

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592126

研究課題名（和文） 骨芽細胞から骨細胞への終末分化と生存における低酸素応答因子 HIF の役割

研究課題名（英文） Possible role of hypoxia-inducible factor in survival and terminal differentiation of osteoblasts into osteocytes

研究代表者

坂倉 康則（SAKAKURA YASUNORI）

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：60128915

研究成果の概要：マウス胎仔中手骨の bone collar で HIF-1 α は骨表面の骨芽細胞に反応を示し、骨膜細胞よりも強かった。同時に骨細胞にも強反応がみられた。骨細胞にはグルコース輸送担体 GLUT1 と GLUT5 の反応があり、低酸素下で単糖類を利用し生存すること示した。成獣下顎骨で深層にある骨細胞は HIF-1 α 、HIF-2 α 、ORP150 の各低酸素応答因子に強陽性を示した。骨外細胞から骨細胞への分化と生存には低酸素応答因子が強く関与することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	600,000	180,000	780,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

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：骨芽細胞、骨細胞、生存、低酸素応答因子、グルコース輸送担体

1. 研究開始当初の背景

骨は生きた組織で、骨の中に埋め込まれた細胞（骨細胞）は骨の改造に関わる。骨の表面で活発に骨を造っている骨芽細胞は自ら埋まり骨細胞となる。しかし、骨細胞は石灰化した硬い基質で取り囲まれ、栄養と酸素に乏しい環境に置かれることとなる。骨芽細胞が骨細胞になる過程でこの苛酷な環境に適応するために、どのようにして生存するかを調べた。

2. 研究の目的

骨芽細胞から骨細胞に分化する過程が観察される部位と、すでに骨細胞になっている

部位での幼若な（浅層の）骨細胞と老練な（深層の）骨細胞で、低酸素応答因子が発現し安定化しているかについて、酵素抗体法により免疫組織化学で検索した。また、グルコース輸送担体である GLUT について、グルコース輸送に特異的な GLUT1、主にグルコース輸送に関わる GLUT3 とフルクトース輸送に特異的な GLUT5 についても同様に検索した。

3. 研究の方法

(1) 組織試料の作成 マウス胎生 16 日の中手骨および 24 週齢成獣の下顎骨を 4% パラホルムアルデヒドで固定、4.13% EDTA で脱灰し、パラフィンに包埋した。マイクロトームで

切片を作成し、使用時まで -80°C で保存した。

(2)免疫組織化学的染色 一次抗体には、マウス抗ヒト HIF-1 α 抗体、ウサギ抗マウス HIF-2 α 抗体、マウス抗 ORP150 抗体、ウサギ抗ラット GLUT1 抗体、ヒツジ抗マウス GLUT3 抗体、ヒツジ抗マウス GLUT5 抗体を用いた。染色部位を可視化するための二次抗体には、ABC法に基づいたペクタステイン Elite ABC キットを用いた。対照染色には、一次抗体の代わりにリン酸生理食塩水を用いた。細胞の核と輪郭を染色するために、メチルグリーン染色液で染めた。

4. 研究成果

(1)骨芽細胞から骨細胞への終末分化と生存について

①軟骨内骨化の bone collar における HIF-1 α と GLUT の発現

マウス胎生 16 日の中手骨は軟骨であり、中央部は肥大化軟骨細胞で占められていた。また、その辺縁には bone collar の形成が認められた。この膜内骨化による骨形成部位は軟骨膜細胞から分化した幼若な骨芽細胞とすでに骨基質に埋入した骨細胞が観察された。これらの細胞は低酸素応答因子 HIF-1 α が発現していた (矢印) が、軟骨膜細胞にはまったくみられなかった (Fig. 1A)。

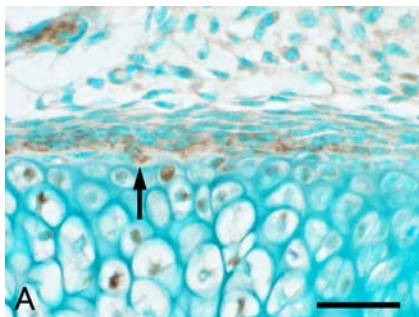


Fig. 1A

グルコース輸送に対して特異的に関わる GLUT1 の反応は赤血球にみられたが、bone collar の骨細胞に強く (矢印)、骨芽細胞には弱く反応がみられた。しかし、軟骨細胞にはほとんど観察されなかった (Fig. 1B)。

