

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21792070

研究課題名（和文） 骨組織中での骨細胞ネットワークの3次元的動態変化の解明

研究課題名（英文） The Investigation of the changes in three dimensional osteocyte network in bone

研究代表者

菅原 康代（SUGAWARA YASUYO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70379775

研究成果の概要（和文）：骨細胞は分化する際に、立方体の骨芽細胞から、ダイナミックな形態変化を引き起こして、突起を持った星状の骨細胞に形態変化を起こす。この突起によるネットワークの状態の詳細は未だ解明されていない。そこで本研究では、実験動物として汎用性の高いマウスの骨中の骨細胞ネットワークとその機能をとらえ、他の種とも比較し、骨細胞の機能の一部を解明した。

研究成果の概要（英文）：Bone cells exhibit dynamic changes in their morphologies and differentiate from cuboidal osteoblasts into stellate osteocytes with dendritic processes. Detailed state of the dendritic network is yet to be elucidated. Therefore in this study, we clarified a part of osteocyte functions by capturing osteocyte network and function in bone of mice, a commonly used model-animal, and also by comparing mice with another species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	5,100,000	1,530,000	6,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

骨細胞は骨芽細胞から分化する際に形態変化を引き起こして突起によるネットワークを形成する。この突起によるネットワークが骨に対するメカニカルストレスを感知し、骨代謝を制御していると言われていたが、その役割や状態の詳細は未だ解明されていない。

そこで本研究では、骨組織中の骨細胞ネットワークが、変化するコミュニケーションを持つかどうかを3次元的に解明することを目的としている。しかしながら、これまで骨細胞は周囲を硬い骨基質中で覆われているため、その3次元構造を観察することさえ困難

であった。そのため、骨組織中の骨細胞の突起によるネットワークが本当に変化するかどうかは、未だ解明されておらず不明である。我々の研究グループは、骨細胞がアクチン線維に富んでいることに注目し、ニワトリの骨組織中の骨細胞、骨芽細胞のアクチン線維を蛍光色素と共焦点レーザー顕微鏡を用いて3次元構築し、形態計測する方法を考案した (Bone, Sugawara et al, 2005)。しかしながら、この手法はニワトリ頭蓋骨のみで使用できる技術であったため、実験動物として普及している遺伝子改変マウスなどにも応用できるように、マウスで骨中の骨細胞を可視できるように研究するに至った。過去の報告では実際のマウス骨中骨細胞の3次元形態計測を行った報告はない。さらに、ほとんど詳細の知られていない骨中骨細胞の機能を探るために、生きた状態での骨細胞のコミュニケーションも調べることにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨組織中の骨細胞のネットワークについて検討するために、今後の実験の汎用性の高いマウスの骨中骨細胞の形態を観察する。さらに、これまで報告がなかったマウス骨細胞の3次元形態計測を行う。本研究ではその詳細を明らかにし、種差についても検討をすることが目的である。また、骨細胞は堅い骨基質中でコミュニケーションを維持するためにギャップジャンクション結合によりネットワークを築いている。そこで本研究では骨細胞ネットワークの機能の一つとして生きた骨での細胞間コミュニケーションも明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスおよびニワトリ胚頭蓋骨からの骨片採取と準備

胎生14日齢 (E14)、出生直後 (P0) のニワ

トリ胚頭蓋骨および胎生15日齢 (E15)、出生直後 (P0) のマウス胚頭蓋骨から頭蓋骨を採取し、骨膜を取り除いた後トリミングする。骨片を Alizarin red と Alcian blue で染色する。固定は95%ethanolで行った。

(2) 切片作成

E14 および E16 のニワトリおよび E15 と E17 マウス後頭骨を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで固定する。その後、methyl methacrylate (MMA) で包埋を行い、6マイクロで切片を作製する。切片は Villanueva Goldner 染色する。

(3) 蛍光染色および共焦点レーザー顕微鏡による観察

ニワトリおよびマウス胚頭蓋骨切片を3%パラホルムアルデヒドで固定し、Texas red Phalloidin にて染色を行った。包埋後、共焦点レーザー顕微鏡にて $0.3\mu\text{m}$ ごとに表層から観察した。

