

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293327

研究課題名(和文)非細胞自律的な骨芽細胞活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidating mechanisms of non-cell-autonomous osteoblast activation

研究代表者

松尾 光一 (MATSUO, Koichi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40229422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Fra-1を発現するトランスジェニックマウスでは、骨を作る細胞である骨芽細胞が活性化され、骨形成が促進されている。このFra-1マウスにおいて、骨形成が促進するメカニズムを様々な仮説に基づき解析したところ、内軟骨性骨化で骨化する耳小骨(ツチ骨)において、血管周囲に骨形成を起こす「骨形成性毛細血管」が増生していることが見出された。すなわち転写因子Fra-1が、細胞非自律的に骨形成性毛細血管の増生を促すことで、骨形成が全身で促進されている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Transgenic mice overexpressing the transcription factor Fra-1 (Fra-1 mice) exhibit activation of bone-forming osteoblasts leading to enhanced bone formation. We therefore analyzed mechanisms by which bone formation is enhanced in Fra-1 mice. We found that "osteogenic capillaries" form bone matrix around the capillaries in the auditory ossicle malleus during endochondral ossification. We propose that Fra-1 overexpression enhances systemic bone formation by employing osteogenic capillaries in a cell-non-autonomous manner.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨芽細胞 骨形成 毛細血管

## 1. 研究開始当初の背景

骨を作る細胞は骨芽細胞と呼ばれ、骨を溶かす細胞は破骨細胞と呼ばれる。骨粗鬆症に代表されるように、骨を溶かす(吸収する)方が過多になると骨量が減少して骨がもろくなり、骨折をしやすくなる。多くの骨粗鬆症の治療薬は、破骨細胞による骨吸収を抑制するものであり、骨形成の増加にはつながらない。そこで、骨形成を増強する薬物治療を目指した新規薬物の開発・臨床試験が進められており、骨形成を促す医療が発展するものと考えられた。そのためには、骨芽細胞を活性化して骨形成を促進する様々なメカニズムを明らかにしていくことが必要である。

研究代表者らは、AP-1 ファミリーの転写因子について長年研究を重ねてきた。AP-1 は Fos ファミリーと Jun ファミリーの分子のヘテロダイマー(ヘテロ 2 量体)か、Jun ファミリーのホモダイマーである。全身で Fos ファミリーの転写因子 Fra-1 を発現する、初期のトランスジェニックマウスでは、骨芽細胞による骨形成活性が亢進し、骨髄腔が骨梁で徐々に満たされていった(Jochum et al, 2000, Nature Medicine)。しかしこのマウスにおける骨形成亢進の分子メカニズムは、トランスジェニックマウスが作製されてから 10 年以上経っても不明のままであった。

それまでに、Fra-1 トランスジェニックマウス(Fra-1 マウス)でわかっていたことは、炎症性サイトカインなどの免疫系の遺伝子応答が低下していること、組織の線維化が起こること、骨折時に軟骨性化骨の形成が低下すること(成長板には異常は認められないことに注意)などであった。Fra-1 マウスにおける骨形成亢進のメカニズムの解析が進まない最大の理由は、Fra-1 マウスから調製した頭蓋骨由来の骨芽細胞や、Fra-1 を強制発現した骨芽細胞株において、試験管内では骨形成促進が十分に再現されなかったことであった。つまり、骨芽細胞以外の細胞が介在することが、骨形成亢進に必要であると考えられた。そこで、骨芽細胞に関して、細胞非自律的な現象である可能性を追究することにした。

米国 Baron 研では、Fra-1 マウスが作製されたのと同様時期に Fos ファミリーの FosB (デルタフォス B) を発現するトランスジェニックマウスが作製され、このマウスも Fra-1 マウスと同様に骨が増加した(Sabatagos et al, 2000, Nature Medicine)。彼らは中枢神経系における FosB の発現が骨を増加させると考えており、現在もそれを支持するデータを蓄積してきている。

Fra-1 の強制発現による骨芽細胞活性化のメカニズムはわかっておらず、FosB による骨芽細胞活性化と同じ現象かどうか不明である。このような状況で、Fra-1 の非細胞自律的な (cell autonomous でない) 作用を中心に仮説を立てることが必要になってきた。

