慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	骨吸収窩糖タンパク質が誘導する新規骨形成制御機構の解明
Sub Title	Identification of the glycoproteins-induced bone formation mechanisms at bone resorption lacunae
Author	黒田, 有希子(Kuroda, Yukiko)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	骨吸収窩に豊富に存在する糖タンパク質の生理的役割はあまりよくわかっていない。軟骨が骨に置き換わる内軟骨性骨化過程では、マトリックスプロテアーゼMMP-9の局在が、糖鎖修飾の有無により大きく異なっていた。軟骨が骨に置き換わる血管侵入部位ではシアル酸修飾されていないMMP-9が、破骨細胞内や骨形成能を持つ骨芽細胞が集積している吸収窩ではシアル酸修飾を受けたMMP-9が発現していた。以上の結果より、シアル酸修飾されていないMMP-9は血管内皮細胞を誘引し、シアル酸修飾されたMMP-9は骨芽細胞の集積と骨形成を誘導していることが強く示唆された。 Abundant glycoproteins exist in bone resorption lacunae, whereas their physiological roles remain unknown. During endochondral ossification, localization of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) was significantly different according to its glycosylation state. Non-glycosylated MMP-9 is exclusively present around tips of capillary vessels in the chondro-osseous junction. On the other hand, sialylated MMP-9 exists in osteoclasts and resorption lacunae accompanied with mature osteoblasts. These results suggest that non-glycosylated MMP-9 attracts endothelial cells, while sialylated MMP-9 enhances the osteoblast migration and bone formation at bone resorption lacunae.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K08506 研究分野：骨生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K08506seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０８５０６

研究課題名（和文）骨吸収窩糖タンパク質が誘導する新規骨形成制御機構の解明

研究課題名（英文）Identification of the glycoproteins-induced bone formation mechanisms at bone resorption lacunae

研究代表者
黒田　有希子（Kuroda, Yukiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：７０４５５３４３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：　骨吸収窩に豊富に存在する糖タンパク質の生理的役割はあまりよくわかっていない。軟骨が骨に置き換わる内軟骨性骨化過程では、マトリックスプロテアーゼMMP-9の局在が、糖鎖修飾の有無により大きく異なっていた。軟骨が骨に置き換わる血管侵入部位ではシアル酸修飾されていないMMP-9が、破骨細胞内や骨形成能を持つ骨芽細胞が集積している吸収窩ではシアル酸修飾を受けたMMP-9が発現していた。以上の結果より、シアル酸修飾されていないMMP-9は血管内皮細胞を誘引し、シアル酸修飾されたMMP-9は骨芽細胞の集積と骨形成を誘導していることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　本研究では、骨吸収窩に存在する糖タンパク質に注目し、その糖鎖修飾の骨形成における生理的意義を解明しようと挑戦する点に高い新規性・独創性がある。骨吸収部位での骨形成機構に関する知見は数多く報告されているが、次段階である骨形成誘導の有無で骨吸収窩を分類し、「それぞれの骨吸収窩によって異なる機構が働いている」という発想の研究はなく、その役割の違いを見つけようとする発想が独創的である。もし、これらの糖タンパク質が骨形態形成機構に関与していれば、生体内の骨形成を新しい視点から見ることができるだけでなく、骨形成を促す技術としても応用できるため、医療に大きな貢献ができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Abundant glycoproteins exist in bone resorption lacunae, whereas their physiological roles remain unknown. During endochondral ossification, localization of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) was significantly different according to its glycosylation state. Non-glycosylated MMP-9 is exclusively present around tips of capillary vessels in the chondro-osseous junction. On the other hand, sialylated MMP-9 exists in osteoclasts and resorption lacunae accompanied with mature osteoblasts. These results suggest that non-glycosylated MMP-9 attracts endothelial cells, while sialylated MMP-9 enhances the osteoblast migration and bone formation at bone resorption lacunae.

研究分野：骨生物学

キーワード：骨形成　糖鎖　骨吸収窩　骨芽細胞　破骨細胞　血管内皮細胞

１．研究開始当初の背景

正常な骨形成機構を理解する上で、骨形成と骨吸収の相互作用を理解することは重要な課題である。研究代表者はこれまでに、破骨細胞の分化メカニズムを中心に研究を行い、その中で骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞の相互作用の重要性を明らかにしてきた。(Kuroda Y. et al. Proc.Natl.Acad.Sci., 2008, 105(25):8643-8、Kuroda Y. et al. Mol Cell Biol. 2012, 32(14):2954-63)。また、最近の研究により、研究代表者らは軟骨が骨に置き換わる内軟骨性骨化の過程において、周囲に骨形成を促す性質を持つ血管「骨形成性血管」が存在することを報告した（Matsuo K., Kuroda Y. et al. Development. 2015, 142: 3912-3920)。以上のことから、骨芽細胞が骨形成部位を認識するメカニズムを理解するためには「血管内皮細胞・骨芽細胞・破骨細胞」の三者の関係を明らかにすることが重要な課題であると考えている。

