

機関番号：32409  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20791544  
 研究課題名（和文） 骨細胞分化および細胞間ネットワーク制御における semaphorin の関与の検討  
 研究課題名（英文） Does semaphorin regulate differentiation and network among cells in osteocyte?  
 研究代表者  
 佐藤 毅（SATO TSUYOSHI）  
 埼玉医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：60406494

## 研究成果の概要（和文）：

骨細胞の細胞株について，semaphorin の受容体である plexin の mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて調べたところ，plexin 受容体については A1, A2, A3, B1, B2, C1 の発現が認められ，これらの受容体のうち，A1, A2 の経時的な発現上昇が認められた．骨細胞株が semaphorin 3A を産生しており，骨細胞に semaphorin 3A のリコンビナントタンパク質を作用させたところ，細胞突起の伸張や分化において重要な E11, connexin43, DMP1 の mRNA およびタンパク質発現も上昇していた．マウス大腿骨欠損部に対して semaphorin 3A のゼラチンハイドロゲルを用いた組織内徐放による顎骨再生の組織学的解析を行ったところ，骨塩濃の上昇，石灰化領域の増加が認められた．本研究の結果，in vitro において，semaphorin 3A は骨細胞に作用し，分化および細胞突起伸長に関与することが明らかとなった．また，in vivo おいても骨の成熟を促進する可能性が示唆された．

## 研究成果の概要（英文）：

We have found that osteocytes express plexin A1, A2, A3, B1, B2, C1 and both plexin A1 and plexin A2 increase mRNA expression sequentially. Osteocytes produce semaphorin 3A protein. Semaphorin 3A induces the expression of E11, connexin 43 and DMP1 in osteocyte. Using soft x-ray analysis, we detected high bone mineral in mice whose femur effected with hydrogel with semaphorin 3A in comparison with the control. Taken together, we discovered that semaphorin 3A regulates differentiation and dendrite extension on osteocytes in vitro and also promotes maturation of bone in vivo.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	260,000	780,000	3,380,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：semaphorin，細胞間ネットワーク，骨細胞，分化

## 1．研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに，骨代謝と神経系との相互作用の解析に従事してきた．そのような研究を行う中で，神経系において回路形成に重要な役割を担う分子として知られている semaphorin ファミリーの骨代謝における役割に着目した．semaphorin ファミリーは，最近の研究により血管系における血管形成

の制御，免疫系における免疫応答の制御などの役割を担っていることが明らかとなっており（Serini 2003, Kikutani & Kumanogoh 2003），骨格系での重要性を示唆する知見も報告されている．

## 2．研究の目的

上記の学術的背景を理由に，研究代表者は

骨再生に関して、semaphorin ファミリーが重要な役割を果たしているのではないかと推測した。骨再生に重要なファクターとして、骨細胞への分化および骨細胞間のネットワーク構築があげられる。そこで、研究代表者は骨細胞への分化および骨細胞間のネットワーク構築に関して、semaphorin ファミリーが重要な役割を果たしているのではないかと仮説をたてた。

### 3. 研究の方法

#### semaphorin 3 サブファミリー

(3A/B/C/D/E/F)および7A を骨細胞に作用させた場合の骨細胞への分化、骨細胞の細胞突起ネットワークの構築について生化学的解析および形態学的解析を行う。骨細胞についてはMLO-Y4の細胞株を用いる(Kato 1997)。semaphorin 3A・3Cおよびsemaphorin 7Aについてはリコンビナントタンパク質が購入可能である(R&D, neuromics)。他のリコンビナントタンパク質については、供与してもらうことが可能な場合はそれを使用する。

細胞間ネットワークすなわち骨細胞突起伸長(dendrite outgrowth)についてのアッセイはtranswell assayを行う(Karagiosis 2007)。FluoroBlok 24-Multiwell Insert System (pore=1.0 μm) (BD Falcon)を用いて、calceinなどで蛍光標識したMLO-Y4をsemaphorin存在下にFluoroBlok 24-Multiwell Insertに入れる。semaphorinにより突起伸長が起こるならば、poreを通りchamber下部に伸長した突起を蛍光検出が可能である(図3)。検出にはCytoFluor 4000 (Applied Biosystem)を用いる。以上の方法により、細胞間ネットワークに参与するsemaphorinが明らかとなる(図1)。