## 2. 研究の目的

研究の目的は、Fra-1 マウスで骨形成が亢進しているメカニズムを明らかにすることである。複数の作業仮説に基づいて実験をおこない、骨髄形成(抑制)因子の探索、細胞外基質の異常、血管内皮細胞の骨形成における役割などを中心に実験を進めた。これらにより、どの細胞における Fra-1 が、どのような細胞メカニズムで骨形成を促進しているかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) コンディショナルトランスジェニックマウスの作製

ドキシサイクリンという無害の薬剤を餌に混ぜてマウスを飼育すると、Fra-1 遺伝子に誘導がかかり、全身の細胞で Fra-1 が発現するマウス (Rosa-rtTA; Fra-1 マウス) を作製した(スペイン国立がん研究所との共同研究)。これとは別に、あらかじめドキシサイクリンを摂取させておき、摂取をやめたときに骨芽細胞特異的 (Osx-tTA; Fra-1 マウス) および血管内皮細胞特異的 (Cdh5-tTA; Fra-1 マウス) に Fra-1 を発現する細胞特異的トランスジェニックマウスを作製した。これらのマウスから長管骨や耳小骨を摘出して解析した。

### (2) マイクロアレイによる解析

Fra-1 マウスと対照マウスの長管骨や、Fra-1 を強制発現した培養細胞とその対照細胞から RNA を回収してマイクロアレイを用いて遺伝子の発現解析を行った。

### (3) 組織学的解析

パラフィン切片、凍結切片を用いた免疫染色を行った。特に非脱灰骨の凍結切片の作製のために「川本法」を導入した。これは、切片を作製する際に、特殊なフィルムを張り付けて薄切するもので、組織の破損が少ない優れた方法であることが分かった。クエン酸やプロテアーゼ処理などの抗原賦活化法を抗体ごとに最適化し、またパラホルムアルデヒド固定液の濃度を調整するなどして、Fra-1、骨芽細胞マーカーとしてオステオカルシン、血管内皮細胞マーカーとしてエンドムチンなどの免疫染色を確立した。

### (4) 光シート顕微鏡による解析

従来の共焦点レーザー顕微鏡と異なり、励起光を面に入れ、その光シートの中をサンプルを横切らせて撮像することで立体画像を得るものであり、複数の角度で得られた画像を合わせた立体再構成をおこなった (LightSheet 顕微鏡, Zeiss)。組織の透明化法が複数報告されているが、骨の透明化は容易ではない。脱灰操作との組み合わせを試み、Scale 試薬と脱灰法を用いて骨の透明化を行うこととした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究の主な成果

細胞特異性について：

まず全身性に Fra-1 発現が誘導されるマウスを用いて様々な期間で Fra-1 の誘導をかけて骨への影響を解析した。その結果、生後 21 日目からわずか 5 日間 Fra-1 発現を誘導した場合にでも骨量の増加を観察できることが明らかとなった。

骨芽細胞特異的、あるいは血管内皮細胞特異的に Fra-1 を、希望する時期に発現するマウスを作製して、どの細胞で Fra-1 が過剰発現することが骨量増加につながるかを検討した。その結果、骨芽細胞特異的 Fra-1 マウスで有意な骨量増加が認められた一方、血管内皮細胞特異的 Fra-1 マウスでは骨量増加が再現されなかった。これらのことは、血管内皮細胞自律的な Fra-1 発現が骨形成促進の原因ではないことを示唆している。しかし、に記述するように、Fra-1 マウスにおける血管異常が見出され、それが次の突破口となった。

##### Fra-1 マウスにおける毛細血管異常

高解像度 X 線顕微鏡の 300 ミクロン以内という狭い視野を最大限に活用するために、小さい骨（耳小骨と腓骨）を用いた解析法を以前から開発してきた。今回、Fra-1 トランスジェニックマウスの耳小骨（ツチ骨）の中の毛細血管が野生型マウスに比べて直径が大きいことに着目し、骨形成と毛細血管の関係を解析した。その結果、ツチ骨の短突起とよばれる半球状の突起の解析で、骨芽細胞を周囲に伴う「骨形成性毛細血管（osteogenic capillary）」が存在し、血管周囲に骨形成を起こしていることを見出した。全身性 Fra-1 マウスでは、この骨形成性毛細血管が増生していた。つまり、血管から骨基質の材料を受け取った骨芽細胞が、血管周囲に骨基質を分泌して骨を作っていること、転写因子 Fra-1 が、骨形成性毛細血管の増生を促進している可能性が高い。

