

## 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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592045

 研究課題名（和文） 骨細胞の細胞外環境変化におけるグルコース輸送担体と  
モノカルボン酸輸送担体の役割

 研究課題名（英文） A possible role of glucose transporters and monocarboxylate  
transporters in osteocytes during changes of extracellular milieu

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（和文）：骨改造の前後に形成されたマウス下顎歯槽骨では、骨改造の痕跡を境に浅層の新生骨と深層の既存骨との層板構造は異なり、phalloidin による骨細管ネットワークの観察はその断裂を示した。既存骨細胞は HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、GLUT3、MCT2 の反応を示したが、新生骨の骨細胞には反応を認めなかった。既存骨細胞は骨改造による骨細管ネットワークの断裂から低酸素低栄養の苛酷な環境に陥り、これら輸送担体の発現により生存を維持していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In alveolar bone of mouse mandibular bone, the structure of lamellar bone newly formed after bone remodeling was clearly different from that of older bone. It was observed by phalloidin staining that the network of bone canaliculi was not connected between the new bone and older bone. Osteocytes in the old bone showed positive staining of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , GLUT3 and MCT2, whereas those in the new bone was not stained. We conclude that osteocytes survive in a severe milieu through expression of HIFs, GLUTs and MCTs.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012 年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

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、軟骨細胞、低酸素応答因子、グルコース輸送担体、  
モノカルボン酸輸送担体

## 1. 研究開始当初の背景

(1)石灰化基質環境に置かれている骨細胞は酸素や栄養を供給する血管から遠く隔離され、きわめて苛酷な環境下で生存している (Gross et al, J Appl Physiol 2001)。しかし、現在までのところ骨細胞が苛酷な環境で生

存する分子機構は不明である。

(2) 低酸素環境下では細胞は主にグルコースなどの単糖を解糖系で消費しエネルギーを産生している。細胞膜で単糖輸送を担うグルコース輸送担体 (glucose transporters, GLUTs) はヒトで 14 種類確認されており、

GLUT 1 から GLUT 5 が広く研究されている (Joost & Thorens, Mol Membr Biol 2001)。しかし、骨細胞における GLUT 発現は報告されていない。

(3) 一般に、細胞は乳酸・ピルビン酸・ケトン体などのモノカルボン酸も即時利用できるエネルギー源として利用している。その輸送を担うのがモノカルボン酸輸送担体 (monocarboxylate transporters, MCTs) であり、現在までに 14 種類が確認されている (Halestrap & Meredith, Eur J Physiol 2004)。

(4) GLUTs による単糖輸送と MCTs によるモノカルボン酸輸送は共に ATP を必要とせず、輸送基質の濃度に依存する。しかしながら、骨芽細胞の骨細胞への終末分化や骨改造に伴う骨細管ネットワークの断裂の際に生じるであろう細胞外環境の変化に対して、どのようにグルコース輸送担体とモノカルボン酸輸送担体の発現様式が変化し、骨細胞の生存に寄与するか、まったく報告されていない。

## 2. 研究の目的

(1) 生体組織における GLUTs と MCTs の発現状況を、下顎骨舌側において骨改造の前後で免疫組織化学的に検討する。これにより、各部位における骨細胞の染色性から、骨細胞での GLUTs と MCTs の利用優位性を明らかにする。

(2) 骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) と骨細胞様細胞 (MLO-Y4 細胞) をコラーゲンゲルコート上に播種し、大気環境と 2% 低酸素環境で培養する。GLUTs と MCTs の mRNA 発現から、酸素環境の変化と GLUTs・MCTs の発現の相関性を明らかにする。

(3) 低グルコース培養条件下で上記細胞を培養し、栄養環境の変化と GLUTs と MCTs の発現を明らかにする。

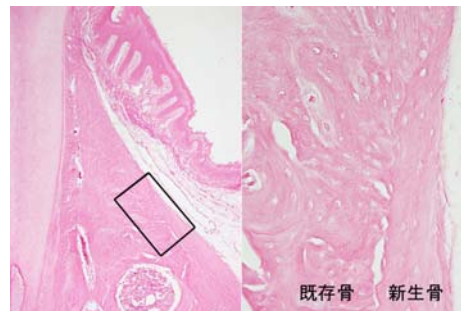
## 3. 研究の方法

(1) マウス下顎骨の舌側では、下顎骨の成長に伴い骨改造による骨添加が著しいことから、同部位を観察部位とし、下顎骨の形成過程と加齢における変化を検討する。パラフィン切片を用いて、酵素抗体法による免疫組織化学にて HIFs、GLUTs、MCTs の抗体でその反応と局在性を検討する。

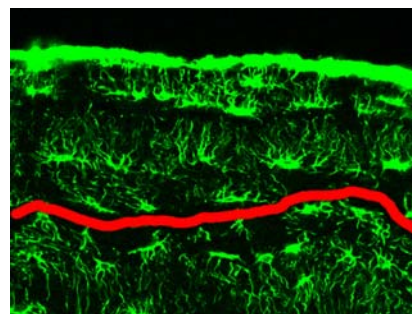
(2) 骨芽細胞様細胞と骨細胞様細胞を用い、その骨系細胞を低酸素分圧下あるいは低栄養下で培養し、酸素環境の変化と GLUTs と MCTs の発現誘導の相関性を検討する。