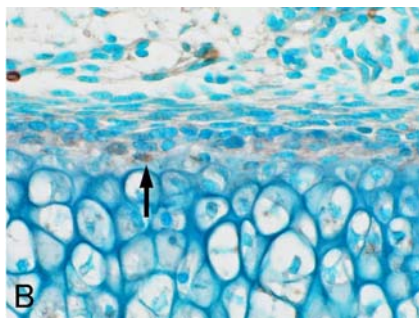


Fig. 1B

一方、主にグルコースの輸送に関与する GLUT3 は bone collar の幼若な骨細胞に微弱な反応が観察された (矢印) が、骨細胞や軟骨細胞には反応が認められなかった (Fig. 1C)。

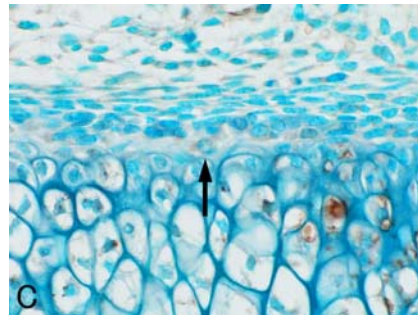


Fig. 1C

さらに、フルクトース輸送に特異的に関わる GLUT5 は骨細胞に強く (矢印)、骨芽細胞に弱く反応がみられたが、軟骨細胞にはみられなかった (Fig. 1D)。

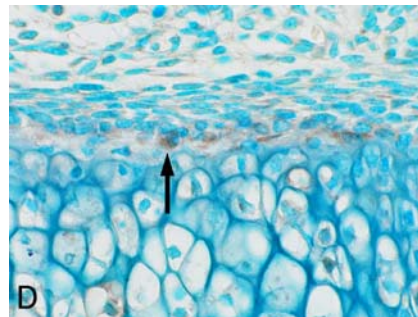


Fig. 1D

②下顎骨でみられる膜内骨化における HIF-1 α と GLUT の発現

マウス胎生 16 日の下顎骨の膜内骨化では、HIF-1 α の発現は骨基質に埋入し始めている骨細胞やすでに埋入している骨細胞に強く観察された (矢印、Fig. 2A)。

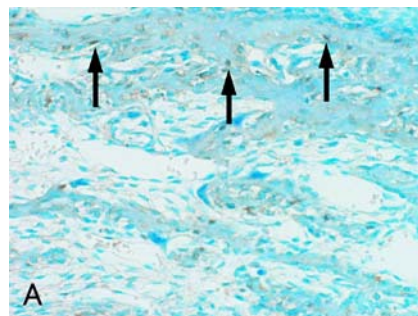


Fig. 2A

GLUT1 の発現については、軟骨がまったく関与しない軟骨内骨化において骨芽細胞や骨細胞にはまったく観察されなかった (Fig. 2B)。この点において、先の Fig. 1B の中手骨で示した骨芽細胞と骨細胞で GLUT1 が発現していたことと異なっていた。これは軟骨の鑄型で bone collar 形成での膜内骨化における GLUT1 を介したグルコースの取り込みと利

用が異なることを示している。

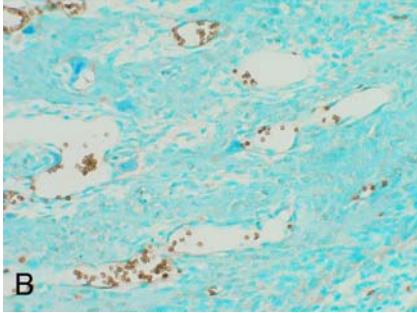


Fig. 2B

しかし、GLUT3 については、骨芽細胞と骨細胞の両細胞にその局在が観察された (Fig. 2C)。加えて、毛細血管の内皮細胞にも弱い反応がみられた。これは、bone collar 形成でみられた発現と異なり、下顎骨形成における膜内骨化に関わる骨芽細胞は GLUT1 よりも GLUT3 を主体にしてグルコース輸送を行っていることを示している。

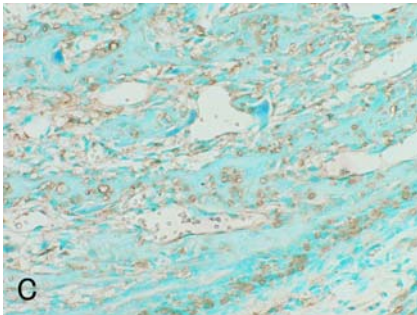


Fig. 2C

フルクトース輸送に特異的に関わる GLUT5 はすでに骨基質に埋入した骨細胞に強く発現しており、フルクトースをエネルギー代謝のために利用していることを示している (Fig. 2D)。