(4) 3次元構築と形態解析

共焦点レーザー顕微鏡から得られた画像を3次元構築し、骨細胞細胞突起の数、密度などを解析する。また、骨細胞の突起の長さを計測し、骨細胞の表面積および体積を計測した。また共焦点レーザー顕微鏡によるキャリブレーションを行い、補正を行った。また、すべてのデータから骨細胞一つ当たりの計測値を算出した。

(5) FRAP 解析

16週齢ニワトリ胚頭蓋骨およびマウス胚頭蓋骨に蛍光色素を取り込ませ、1分ごとに蛍光色素退縮を計測した。フォトブリーチング後の蛍光回復をパーセンテージであらわした。

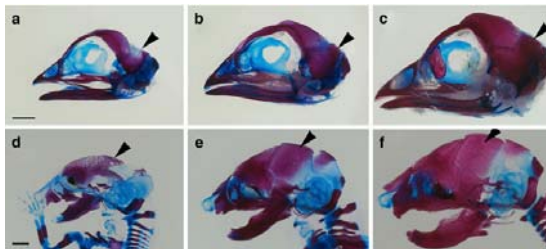
(6) 統計解析

すべての結果はノンパラメトリック法であるマンホイットニーUテストにより統計処理した。

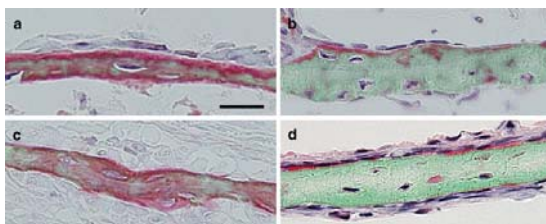
4. 研究成果

1) ニワトリとマウス頭蓋骨の石灰化の過程観察

ニワトリおよびマウス頭蓋骨をアリザリンレッドとアルシアンブルーで染色した。図のa-c はニワトリの骨を示し、d-f はマウスの骨を示す。



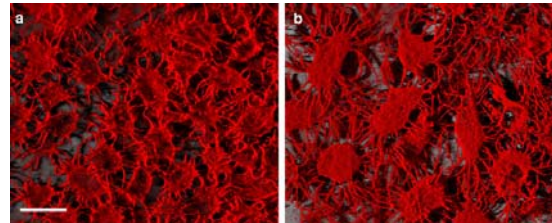
上記図の a は E14、b は E16、c は P0、d は E15、e は E15、f は E16、g は P0 である (Bar in a = 5mm, d = 1mm, 矢頭は後頭骨を示す。) ニワトリ胚頭蓋骨は E14 ではまだ石灰化しておらず、E16 ではほぼ石灰化している。一方マウス胚頭蓋骨は E15 でまだ石灰化しておらず、E17 で石灰化がほぼ完了していた。



上記の図は Villaneueva-Goldner 染色像を示す。a (E14)、b (E16) はニワトリ後頭骨の切片像で、c (E15)、d (E17) はマウス後頭骨の切片像である。赤色で染色されているところが類骨で、緑色で染色されている所が石灰化骨である。E14 ニワトリと E15 マウスではほとんどが類骨であるが、E16 ニワトリと E17 マウスでは骨領域が減り、石灰化領域が

増えた。そこで E16 ニワトリと E17 マウスで骨細胞のネットワークを比較した。

(2) ニワトリとマウス後頭骨での三次元骨細胞ネットワークの観察



ニワトリおよびマウスの後頭骨中の骨細胞ネットワークの三次元構築像を上記に示す。a はニワトリ後頭骨中の三次元骨細胞ネットワークで、b はマウス後頭骨中の三次元骨細胞ネットワークである。骨細胞は双方とも多数の突起をもった楕円形の細胞である。細胞間距離はニワトリが $23.5 \pm 6.1 \mu\text{m}$ でマウスが $39.6 \pm 11.6 \mu\text{m}$ であり、ニワトリの方が距離は短かった ($P < 0.05$)。一つの骨細胞あたりの突起の数はニワトリが 52.7 ± 6.4 本でマウスが 49.7 ± 9.7 本であり、有意差は認められなかった。一つの骨細胞が占める骨基質の領域はニワトリが $4,691 \pm 935 \mu\text{m}^3$ でマウスが $10,665 \pm 1,510 \mu\text{m}^3$ あり、ニワトリの方が小さかった ($P < 0.05$)。