## 4. 研究成果

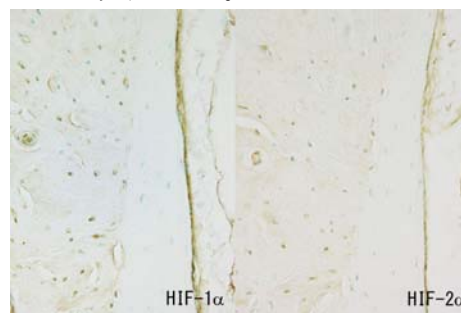
(1) 24 週齢の成獣マウスでは、歯槽骨表面の結合組織に毛細血管が観察され、骨改造の痕跡を境に新生骨と既存骨の骨層板構造が異なっていた。



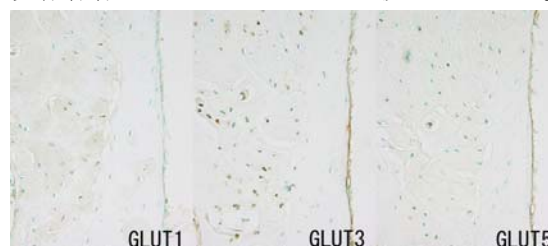
(2) この新生骨と既存骨の境 (赤線) に、骨細管ネットワークの断裂が骨改造と骨添加によりもたらされ、さらに骨細管は新生骨で表層へ向かい、既存骨では深層へ向かっていることが pallodin 染色により明らかとなった。



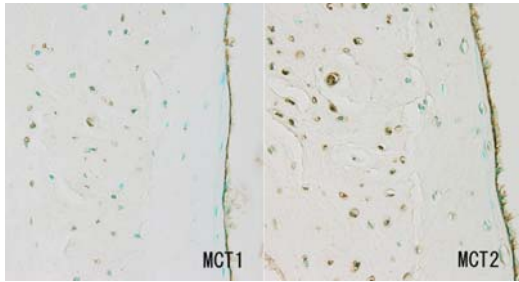
(3) HIF-1 $\alpha$  と HIF-2 $\alpha$  は新生骨の骨細胞にはまったく反応がみられないのに対して、既存骨の骨細胞では HIF-1 $\alpha$  が強く、HIF-2 $\alpha$  が弱く観察された。



(4) GLUTs は新生骨でみられず、より深層の既存骨骨細胞で GLUT3 の強い反応を示した。



(5) MCTs では、MCT2 の発現が既存骨骨細胞にみられた。



以上のように、既存骨骨細胞は骨改造による骨細管ネットワークの断裂で過酷な環境で生存するために、主に HIF-1 $\alpha$ 、GLUT3、MCT2 を強発現することが明らかとなった。

(6) マウス頭蓋骨由来骨芽細胞は通常培養条件 (5% CO<sub>2</sub> + 95% 空気) 下で 3 日から 7 日間培養し、細胞数自体は増加し一部にやや重層する部位がみられるが、この培養期間では大きな特徴はなかった。一方、RT-PCR 解析による hypoxia-inducing factor (HIF) は発現し続け、glucose transporter 1 (GLUT1) はユビキタスに発現したが、GLUT3 はほとんど発現していなかった。これは、通常の培養条件下 (細胞培養に適した酸素濃度とグルコース濃度の条件) ではこれまで組織学的に観察されてきた結果に対応するものであり、GLUT3 の発現状況から細胞は活発に酸化的リン酸化を介して呼吸をおこなっていると考えられる。ただし、HIF の遺伝子は発現しているものの、プロテオソーム系で分解されているものと考えられた。

(7) 一方、免疫組織化学的に染色した結果、RT-PCR での発現状況を反映するような結果となった。

#### 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 3 件)

① Y. Hosokawa, K. Okumura, S. Terasima, Y. Sakakura Radiation protective effect of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) on human oral squamous cell carcinoma cell lines. Radiation Protection Dosimetry 査読有 Vol. 152, 2012, pp. 159-163, 10.1093/rpd/ncs215

② 永坂 萌、鳥谷奈保子、敦賀英知、坂倉康則、溝口 到 ヒト歯根膜由来線維芽細胞における fiblin-1 の発現抑制が versican の mRNA とタンパク質発現およびタンパク質の局在へ及ぼす影響 北海道医療大学歯学雑誌 査読有 31 巻、2012、19-26

③ M. Iijima, M. Takano, Y. Yasuda, T. Muguruma, S. Nakagaki, Y. Sakakura, I. Mizoguchi Effect of the quantity and quality of cortical bone on the failure force of a miniscrew implant European Journal of Orthodontics 査読有 2012, 10.1093/ejo/cjs066

[学会発表] (計 3 件)

① 高橋昌己、渋井 徹、入江一元、坂倉康則 骨細胞の細胞間ネットワークの断裂と低酸素応答因子・グルコース輸送担体・モノカルボン酸輸送担体の発現局在 第 118 回日本解剖学会全国学術集会 2013 年 3 月 29 日 サポートホール高松 (香川県高松市)

② 高橋昌己、坂倉康則、入江一元、渋井 徹 マウス脛骨軟骨内骨化におけるグルコース輸送担体 (GLUTs) とモノカルボン酸輸送担体 (MCTs) の発現 第 53 回歯科基礎医学会学術大会 2012 年 10 月 2 日 長良川国際会議場 (岐阜市)

③ M. Takahashi, T. Shibui, K. Irie, Y. Sakakura Glucose transporters and monocarboxylate transporters in developing endochondral bone of mice. J. Physiol. Sci. 2011, p.242

[その他]  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 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

##### (2) 研究分担者

入江 一元 (IRIE KAZUHARU)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：70223352  
渋井 徹 (SHIBUI TORU)  
北海道医療大学・歯学部・助教  
研究者番号：89453265  
高橋 昌己 (TAKAHASHI MASAMI)  
北海道医療大学・歯学部・助教  
研究者番号：50550307

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：