<図1>

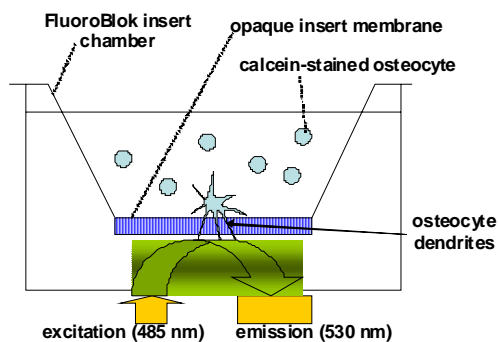


図3. 骨細胞のdendrite outgrowthを調べる transwell assay

骨再生過程でのsemaphorin 3Aの局在を確認する。ウサギの片側の下顎骨下縁の一部に骨欠損を作製する。顎骨欠損部に対してsemaphorinのゼラチンハイドロゲルを用いた組織内徐放による顎骨再生の組織学的解析を行う。Yamamotoらの方法を用いて、ゼラチンハイドロゲルを作製する(Yamamoto

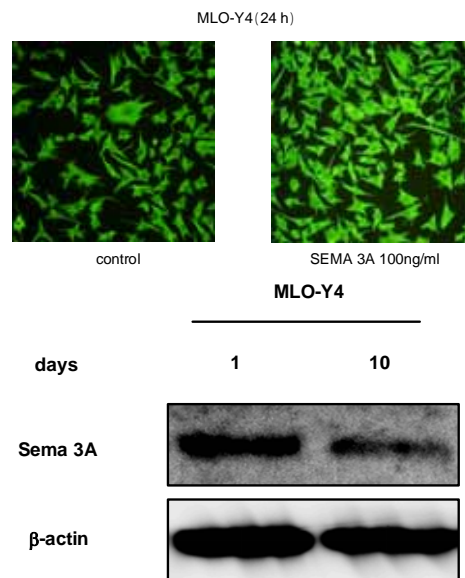
2006)。ゲルの徐放期間は2週間・4週間・6週間とする。骨欠損部の再生評価はsoft x-rayによる観察を行う。また、6週後に組織切片を作製し骨組織の評価を行う。

### 4. 研究成果

<平成20年度>

骨細胞の細胞株について、semaphorinの受容体であるplexinのmRNA発現をRT-PCR法を用いて調べた。細胞株は骨芽細胞株MC3T3-E1および骨細胞様細胞株MLO-Y4を用いた。MLO-Y4はMissouri大学のBonewald教授よりを分与していただいた。その結果、骨芽細胞株にplexin A1,A2,A3,B2,C1が発現していることがわかった。また、骨芽細胞株にascorbic acid(50 μg/ml)および-glycerophosphate(10mM)を添加して14日間培養し分化させた細胞において、plexin B1が誘導されることが明らかとなった。plexin A1,A2,A3はsemaphorin 3Aの受容体であるので、semaphorin 3Aを骨細胞株に作用させる実験を行った。semaphorin 3Aは市販のマウスリコンビナントsemaphorin 3Aを用いた。MLO-Y4にsemaphorin 3Aを作用させて、細胞の形態的变化を観察した。形態的变化は細胞骨格であるアクチンを染色する方法により蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、骨細胞の突起の伸長は認められなかった。また、骨細胞株がsemaphorin 3Aを産生しているかどうか、Western Blot法で調べたところ、産生していることが明らかとなった(図2)。

<図2>

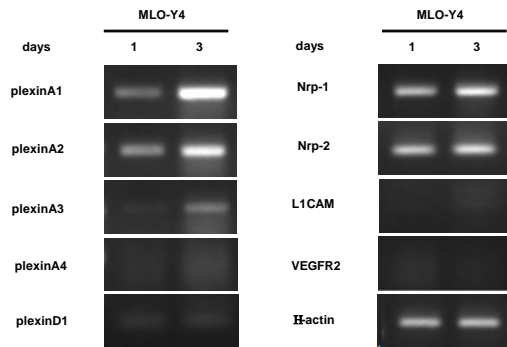


<平成21年度>

昨年度の実験結果より、骨芽細胞の分化過程においてplexin B1が誘導されたため、semaphorin 4Dのリコンビナントタンパク

質を購入し骨細胞に作用させたが、石灰化の亢進は認められなかった。in vivoでの検討を行うため、マウスを用いた実験で皮下に semaphorin 4Dのリコンビナントタンパク質を含有したペレットを埋め込み3ヵ月後に骨量測定、骨形態計測をおこなったが有意差は認められなかった。骨細胞におけるplexin受容体および補助受容体の発現についてRT-PCRで調べた。補助受容体に関しては、Neuropilin-1, Neuropilin-2, Met, L1CAM, ErbB2, CD72についてプライマーを作製した。その結果、plexin受容体についてはA1, A2, A3, B1, B2, C1の発現が認められ、これらの受容体のうち、A1, A2の経時的な発現上昇が認められた。一方で、B3, A4, D1は骨細胞には発現していなかった。また、補助受容体のうちNeuropilin-1, Neuropilin-2, Metの発現上昇が認められたが、L1CAM, ErbB2, CD72は骨細胞には発現していなかった(図3)。一方でsemaphorin 3Aの骨細胞に対する作用を詳細に解析するために、in vitroにおいて細胞を24時間無血清の状態に培養したところ、オステオカルシンの誘導が確認された。