(3) 骨基質中の骨細胞の形態計測解析

骨基質 $1 \mu\text{m}^3$ あたりの骨細胞突起の長さは、ニワトリで $0.24 \pm 0.03 \mu\text{m}$ 、マウスで $0.25 \pm 0.06 \mu\text{m}$ であった。また骨基質 $1 \mu\text{m}^3$ あたりの細胞表面積はニワトリ $0.24 \pm 0.08 \mu\text{m}^2$ 、マウス $0.25 \pm 0.06 \mu\text{m}^2$ と有意差は認められなかった。また骨基質中に占める骨細胞の体積はニワトリ $9.71 \pm 1.92\%$ 、マウス $12.5 \pm 1.97\%$ であった。

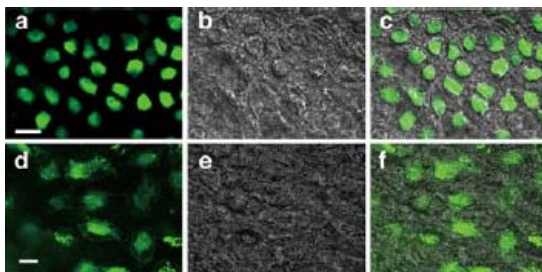
(4) 骨細胞一つ当たりの突起の長さ、細胞表面積、細胞体積について

	Chick parietal bone	Mouse parietal bone
Total length of cell processes (μm)	1,131 \pm 139	2,668 \pm 596*
Cell surface area (μm^2)	1,128 \pm 358	2,654 \pm 659*
Body	666 (59%)	1,067 (40%)
Process	461 (41%)	1,587 (60%)
Cell volume (μm^3)	455 \pm 90	1,328 \pm 210*
Body	332 (73%)	641 (48%)
Process	123 (27%)	688 (52%)

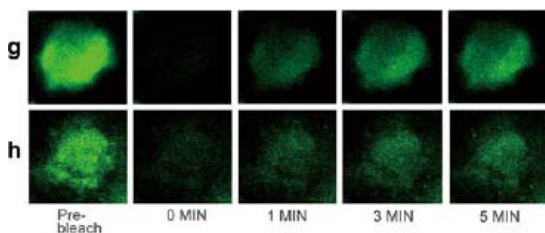
* Comparison to chick parietal bone $P < 0.05$

上記に示すようにすべての値でマウスの骨細胞の形態計測値がニワトリの骨細胞の形態計測地よりも大きかった。

(5) 後頭骨中の FRAP 解析



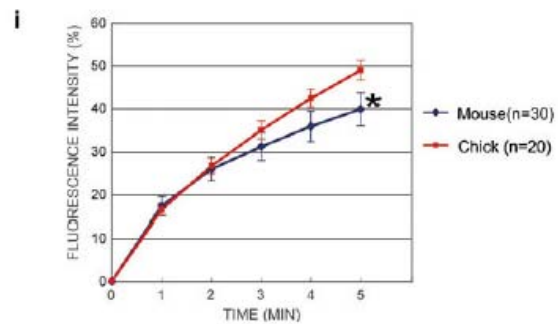
a はニワトリ後頭骨中の骨細胞を蛍光標識したものの、b はニワトリ後頭骨の DIC 像、c は a, b を重ね合わせたものである。d はマウス後頭骨中の骨細胞を蛍光標識したものの、e はマウス後頭骨の DIC 像、f は d, e を重ね合わせたものである。蛍光標識された骨細胞が DIC 像で観察されている骨小腔に一致して存在していることが分かる。



FRAP 解析はニワトリとマウスの後頭骨における骨細胞の機能的なギャップジャンクションを調べるために行った。

g はニワトリ後頭骨中の骨細胞の FRAP 解析の結果の像である。また、h はマウス後頭骨中の骨細胞の FRAP 解析の結果の像である。それぞれのイメージはフォトブリーチング

後の 1, 3, 5 分後の蛍光回復を示している。



最初の 4 分間の蛍光回復においてニワトリとマウスの違いはなかったが、5 分後の蛍光回復度はニワトリの方が高かった (ニワトリ 49.0 \pm 2.4%、マウス 39.9 \pm 2.4%)。

一連の実験では異なる種における三次元骨細胞ネットワークの形態および細胞間コミュニケーションについて、同じ年齢グループに統一して比較を行った。これまでの報告では、種間の違いは 2 次元の形態計測のデータであり、また年齢も統一されておらず、その比較が困難であった。

本研究からニワトリとマウスの骨細胞の形は似ているが、その大きさや密度などは異なっていることが分かった。また大きさもマウスの方が約 2 倍大きい、骨細胞突起の密度は変わらなかった。また FRAP 解析の結果からも、早期の蛍光回復はほとんど変化なかったが、5 分後はニワトリで 50%、マウスで 40% の回復率であった。この細胞間コミュニケーションはギャップジャンクションを介する機能と関連があり、骨のリモデリングなどと密接に関連しているといわれていることから、機能の一部を解明した。今後様々な種や遺伝子改変動物の骨細胞の機能についても知るための一助になると考えられる。

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 3 件)

①Ishihara Y., Sugawara Y., Kamioka H., Kawanabe N., Kurosaka H., Yamashiro T., In situ imaging of the autonomous intracellular Ca²⁺ oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone. Bone, 50(4):842-52, 2012. 査読有

② Sugawara Y., Ando R., Kamioka H., Ishihara Y., Honjo T., Noriaki K., Kurosaka H., Takano-Yamamoto T, Yamashiro T., The three-dimensional morphometry and cell-cell communication of the osteocyte network in chick and mouse embryonic calvariae. Calcif Tissue Int, 88(5):416-24, 2011. 査読有

③Kamioka H., Murshid SA., Ishihara Y., Kajimura N., Hasegawa T., Ando R., Sugawara Y., Yamashiro T., Takaoka A., Takano-Yamamoto T., A method for observing silver-stained osteocytes in situ in 3-microm sections using ultra-high voltage electron microscopy tomography. Microsc Microanal, 15(5), 377-83, 2009. 査読有

[学会発表] (計9件)

①菅原康代、マウス大腿骨中の三次元骨細胞ネットワークは外部環境によって変化する、第70回日本矯正歯科学会&第4回国際会議、2011年10月18-20日、名古屋

②石原嘉人、菅原康代、生体ライブイメージングを用いた骨組織中における自律性細胞内カルシウムオシレーションの検討、第70回日本矯正歯科学会&第4回国際会議、2011年10月18-20日、名古屋

③川辺紀章、菅原康代、ロンベルグ症候群患者における歯の組織学的検討、第70回日本矯正歯科学会&第4回国際会議、2011年10月18-20日、名古屋

④ 菅原康代、マウス大腿骨中の三次元骨細胞ネットワークは外部環境によって変化する、第53回歯科基礎医学会学術大会・総会、2011年9月30日-10月1日、岐阜

⑤石原 嘉人、菅原康代、骨組織内ライブイメージングを用いた機械的刺激に対する細胞内カルシウム応答の検討、第69回日本矯正歯科学会大会、2010年9月27-29日、横浜

⑥今井裕一、上岡 寛、石原嘉人、吉川祐介、菅原康代、超高压電子顕微鏡を用いた骨基質と骨細胞突起の3次元再構築、第69回日本矯正歯科学会大会、2010年9月27-29日、横浜

⑦ Ishihara Y., Sugawara Y., Ex-vivo imaging of the autonomous intracellular Ca²⁺ oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone, The ASBMR 33th Annual Meeting, 2011年9月16-20日, San Diego

⑧石原嘉人、菅原康代、骨組織内カルシウムイメージングを用いた機械的刺激に対する細胞応答のリアルタイム解析、第28回日本骨代謝学会学術集会、2010年7月21-23日、東京

⑨Ishihara Y., Sugawara Y., Direct Imaging of Flow-induced Oscillatory Calcium Rise in Living Bone, JADR Hatton award competition, 2010年1月25日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 康代 (SUGAWARA YASUYO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70379775

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者