##### (2) 得られた成果の国内外の位置づけとインパクト

長管骨の成長板直下において血管と骨芽細胞の関係に関する論文が Adams 研から報告された (Kusumbe et al, 2014 Nature)。すなわち、骨の形態形成において、血管の果たす役割の大きさが改めて示されたといえる。本研究における骨形成性毛細血管は、耳小骨という特殊な骨で見いだされたものであり、その成果のインパクトは、耳小骨以外の「普通の骨」へ拡張できたときにはじめて高まるものと考えられる。

##### (3) 今後の展望

本研究では「骨形成性毛細血管」が、耳小

骨の短突起で見いだされた。耳小骨以外の骨における普遍的な存在であるかどうかは今後の実験で示す必要がある。さらに Fra-1 による骨形成亢進が、骨形成性毛細血管の増生によるものであるならば、その分子メカニズムの詳細を明らかにする必要がある。

骨髄腔では通常、骨芽細胞と血管内皮細胞とは距離があり、骨形成性血管は認められないことから、いわば「骨髄形成性血管」に変化するメカニズムの解明が重要であると考える。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1: Nango N, Kubota S, Hasegawa T, Yashiro W, Momose A, Matsuo K. Osteocyte-directed bone demineralization along canaliculi. Bone. 査読あり 2016;84:279-88. doi: 10.1016/j.bone.2015.12.006.

2: Matsuo K, Kuroda Y, Nango N, Shimoda K, Kubota Y, Ema M, Bakiri L, Wagner EF, Takeda Y, Yashiro W, Momose A. Osteogenic capillaries orchestrate growth plate-independent ossification of the malleus. Development. 査読あり 2015;142(22): 3912-20. doi: 10.1242/dev.123885.

3: Nango N, Kubota S, Takeuchi A, Suzuki Y, Yashiro W, Momose A, Matsuo K. Talbot-defocus multiscale tomography using the synchrotron X-ray microscope to study the lacuno-canalicular network in mouse bone. Biomed Opt Express. 査読あり 2013;4(6):917-23. doi: 10.1364/BOE.4.000917.

〔学会発表〕(計 16 件)

1: 松尾光一（招待講演）骨形成性毛細血管による耳小骨や長管骨の石灰化。第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2016 年 3 月 28-30 日ビッグパレットふくしま（福島県郡山市）

2: Kuroda Yukiko, Kuno Atsushi, Narimatsu Hisashi, Matsuo Koichi. Sialylated Glycans of MMP-9 Mark Bone Resorption Lacunae. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, October 9-12, 2015, シアトル（米国）

3: Nango Nobuhito, Kubota Shogo, Yashiro Wataru, Momose Atsushi, Ichinose Shizuko, Matsuo Koichi. Continuous Parathyroid

Hormone Injection in Mouse Has Differential Effects on Osteoclast Activation in Primary and Secondary Spongiosa. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, October 9-12, 2015, シアトル (米国)

4: Takada Ichiro, Shimoda Kouji, Kubota Yoshiaki, Ema Masatsugu, Takeda Yoshihiro, Nobuhito Nango, Yashiro Wataru, Momose Atsushi, Bakiri Latifa, Wagner Erwin, Matsuo Koichi. Osteogenic Capillaries Spatially Orient Pericapillary Osteoblasts to Direct Endochondral Ossification of the Malleus. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 12-15, 2014, ヒューストン (米国)

5: Nobuhito Nango, Shogo Kubota, Wataru Yashiro, Atsushi Momose, Makoto Morikawa, Koichi Matsuo. Continuous PTH Administration Stimulates Osteoclasts and Leads to Increased Cortical Bone Resorption at the Endosteal Surface, Widening of the Porosities, and Osteoclasts Contact with Osteocytes. Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, September 12-15, 2014, ヒューストン (米国)

6: Ichiro Takada, Nobuhito Nango, Yoshihiro Takeda, Atsushi Momose, Yoshiaki Kubota, Sho Kanzaki, Kouji Shimoda, Yasunari Takada, Latifa Bakiri, Erwin Wagner and Koichi Matsuo. Pericapillary Bone Formation by Mural Osteoblasts during Endochondral Ossification. (Poster) 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, October 4-7, 2013, ボルチモア (米国)

〔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〕

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

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松尾 光一 (MATSUO Koichi)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号 : 40229422

### (2)研究分担者 なし

### (3)連携研究者

高田 伊知郎 (TAKADA Ichiro)  
慶應義塾大学・医学部・特任講師  
研究者番号 : 50361655