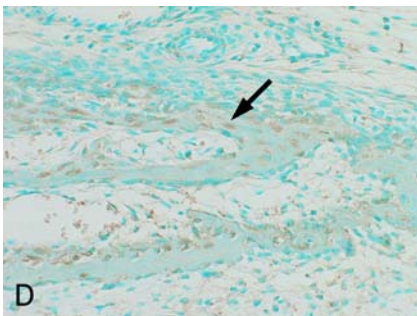


Fig. 2D

(2) 下顎骨改造後における低酸素応答因子 HIF-1 α 、HIF-2 α と ORP150 の発現について

24 週齢成獣マウスの下顎骨の第1臼歯側歯槽骨には骨改造の痕跡線がはっきりと観察された (Fig. 3A)。これを境に、新たに添加された骨の骨細胞にはまったく HIF-1 α の反応が観察されないのに対して、より深層に位置する骨細胞には強い反応がみられた。

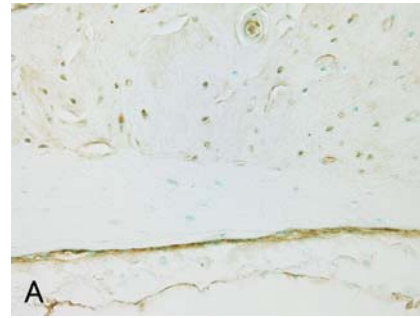


Fig. 3A

HIF-2 α の局在も骨改造の痕跡線を境に明らかに異なっていた (Fig. 3B)。これは HIF-1 α の局在と極めて類似しており、新たに添加された骨の骨細胞よりも深層に位置する骨細胞の方が極めて低酸素の環境に曝されていることを示している。



Fig. 3B

一方、ORP150 はいずれの骨においてもその骨細胞にほとんど反応がみられなかった。これは骨細胞は HIF を安定化させ、低酸素の環境に適応することが明らかとなった (Fig. 3C)。

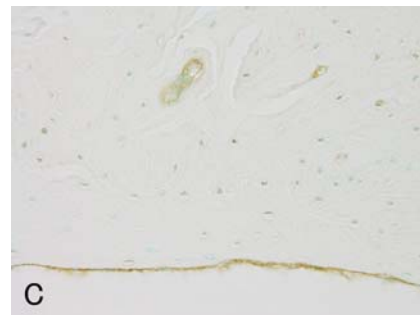


Fig. 3C

骨細胞は骨芽細胞が自ら基質を分泌し形成していくと同時に、その骨基質に埋入することで終末分化を遂げる。しかし、その生存のためには互いに骨細胞は多くの骨細管内に細胞突起を伸ばしギャップジャンクションで連結している。これは骨表層にまで達しており、こうしたネットワークを介して栄養や酸素、その他の情報 (例えばメカニカルストレスなど) に機能している。しかし、一度骨改造によりそのネットワークが断裂すると、今回の結果が示しているようにより深層の骨細胞は極めて苛酷な環境に陥るものと

推測される。しかし、今回の結果が示したように HIF に代表される低酸素応答因子の安定化によりグルコース輸送担体などの発現を増強することで生存し続けるものと考えられた。

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 1 件)

1. Sakakura Y, Shibui T, Irie K, Yjima T
Metabolic mode peculiar to Meckel's cartilage: immunohistochemical comparisons of hypoxia-inducible factor-1 α and glucose transporters in developing endochondral bones in mice. European Journal of Oral Sciences
査読の有無：有
Vol. 116, 2008, p. 341-352

[学会発表] (計 2 件)

1. 坂倉康則、入江一元
メッケル軟骨細胞の特異な代謝モード：低酸素応答因子 HIF-1 α とグルコース輸送担体 GLUT の局在
第 50 回歯科基礎医学会学術大会
2008 年 9 月 25 日、東京 (有明コロシウム)
2. 坂倉康則
メッケル軟骨基質の改造と吸収における軟骨細胞の役割と代謝モード
第 50 回歯科基礎医学会学術大会
2008 年 9 月 23 日、東京 (有明コロシウム)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂倉 康則

北海道医療大学・歯学部・教授

60128915

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし