

重力に対する骨芽細胞及び破骨細胞の応答解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2024-08-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本 樹, 関口 俊男, 鈴木 信雄 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/0002001164

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License.



重力に対する骨芽細胞及び破骨細胞の応答解析

山本 樹, 関口俊男, 鈴木信雄

〒927-0553 鳳珠郡能登町小木, 金沢大学 環日本海域環境研究センター 臨海実験施設

Tatsuki YAMAMOTO, Toshio SEKIGUCHI, Nobuo SUZUKI : Analysis of gravity response in osteoblasts and osteoclasts

【はじめに】

骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成によって常に作り変えられており、骨強度の維持や血中Ca濃度の調節が行われている。しかしながら、これら細胞活性のバランスが崩れると、骨粗鬆症や大理石骨病などの骨疾患につながる。従って、破骨細胞と骨芽細胞の相互作用による恒常性の維持が重要である。近年、破骨細胞の分化誘導に関連する因子としてRANKLとOPGが同定された。

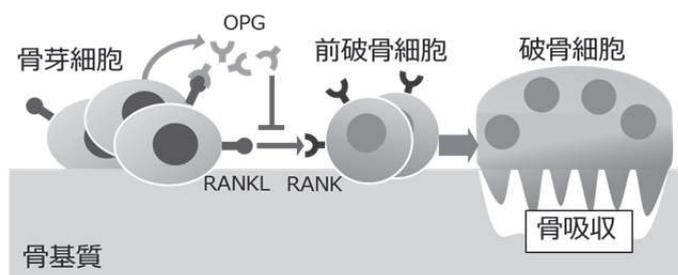


Fig 1. Differentiation of osteoclasts by the RANKL-RANK-OPG pathway

RANKLは骨芽細胞膜上にあるリガンドであり、受容体(RANK)は破骨細胞膜に存在する。さらに、骨芽細胞はデコイ受容体としてOPGを分泌しており、RANKLとの比をとったRANKL/OPG比が破骨細胞の活性化の指標となる (Fig 1)。以上のように、骨の細胞間の相互作用を調べることが骨を研究する上で必須であるが、解析に適したモデル系が欠如しているのが現状である。さらに、長期の宇宙飛行によって骨量が減少し、一方で運動等の物理的ストレスにより骨が強くなるように、重力が骨代謝に与える影響を解析する上でも、モデル系が必要とされる。そこで本研究では、骨基質上に破骨細胞と骨芽細胞が共存し、ヒトの骨とも共通点が多いキンギョの再生ウロコ (Suzuki N *et al.*, 2005 Kitamura, K. *et al.* 2010) を用いて、過重力及び擬似微小重力に対する応答を遺伝学的及び形態学的解析を行った。

【方法】

実験1：リアルタイムPCRを用いた過重力または微小重力における、骨芽細胞および破骨細胞マーカー遺伝子の発現量解析

通常のウロコに比べ活性が3倍から5倍高い再生ウロコを用い、96穴プレート中で培養した。過重力条件実験のサンプルは、遠心機により3Gで培養することで、微小重力実験サンプルは、3Dクリノスタットを用い培養することで調達した。再生ウロコサンプルを回収し、Total RNAを抽出、cDNAを合成した。Real time PCRにより、骨芽細胞及び破骨細胞における以下の遺伝子発現変動を解析した。

骨芽細胞活性の指標として、骨形成マーカーであるI型コラーゲン(Type I collagen; Col1a)とオステオカルシン (Osteocalcin; OCN)について検討した。さらに骨芽細胞の分化及び増殖を制御するWingless (Wnt) / β -カテニン経路に関連する因子の発現変動を解析した。一方、破骨細胞活性の指標となるマーカー遺伝子として、骨吸収酵素マーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP) 及びカテプシンK (Cathepsin K; CathK) のmRNA発現を調べた。さらに転写因子NFATc1によって誘導される破骨細胞の分化及び活性化に対する正負の制御因子のmRNA発現変動を検討した。

実験2：過重力または微小重力における、ウロコの形態学的解析

過重力または、微小重力環境下で培養したウロコの破骨細胞に与える影響を検討するために、ウロコを固定し、1% Alexa Fluor® 488 ファロイジンを含むPBSにおいて4日間、4°C及び暗条件下で静置し、細胞アクチンを染色した。さらに、PBSによる洗浄の後、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を用いて核の染色を行い、標本を蛍光顕微鏡(BX51, Olympus)で観察した。TRAP染色により破骨細胞を同定したうえで、破骨細胞におけるアクチンリングサイズと、破骨細胞と核の数を測定した。

【結果及び考察】

実験1：リアルタイムPCRを用いた過重力または微小重力における、骨芽細胞および破骨細胞マーカー遺伝子の発現量解析

骨芽細胞のマーカーであるI型コラーゲン及びオステオカルシンのmRNA発現は過重力刺激により上昇したが、擬似微小重力下では低下した。一方、破骨細胞のマーカーであるカテプシンK やTRAPの発現は過重力刺激により低下し、擬似微小重力下では上昇した。さらに過重力・擬似微小重力刺激の影響を詳細に解析するために、骨芽細胞では細胞の分化と増殖に重要であるWnt/ β -カテニン経路を、破骨細胞では分化及び抑制に関する制御機構の遺伝子発現変動を検討した結果、骨芽細胞において、Wnt経路を阻害する遺伝子の発現が刺激に応答した。そして、骨吸収の亢進に関連する遺伝子群や、抑制経路に関連する遺伝子の発現が刺激に反応して反応した。これら遺伝子発現解析によって、過重力刺激において骨形成が亢進され、擬似微小重力刺激によって骨吸収が亢進されることが明らかになった。

実験2：過重力または微小重力における、ウロコの形態学的解析

破骨細胞の変化はウロコ表面において骨基質との接着に関与するアクチンリング及び破骨細胞の核数の変化が見られた。このようなことから形態学的な観点からも破骨細胞の活性化が認められた。

【まとめ】

重力・擬似微小重力刺激を受けた骨組織において、骨芽細胞はWnt/ β -カテニン経路をWntアンタゴニストにより調節し、破骨細胞はNFATc1に誘導される制御機構を調節することにより、応答していると考えられる。また、これら細胞間の連絡にはOPG及びRANKLが重要である。従って、キンギョの再生ウロコは、骨代謝に与える重力の影響を解析する上で非常に有用であり、その機構解明に貢献できる可能性が高い。

【参考文献】

- Suzuki, N., *et al.*: Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis. *Life Sci.*, **22**, 2699-709 (2005)
- Kitamura, K. *et al.* Osteoblast activity in the goldfish scale responds sensitively to mechanical stress. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **156**, 357-363 (2010).

本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻 山本 樹氏の学位論文の一環として行われた。本研究の内容は、平成26年9月22-23日、大阪府立大学において開催された日本宇宙生物科学会第28回大会で発表され、優秀賞を受賞した。