

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07256

研究課題名(和文) 高い骨密度の骨を形成する新規骨芽細胞群「超石灰化骨芽細胞」の解析

研究課題名(英文) Analysis of hypermineralizing osteoblasts, a new osteoblast subtype, that produce high BMD bone

研究代表者

黒田 有希子 (KURODA, Yukiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70455343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：成獣マウスの全身骨格のうち、骨密度が際立って高い耳小骨や骨迷路、上腕骨遠位部、および脛骨遠位部では、一般的な骨芽細胞マーカーとして用いられるI型コラーゲン2.3kbプロモーターの活性が低い骨芽細胞が骨基質を産生していた。これらの骨芽細胞のうち、聴覚関連骨を造っている骨芽細胞ではII型コラーゲンを発現しており、聴覚関連骨の骨基質はI型とII型のコラーゲンを含んでいた。そこで我々は耳の高石灰化骨を形成する骨芽細胞を「聴覚骨芽細胞」と名付けた。聴覚骨芽細胞によって造られた骨は、骨密度だけではなく、アパタイト配向性も一般的な骨よりも高く、音を伝えることに適した特性を有してい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

II型コラーゲン遺伝子Col1a1のプロモーター断片(2.3kb-Col1a1)の下流で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスは一般的な骨芽細胞を可視化するために広く使用されている。本研究は、従来の骨芽細胞マーカーである2.3kb-Col1a1活性をほとんど持たない骨芽細胞群を発見した点に新規性がある。また、全身骨格の骨密度分布に着目し、骨密度の違いによって骨形成機構が異なることが実証された。実際、骨密度の高い聴覚関連骨ではII型コラーゲンを発現している骨芽細胞によって骨が形成されており、聴覚関連骨の骨基質特性が一般的な骨とは異なることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Auditory ossicles in the middle ear, bony labyrinth of the inner ear, distal humerus, and distal tibia are highly mineralized in the adult mouse skeleton. In these hypermineralized bone, we found that a new osteoblast subtype that is negative for a conventional osteoblast-marker, Col1a1 2.3kb-promoter. Since osteoblasts in a hearing-related bone, but neither in a distal humerus nor distal tibia, produce type II collagen as a bone matrix, we propose that these type II collagen-positive osteoblasts be designated "auditory osteoblasts". Bone formed by auditory osteoblasts exhibits not only greater mineral density but a higher degree of apatite orientation than that found in conventional osteoblasts. These data collectively suggest that auditory osteoblasts may optimize the bone material properties for sound transmission.

研究分野：骨生物学

キーワード：骨芽細胞 骨形成 コラーゲン 石灰化 耳小骨 骨基質 骨密度 アパタイト配向性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、健康寿命を延ばすために「骨の健康」にも注目が集まっている。骨密度は骨強度を決める要因の一つとして挙げられるが、最適な骨密度とは一体どのように決まっているのだろうか？申請者はマイクロ CT を用いて成獣マウス全身骨格の骨密度測定を行ったところ、骨の種類によって、また骨の部位によって骨密度が大きく異なることを見出した。鼓膜の振動を内耳に伝達する耳小骨は骨密度が最も高いこと、神経の保護や下半身からの衝撃を受け止める腰椎は骨密度が低いこと、さらに脛骨は遠位部のみ骨密度が高いことが分かった。正常な骨は、骨を形成する骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞が協調して作られる。骨密度の違いはその骨が有する機能や形によって、骨芽細胞と破骨細胞のバランスが変化することで生じるのだろうか？それとも、骨を形成する細胞群が違うのだろうか？骨密度はコラーゲン線維に付着するヒドロキシアパタイトの量に依存するため、骨密度が高い耳小骨は硬度が高く柔軟性の低い骨であり、骨密度が低い腰椎は柔軟性に富んだ骨であると言える。成獣マウスにおいて歯と同程度に骨密度が高い部位 (900 mg/cm³ 以上) は、耳の骨と上腕骨遠位部、脛骨遠位部であった (図 1)。

一般的な骨芽細胞のマーカーである I 型コラーゲン (*Col1a1*) プロモーターの下流で緑色蛍光タンパク質 GFP を発現するトランスジェニックマウス (*Col1-GFP* マウス) において、骨密度の高い耳の骨と上腕骨遠位部、脛骨遠位部を調べたところ、骨密度の高い部位には GFP の発現が非常に低い骨芽細胞が存在していることが分かった。これらの結果より、骨密度の高い骨を形成している骨芽細胞は、一般的な骨芽細胞とは異なる細胞外マトリックスを産生している可能性や新たな骨芽細胞サブタイプの存在が示唆されていた。

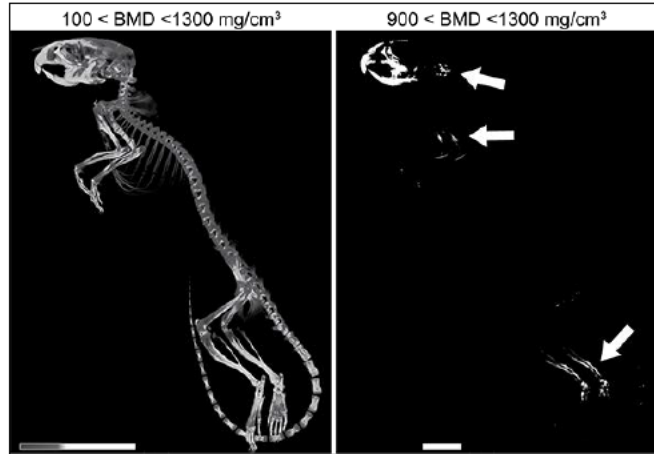


図 1 成獣マウス骨格の骨密度分布

左：全身の骨密度分布

100 mg/cm³ (灰色) -1300 mg/cm³ (白色)

右：高骨密度部位 (900 mg/cm³ 以上) 矢印は上から耳の骨、上腕骨遠位部、脛骨遠位部を示す。

2. 研究の目的

成獣マウス全身骨格の中で、骨密度の高かった骨は、耳の骨と上腕骨遠位部、脛骨遠位部であった。これらの骨は大腿骨などの一般的な長管骨と同様に内軟骨性骨化により形成されることから、本研究では最も骨密度の高い耳小骨を中心に解析を行うこととした。骨密度の高い骨に存在し、*Col1-GFP* の発現が低い骨芽細胞を「超石灰化骨芽細胞」と名付け、この骨芽細胞の解析を行うことで骨密度の高い骨と平均的な骨密度の骨との骨形成機構の違いを明らかにすることを目的とした。本研究によって新たな骨形成機構が明らかになった場合、既存の処置では治りにくい骨折の治癒や高齢化社会に伴い増加している骨粗鬆症治療に対する新たなアプローチを提案できる可能性が十分にある。

3. 研究の方法

(1) マイクロ CT による骨密度解析

70%エタノールで固定した成獣および離乳直後 (生後 3 週齢) のマウス全身骨格をマイクロ CT で撮影した後、聴覚関連骨、肩甲骨、上腕骨、尺骨+橈骨、脊椎、大腿骨、脛骨+腓骨を取り出して風乾し、全身骨格の撮影時よりも高い解像度で各骨の撮影をした。マイクロ CT 撮影装置 (R_mCT2) で取得した画像を 3 次元骨形態計測ソフトウェア (TRI/3D-BON) で解析し、全身骨格と各骨の骨密度分布を比較した。

(2) 耳小骨と大腿骨に含まれるコラーゲンの質量分析

生後 3 週齢のマウスから取り出した耳小骨と大腿骨骨幹部を脱脂・脱灰した。各サンプルを SDS サンプルバッファー内で熱処理することでタンパク質を抽出し、SDS-PAGE で分子量による分離をおこなった。コラーゲン鎖に相当する約 140kDa のバンドを切り出し、質量分析装置 (LCMS-IT-TOF) により各骨に含まれるコラーゲンサブタイプの同定を行なった。

(3) 耳小骨と大腿骨における骨芽細胞由来コラーゲン線維の直径計測

生後 3 週齢のマウスから耳小骨と大腿骨を取り出し、固定・脱灰処理をした後にタンニン酸とオスミウム酸で染色を行い、エポキシ樹脂包埋ブロックを作製した。70 nm 厚切片を透過型電子顕微鏡 (JEM-1400plus) で観察し、骨芽細胞周辺のコラーゲン線維横断面を撮影した。取得した

画像は画像解析ソフト (ImageJ) の粒子解析 (analyze particles) を用いて解析し、コラーゲン線維の直径を計測した。

(4) 耳小骨における内軟骨性骨化過程の組織学的解析

生後 0 日齢-3 週齢、および成獣マウスから聴覚関連骨を取り出し、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝生理食塩水で固定した。パラフィン切片用サンプルは脱灰処理を行なってからパラフィンに、凍結切片用サンプルは非脱灰の状態です川本法用包埋剤に包埋し、ブロックを作製した。ただし、in situ ハイブリダイゼーション用パラフィン切片を作製する際には固定液として G-Fix を用いた。聴覚関連骨の比較対象として同じ個体から大腿骨、または脛骨を取り出し、同様の処理をした。

4. 研究成果

マイクロ CT を用いて、成獣マウス (生後 8 週齢) と離乳直後のマウス (生後 3 週齢) における全身骨格の骨密度を測定し、定量解析した (図 2)。その結果、骨全体の体積のうち、骨密度の高い部位が占める割合が最も大きい骨は耳の骨であった。この結果は成獣マウスのみならず離乳直後の幼若なマウスでも同じであったため、耳の骨では一般的な骨が老化の過程で硬くなるのとは異なり、発生過程において骨を高石灰化するメカニズムが存在することを示唆していた。骨の主要なコラーゲンは I 型であることが知られている。その一方で聴覚関連骨は Col1-GFP の発現が低いことから (図 3A、3B)、骨密度の高い耳小骨と平均的な骨密度を示す大腿骨、それぞれの骨基質に含まれるコラーゲンのサブタイプを質量分析により同定した。その結果、大腿骨からはこれまでの知見通り I 型コラーゲンのみが検出されたが、耳小骨からは I 型に加えて II 型コラーゲンが検出された。一般的に II 型コラーゲンは軟骨の主成分であり、II 型コラーゲンを発現する骨芽細胞は国内外でも全く報告がない。そこで、聴覚関連骨の超石灰化骨芽細胞における II 型コラーゲン遺伝子の発現を in situ ハイブリダイゼーションで、タンパク質の発現を免疫染色で確認した。その結果、聴覚関連骨の超石灰化骨芽細胞では II 型コラーゲンの発現を遺伝子レベルでもタンパク質レベルでも確認することができた (図 3C、3D)。これまでの知見において、骨折治癒過程に出現する軟骨様骨 (chondroid bone) の中には軟骨細胞と骨芽細胞の両者の性格を合わせ持つ軟骨様骨芽細胞が存在し、この細胞は II 型コラーゲン遺伝子 *Col2a1* を発現していることが報告されている。聴覚関連骨の超石灰化骨芽細胞と軟骨様骨芽細胞が同一かどうかを調べるため、軟骨様骨芽細胞で発現している *Sox9* や *Col10a1* といった軟骨細胞マーカーが超石灰化骨芽細胞でも発現しているかどうかを調べた。その結果、超石灰化骨芽細胞では軟骨細胞

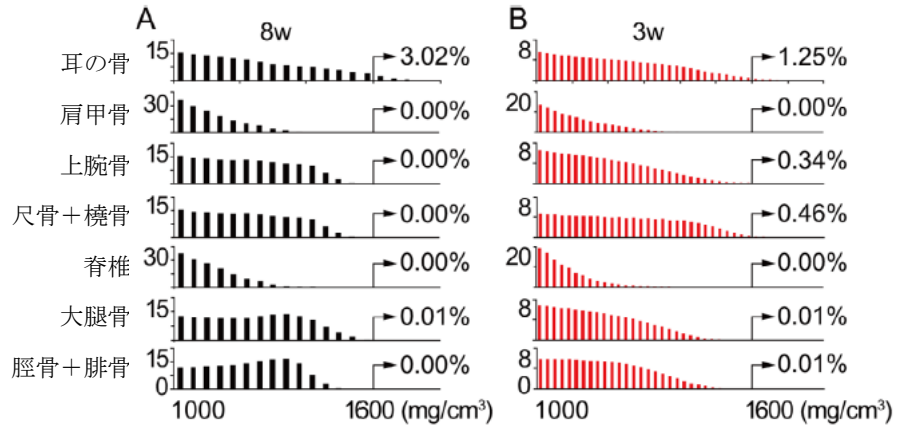


図 2 成獣マウス (A、生後 8 週齢) と離乳直後のマウス (B、生後 3 週齢) における骨密度分布
骨密度が高い部位 (1600mg/cm³ 以上) の体積が骨全体に占める割合を数字で示している。

骨基質に含まれるコラーゲンのサブタイプを質量分析により同定した。その結果、大腿骨からはこれまでの知見通り I 型コラーゲンのみが検出されたが、耳小骨からは I 型に加えて II 型コラーゲンが検出された。一般的に II 型コラーゲンは軟骨の主成分であり、II 型コラーゲンを発現する骨芽細胞は国内外でも全く報告がない。そこで、聴覚関連骨の超石灰化骨芽細胞における II 型コラーゲン遺伝子の発現を in situ ハイブリダイゼーションで、タンパク質の発現を免疫染色で確認した。その結果、聴覚関連骨の超石灰化骨芽細胞では II 型コラーゲンの発現を遺伝子レベルでもタンパク質レベルでも確認することができた (図 3C、3D)。これまでの知見において、骨折治癒過程に出現する軟骨様骨 (chondroid bone) の中には軟骨細胞と骨芽細胞の両者の性格を合わせ持つ軟骨様骨芽細胞が存在し、この細胞は II 型コラーゲン遺伝子 *Col2a1* を発現していることが報告されている。聴覚関連骨の超石灰化骨芽細胞と軟骨様骨芽細胞が同一かどうかを調べるため、軟骨様骨芽細胞で発現している *Sox9* や *Col10a1* といった軟骨細胞マーカーが超石灰化骨芽細胞でも発現しているかどうかを調べた。その結果、超石灰化骨芽細胞では軟骨細胞

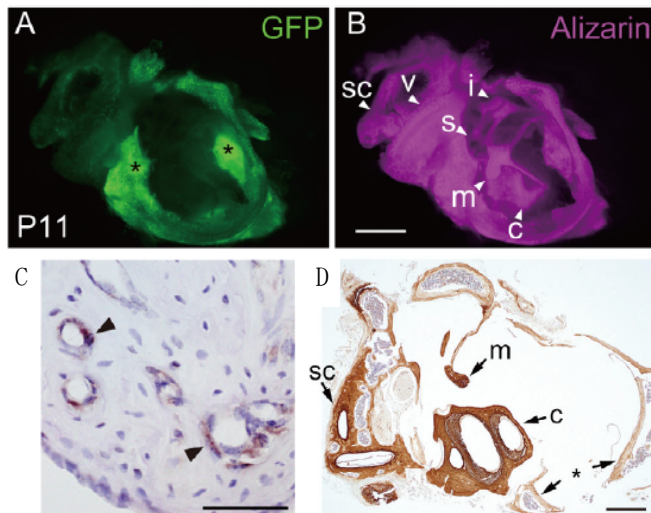


図 3 聴覚関連骨における Col1-GFP と II 型コラーゲン (Col2) の発現
(A、B) 生後 11 日齢マウス、Col1-GFP の発現 (A、*) と骨形成部位 (B)
(C) 生後 3 週齢マウス、Col2 遺伝子の発現 (茶色、▲)
(D) 成獣マウス、Col2 タンパク質の発現 (茶色)
m: ツチ骨、i: キヌタ骨、s: アブミ骨、c: 蝸牛、v: 前庭、sc: 三半規管

マーカーは発現しておらず、超石灰化骨芽細胞は軟骨様骨芽細胞とは異なる新規の骨芽細胞群であることが確認できた。一方、聴覚関連骨以外の骨密度の高い部位である上腕骨遠位部と脛骨遠位部ではいずれの部位でも骨芽細胞における II 型コラーゲンの発現は確認できなかった。そこで我々は II 型コラーゲンを発現し、耳の高石灰化骨を形成する特徴的な骨芽細胞を“聴覚骨芽細胞 (Auditory osteoblast)”と名付けた。

次に、聴覚骨芽細胞が産生したコラーゲン線維の直径を計測してみると、一般的な骨芽細胞が産生したコラーゲン繊維よりも直径が細いことが分かった (図 4)。これまでの知見から、I 型コラーゲンよりも II 型コラーゲンの直径が細いこと、石灰化の開始点となる石灰化球との親和性が I 型コラーゲンよりも II 型コラーゲンの方が高いことが知られている。本研究の結果と併せて考察をすると、聴覚関連骨が II 型コラーゲンを含んでいることが一般的な骨よりも石灰化度が高くなる要因の一つとして挙げられる。

大阪大学、中野研究室との共同研究により、聴覚関連骨は一般的な長管骨よりもアパタイト結晶の配向性が高いことが分かった。石灰化骨の無機成分であるアパタイト結晶の配向性は骨密度だけでなく、音が骨の中を伝わる速度に関係してくる因子である。聴覚骨芽細胞は II 型コラーゲンの発現以外にも一般的な骨芽細胞にはない特有の制御機構を有し、音を伝えることに適した骨を造り出す可能性が示唆された。本研究課題の成果は国内外の共同研究の成果と併せ、「聴覚骨芽細胞によって造られた高石灰化骨の特徴」をまとめた論文として発表することができた (図 5、Kuroda Y et al., JBMR, 2021)。今後、聴覚骨芽細胞特有の骨形成制御機構を明らかにするためには、聴覚関連骨の機能や周囲の環境を視野に入れ、特有の遺伝子発現を誘導している因子を明らかにする必要がある。

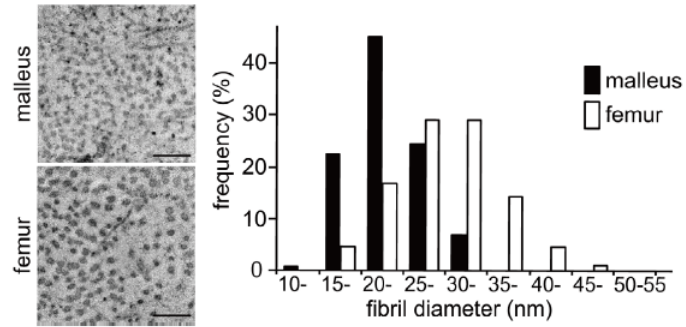


図 4 聴覚骨芽細胞と一般的な骨芽細胞が分泌したコラーゲン線維の横断面とその直径分布
malleus: ツチ骨 (耳小骨)、femur: 大腿骨、fibril diameter: コラーゲン線維の直径

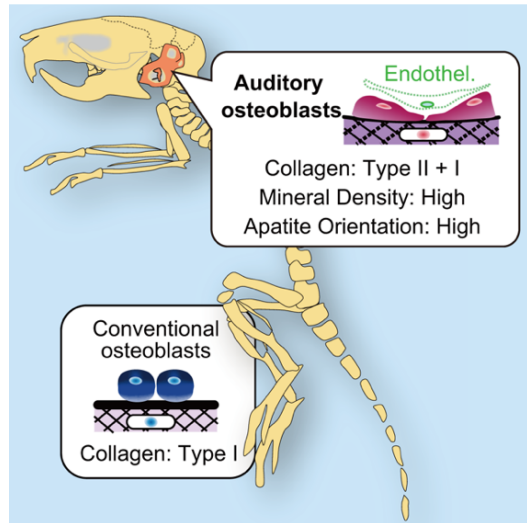


図 5 聴覚骨芽細胞 (auditory osteoblasts) によって作られた骨の特徴

- I 型と II 型のコラーゲンを含む
- 高石灰化
- アパタイト結晶の配向性が高い

5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yukiko Kuroda, Katsuhiko Kawai, Naoya Hatano, Yanlin Wu, Hidekazu Takano, Atsushi Momose, Takuya Ishimoto, Takayoshi Nakano, Paul Roschger, Stephane Blouin, Koichi Matsuo | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Hypermineralization of hearing related bones by a specific osteoblast subtype | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research | 6. 最初と最後の頁 1535-1547 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.4320 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 黒田 有希子 |
| 2. 発表標題 中耳や内耳を構成する高石灰化骨を造る聴覚骨芽細胞の解析 |
| 3. 学会等名 第39回 日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 黒田有希子 |
| 2. 発表標題 超石灰化骨芽細胞によって形成された骨はII型コラーゲンを含み骨密度が高くなる |
| 3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学医学部細胞組織学 松尾光一研究室
<http://wp4.matsuo-lab.com/>

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | |
|---------|--|--|--|
| オーストリア | Lidwig Boltzmann Institute of Osteology | | |