezrin (a member of EMR family) on their cell membranes, as well as revealed the intracellular distribution of action filaments similar to osteocytes but not osteoblasts. These findings suggest that signaling linked to podoplanin would induce phosphorylation of ezrin in osteoblasts, and subsequent reassembly of actin filaments specific to osteocytic morphology. In bone remodeling region, CD44 (often seen on osteoclasts' cell membranes) appeared to facilitate ezrin-phosphorylation mediating podoplanin. In contrast, in modeling region, CD44 did not seem to be related to osteoblastic differentiation into osteocytes by mediating podoplanin/phosphorylation of EMR family.

研究分野：組織学、骨代謝学、微細構造学

キーワード：骨細胞 podoplanin EMR family 骨芽細胞 CD44 actin filament

## 1. 研究開始当初の背景

従来、骨細胞は「骨芽細胞が産生した骨基質の中に自ら埋め込まれた細胞」という定義で説明されてきたが、それは細胞分化の結果を捉えたものでしかない。本研究の背景として、研究代表者は、骨芽細胞が骨細胞へと分化する時空的タイミングが存在する可能性、つまり、時間的・空間的にどの骨芽細胞が骨細胞に分化するか事前に決定されているのではないかと、また、骨芽細胞が骨基質に埋め込まれる前に、その骨芽細胞の細胞骨格や細胞内小器官が骨細胞と同じ構築へと改変されるのではないかと、という疑問を兼ねてから有していた。つまり本研究の課題として、「偶然に骨基質に埋め込まれた骨芽細胞が骨細胞へと分化している」のではなく、「どの骨芽細胞が骨細胞に分化するのか骨基質に埋め込まれる前に決定されている可能性」があげられる。

そこで、研究代表者は、予備実験を行ったところ、埋め込まれたばかりの骨細胞、あるいは、骨芽細胞のいくつかに podoplanin/E11 (以下、podoplanin) が発現すること、また、Gap junction (connexin 43) の分布が骨細胞側 (細胞突起の側) に局在することを見出しており、podoplanin を介した actin filament の再構築が誘導されている可能性を見出した。

以上の背景および予備実験からの手がかりを基に、本研究では、骨芽細胞から骨細胞へのスイッチングにおける ON-OFF 機構に関する細胞学的メカニズムの解明に向けて研究を施行した。

## 2. 研究の目的

本研究の目標としては、骨芽細胞から骨細胞として骨基質に埋め込まれる時空的タイミングがどのような因子・環境によって制御されるのか、その細胞マーカーは存在するのか、また、骨細胞へのスイッチングが決定している骨芽細胞では細胞極性や細胞骨格といった細胞内小器官にダイナミックな変化を示すのかを明らかにすることである。

そこで具体的な研究目的として、予備実験として候補に挙がっていた podoplanin が骨芽細胞から骨細胞への分化が決まった段階で発現するマーカーに成り得るか検索した。さらに、podoplanin は CLEC-2 (間葉系細胞由来) や CD44 (造血系細胞由来) との結合を介して EMR family のリン酸化ならびにアクチン再構築を誘導するか、特に、podoplanin と CD44 陽性細胞との細胞間接触により骨芽細胞の骨細胞への分化のスイッチングについて検索した。

## 3. 研究の方法

生後 8 週齢の ICR マウス大腿骨を paraformaldehyde 溶液にて固定した後、パラフィン切片やクリオスタット切片を作成するとともに、透過型電子顕微鏡観察用に epoxy 樹脂包埋を行った。観察部位としては、骨リモデリング部位として大腿骨の骨幹端 (成長板軟骨直下を除いた二次骨梁領域)、および、モデリング部位として皮質骨骨髓側 (持続的骨添加領域) を選び、以下の解析を行った。

解析項目として、podoplanin、actin filament、CD44、組織非特異型アルカリホスファターゼ (tissue nonspecific alkaline phosphatase: TNALPase)、EMR family (ezrin, moesin, radixin) の 1 つであるリン酸化 ezrin の免疫組織化学、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 酵素組織化学を光学顕微鏡、または、超高解像共焦点レーザー顕微鏡である誘導放出制御 (stimulated emission depletion: STED) 顕微鏡で観察した。また、podoplanin の微細局在については pre-embedding 法にて免疫電顕観察を行った。なお、骨組織では podoplanin と CLEC-2 との結合の可能性が低いことから、本研究では CD44 に焦点を絞って検索した。

さらに、器官培養実験として、生後 1 週齢マウスから頭蓋骨を取り出して器官培養を行い、CD44 を添加した実験群と無添加の対象群における *Podoplanin*、*Ezrin*、*Gapdh* 遺伝子の発現を RT-PCR にて、また、リン酸化 ezrin 蛋白の発現を immunoblotting にて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) podoplanin の細胞内局在について

大腿骨骨幹端における顕微鏡観察では、骨基質内あるいは埋め込まれつつある骨細胞が podoplanin 陽性を示したほか、まだ、骨基質に埋め込まれていない、いくつかの TNALPase 陽性骨芽細胞も podoplanin 陽性反応を示した(図 1 A, B)。同部位を免疫電顕観察すると、podoplanin 陽性反応は骨芽細胞の細胞膜、ならびに、骨基質に埋め込まれたばかりの骨細胞の細胞膜、さらに、いくつかの骨芽細胞や骨細胞の細胞突起の基部に一致して局在していた(図 1C)。従って、podoplanin は、骨細胞に分化しつつある骨芽細胞、あるいは、分化したばかりの骨細胞の細胞膜および細胞突起の基部に局在するものと推測された。

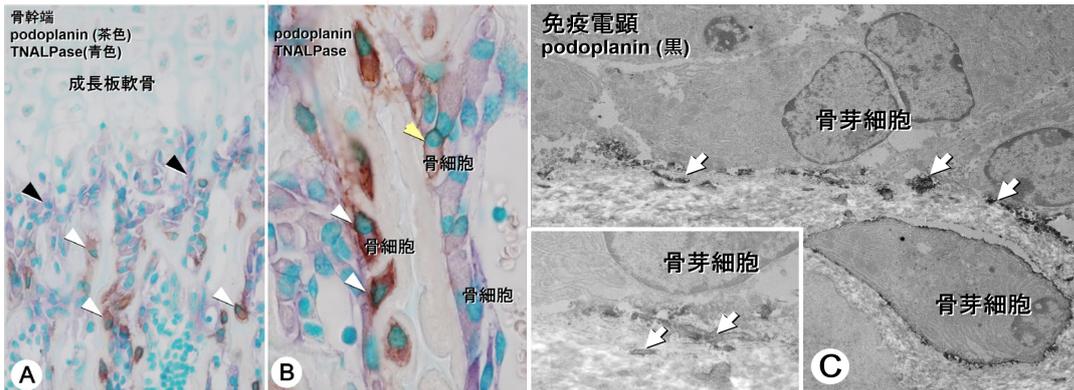


図1: 大腿骨骨幹端における podoplanin(茶色)と TNALPase(青色)の二重染色像(A, B)。パネル B は A の一部拡大を示す。骨基質に埋め込まれた骨細胞は podoplanin 陽性を示すが、TNALPase 陽性骨芽細胞の一部は podoplanin 陽性を示す(B; 黄色矢印)。パネルCは podoplanin の免疫電顕を示す。骨芽細胞の細胞膜および細胞突起に一致して黒い podoplanin 陽性反応が認められる(矢印)。

### (2) 骨細胞に分化しつつある骨芽細胞における podoplanin と actin filament の細胞内局在について

次に、podoplanin および actin filament の二重染色を施して STED 観察を行ったところ(図 2)、podoplanin 陽性骨芽細胞は、やや細胞体が骨基質に緩やかに突出しており、細胞膜および骨細胞と連絡する細胞突起に一致して podoplanin 陽性反応を局在させていた。そのような podoplanin 陽性骨芽細胞における actin filament は、細胞膜周囲や細胞突起の基部に集積しており、その分布パターンは骨細胞に類似していた。また、それは podoplanin 陽性を示す細胞内領域にほぼ一致していた。

従って、podoplanin 陽性骨芽細胞は、細胞内の actin filament の分布パターンを骨芽細胞型から骨細胞型へと再構築させていること、さらには、podoplanin と actin filament の細胞内分布がほぼ重複することから、podoplanin と actin filament の間には会合分子が存在することが推測された。

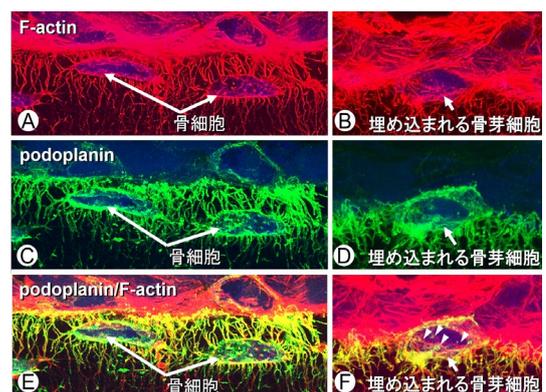


図2: actin filament (F-actin: 赤色)と podoplanin(緑色)の二重蛍光染色の SETD 像。埋め込まれつつある podoplanin 陽性骨芽細胞(D)の actin filament は細胞膜に沿って分布しており、骨基質内部の骨細胞の actin filament の分布に類似する。Podoplanin/F-actin を merge させると、podoplanin と actin filament の分布がほぼ一致する。

### (3) 骨リモデリング部位とモデリング部位における podoplanin/CD44/リン酸化 ezrin の細胞内局在

actin filament の細胞内再構築において podoplanin/CD44 相互作用の可能性、ならびに、破骨細胞が CD44 陽性を示すことを踏まえて、皮質骨骨髓側（モデリング部位）と骨幹端骨梁（骨リモデリング部位）において、CD44 陽性細胞と podoplanin 陽性骨芽細胞・骨細胞との局在を検索した。

皮質骨骨髓側では、podoplanin 陽性骨芽細胞が骨表面に一定間隔で局在していたが、CD44 陽性細胞との細胞間接触像は観察されなかった。しかし、これらの細胞膜周囲にはリン酸化 ezrin の発現が認められたことから、皮質骨骨髓側では、骨細胞への分化における podoplanin シグナルは CD44 以外の要因によって増強される可能性が推察された。

一方、骨幹端骨梁では、CD44 陽性/TRAP 陽性破骨細胞が podoplanin 陽性骨芽細胞にしばしば接触または近接しており、それら骨芽細胞はリン酸化 ezrin 陽性を示したが、CD44 陽性/TRAP 陽性破骨細胞はリン酸化 ezrin の陽性反応を示さなかった。従って、骨幹端骨梁では、podoplanin 陽性骨芽細胞は、CD44 陽性破骨細胞との接触を介して骨細胞への分化における podoplanin シグナルを増強させる可能性が推察された。

さらに、器官培養実験で CD44 添加または非添加頭蓋骨における *Podoplanin*、*Ezrin*、*Gapdh* 遺伝子の発現を解析したところ、これらの発現量に大きな差は認められなかったが、リン酸化 ezrin 蛋白は CD44 添加群のほうが高値を示した。よって、CD44 は ezrin リン酸化を促進すると推測された。

### (4) まとめ

以上のことから、骨基質に埋め込まれつつある骨芽細胞、あるいは、埋め込まれたばかりの骨細胞は podoplanin を細胞膜上に発現し、ERM family の1つである ezrin のリン酸化を介して細胞内 actin filament の局在を再構築する可能性が推察された。また、骨リモデリング部位では CD44 陽性破骨細胞が骨細胞分化における podoplanin 作用を増強する可能性、一方で、モデリング部位の骨細胞分化においては、CD44-podoplanin 以外の機序が存在する可能性が推測された（本研究成果は、現在、論文投稿中である）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato D., Takahata M., Ota M., Fukuda C., Tsuda E., Shimizu T., Okada A., Hiruma Y., Hamano H., Hiratsuka S., Fujita R., Amizuka N., Hasegawa T., Iwasaki N.	4. 巻 116
2. 論文標題 Siglec-15-targeting therapy increases bone mass in rats without impairing skeletal growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 172-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2018.07.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu B., Feng W., Hasegawa T., Amizuka N., Li M.	4. 巻 34
2. 論文標題 Type 1 diabetes mellitus induced low bone turnover in ovariectomized rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 57-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hasegawa T., Miyamoto Y., Abe M., Qiu Z., Yamamoto T., Yimin, Yoshida T., Yoshino H., Hongo H., Yokoyama A., Moritani Y., Morimoto Y., Sasaki M., Kuroshima S., Hara K., Kobayashi M., Akiyama Y., Maeda T., Freitas PHL., Li M, Amizuka N.	4. 巻 68巻5号
2. 論文標題 Histochemical examination on principal collagen fibers in periodontal ligaments of ascorbic acid-deficient ODS-od/od rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 349-358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfz021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
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 38
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 J Dent Sci	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 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Xing L., Zhang X., Feng H., Liu S., Li D., Hasegawa T., Guo J., Li M.	4. 巻 513巻4号
2. 論文標題 Silencing FOXO1 attenuates dexamethasone-induced apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1019-1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.112.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Khadiza N., Hasegawa T., Nagai T., Yamamoto T., Miyamoto-Takasaki Y., Hongo H., Abe M.,	4. 巻 40巻4号
2. 論文標題 Immunolocalization of podoplanin/E11/gp38, CD44, and endomucin in the odontoblastic cell layer of murine tooth germs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 33-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.40.133.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bu J., Du J., Shi L., Feng W., Wang W., Guo J., Hasegawa T., Liu H., Wang X., Li M.	4. 巻 18巻3号
2. 論文標題 Eldecalsitol effects on osteoblastic differentiation and function in the presence or absence of osteoclastic bone resorption	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Ther Med.	6. 最初と最後の頁 2111-2121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2019.7784.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Amizuka N., Hongo H., Hasegawa T.
2. 発表標題 Morphological assessment for osteocyte function in bone.
3. 学会等名 KSBMR-JSBMR joint symposium The 6th Seoul Symposium on Bone Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Amizuka N.
2. 発表標題 Histological Assessment for Osteocyte Function. Special Lecture.
3. 学会等名 International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 網塚憲生、長谷川智香、山本知真也、本郷裕美
2. 発表標題 テリバラチドの骨形成作用における細胞組織学的検索
3. 学会等名 第38回日本骨形態計測学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川智香、宮本幸奈、本郷裕美、阿部未来、網塚憲生
2. 発表標題 電子顕微鏡を駆使した骨の細胞組織学的アプローチ
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川智香、網塚憲生
2. 発表標題 骨組織における骨特異的血管と骨細胞分化の微細構造学的解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川智香、邱 紫セン、宮本幸奈、山本知真也、網塚憲生
2. 発表標題 特異的血管と骨細胞における組織化学・電顕イメージング
3. 学会等名 第39回日本骨形態計測学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 網塚憲生、長谷川智香
2. 発表標題 Microscopic imaging of osteoblasts/osteocytes in bone.
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会/第13回日中合同組織細胞化学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川智香
2. 発表標題 骨細胞分化のバイオイメージング
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Abe M., Hasegawa T., Amizuka N.
2. 発表標題 Histochemical assessment for osteoblastic activities in modeling and remodeling regions in osteoclast-lackingmice
3. 学会等名 97thGeneral Session & Exhibition of The International Association for Dental Research (IADR), 48th Annual Meeting of The AADR, 43rd Annual Meeting of THE CADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本郷裕美、長谷川智香、井上貴一朗、山本恒之、網塚憲生
2. 発表標題 副甲状腺ホルモン投与および授乳期カルシウム欠乏食給餌によって誘導される骨細胞周囲骨基質の微細構造学的変化について
3. 学会等名 令和元年度公益財団法人日本顕微鏡学会北海道支部学術講演会・支部集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋悠斐、本郷裕美、井上貴一朗、網塚憲生、長谷川智香
2. 発表標題 副甲状腺ホルモン間歇投与マウスの長管骨におけるpodoplaninの免疫局在について
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 長谷川智香、本郷裕美、網塚憲生	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 334
3. 書名 歯科再生医学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>北海道大学大学院歯学研究院 / 大学院歯学院 / 歯学部  <a href="https://www.den.hokudai.ac.jp/">https://www.den.hokudai.ac.jp/</a>          北海道大学大学院歯学研究院 口腔健康科学分野 硬組織発生生物学教室  <a href="https://www.den.hokudai.ac.jp/anatomy2/hokudai_d/index.html">https://www.den.hokudai.ac.jp/anatomy2/hokudai_d/index.html</a></p>
--

## 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
連携研究者	長谷川 智香  (HASEGAWA Tomoka)  (50739349)	北海道大学・歯学研究院・助教    (10101)	
連携研究者	本郷 裕美  (HONGO Hiromi)  (00778970)	北海道大学・歯学研究院・研究員    (10101)	