< 図 3 >

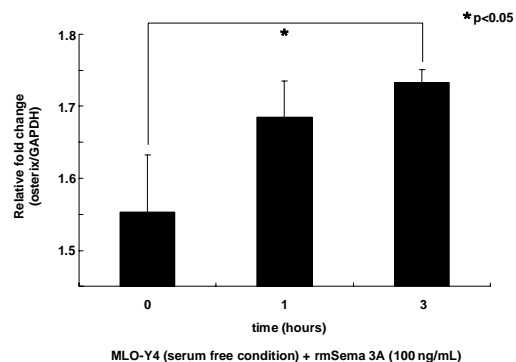
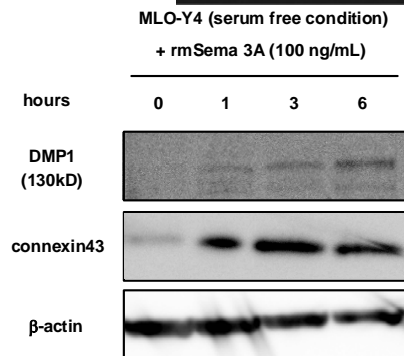
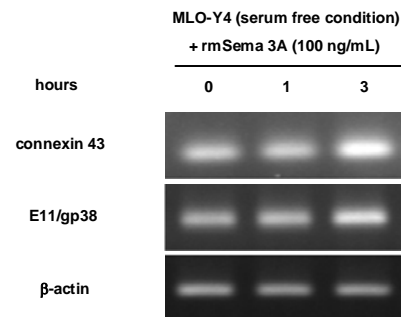
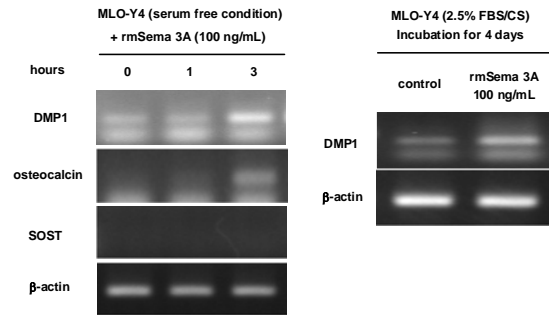


<平成22年度>

骨細胞にsemaphorin 3Aのリコンビナントタンパク質を作用させたところ、細胞突起の伸張において重要なE11, コネキシン43などのマーカーの発現誘導が起こっていた。また、骨細胞のマーカーであるDMP1のmRNAおよびタンパク質発現も上昇していた。しかしながら、FGF23, SOSTについては発現に変化はなかった。さらに、骨分化の転写因子であるRunx2, osterixについてmRNAの発現誘導を調べたところ、発現が上昇していた(図3)。骨細胞突起伸長(dendrite outgrowth)についてのアッセイはtranswell assayを試みたが、検出が困難でありうまくいかなかった。つぎに、semaphorin 3Aがin vivoで作用するかどうかを調べるために、当初ウサギを用いる計画であったが、費用の面で困難であることから、マウスを用いて解析を行った。マウス大腿骨欠損部に対してsemaphorin 3Aのゼラチンハイドロゲルを用いた組織内徐放による顎骨再生の組織学的解析を行った。吸入

麻醉下にて、大腿骨の一部に骨欠損を作製し欠損部にゲルを置いた。対照としてゼラチンハイドロゲルのみを使用した群を反対側の大腿骨に設定した。ゲルの徐放期間は6週間とした。骨欠損部の再生評価はsoft x-rayによる観察を行ったところ、骨塩濃の上昇、石灰化領域の増加が認められた(図4)。

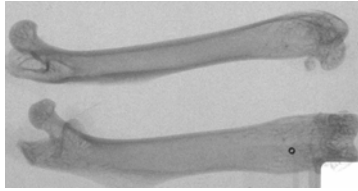
< 図 4 >



MLO-Y4 (serum free condition) + rmSema 3A (100 ng/mL)

Sema 3A

+



-

## 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)

[学会発表](計1件)

佐藤毅 骨細胞における semaphorin シグナルの検討 第64回日本口腔科学会学術大会  
札幌 2010年6月24日~25日

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 毅 (SATO TSUYOSHI)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60406494