一方、従来の骨吸収窩染色法において Wheat germ agglutinin（WGA）レクチンが用いられていることから（Selander K et al. Calcif Tissue Int. 1994, 55 (5): 368-75)、研究代表者は骨吸収窩に存在する糖タンパク質に注目し、新たな骨形成制御因子「骨形成部位マーキング糖タンパク質」を同定することを目指している。これまでの実験により、破骨細胞から分泌され、骨吸収窩に留まる糖タンパク質として、シアル酸修飾を受けたマトリックスプロテアーゼ MMP-9 を同定した（米国骨代謝学会にて発表、シアトル、2015 年 10 月）。MMP-9 ノックアウト（MMP9KO）マウスは成長板直下における血管侵入と骨石灰化に異常があること、これらの異常は野生型マウスの骨髄細胞を移植することで回復することから（Vu TH et al. Cell. 1998, 93(3):411-22)、骨髄由来細胞から分泌される MMP-9 が血管侵入と骨石灰化を制御していることは明らかである。研究代表者はこれまでに、シアル酸を認識するレクチン Maackia amurensis hemagglutinin（MAH）と抗 MMP-9 抗体との二重染色により、破骨細胞培養（*in vitro*）により形成された骨吸収窩では全ての吸収窩内に糖鎖修飾を受けた MMP-9 が存在していること、*in vivo* では骨基質上に存在する破骨細胞はシアル酸修飾を受けた MMP-9 を発現しているのに対し、肥大軟骨が骨に置き換わる軟骨・骨接合部（chondro-osseous junction）ではシアル酸修飾を受けている MMP-9 と修飾を受けていない MMP-9 を発現している二種類の細胞が存在することを見つけている。さらに興味深いことに、骨形成が誘導される部位ではシアル酸修飾を受けた MMP-9 が、肥大軟骨に血管が侵入している先端部にはシアル酸修飾されていない MMP-9 が発現していることが分かった。肥大軟骨に侵入している血管の周囲には骨芽細胞が存在しないことから、この血管は骨形成性血管ではないと推測できる。つまり、シアル酸修飾を受けた MMP-9 は骨芽細胞に作用して骨形成を、修飾を受けていない MMP-9 は内皮細胞に作用して血管侵入を促している可能性が大きい。MMP-9 の糖鎖修飾の有無は酵素活性に影響を及ぼさないことから（Van den Steen PE et al. J Biol Chem. 2006, 281(27): 18626-37)、骨形成時には MMP-9 のプロテアーゼとしてではなく、リガンドとしての新しい機能が重要な役割を担っている可能性がある。これらの結果から、研究代表者は、骨形成時に重要な働きをもつ「血管内皮細胞・骨芽細胞・破骨細胞」の三者のうち、破骨細胞から分泌される MMP-9 が糖鎖の有無を介して骨芽細胞にそれぞれ違うシグナルを送っていると推測した。具体的にはシアル酸修飾のある糖鎖修飾型 MMP-9 は骨形成誘導分子として骨芽細胞を、糖鎖修飾のない未修飾型 MMP-9 は血管侵入誘導分子として内皮細胞を引き留める働きがあるのではないかという仮説を立てた（図 1)。

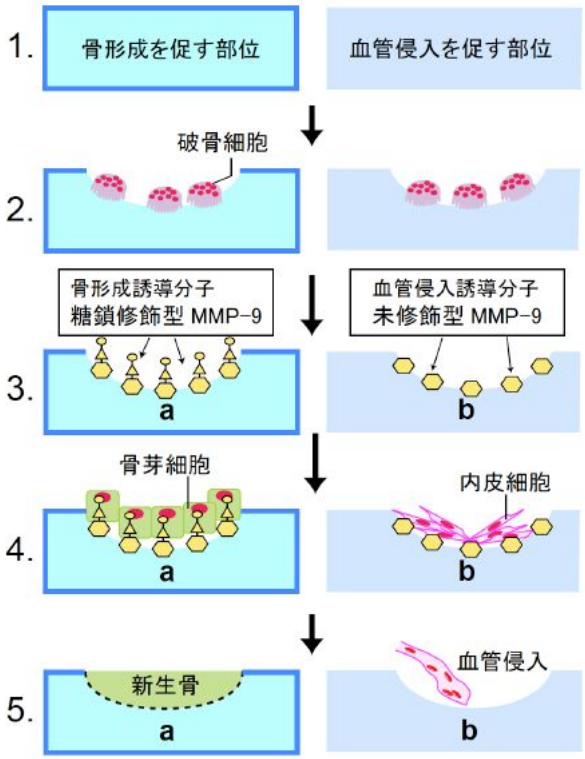

図1 仮説：骨吸収窩における骨形成制御機構
目的の形に骨が形成されるためには、破骨細胞によって骨吸収が起きた後（step 2）、骨形成を誘導する骨吸収窩(a)と骨形成が誘導されずに血管侵入を促す骨吸収窩(b)が存在するはずである（step 5)。それぞれの骨吸収窩を区別するマーキングタンパク質の候補分子としてMMP-9 が考えられ(step 3)、MMP-9 が糖鎖修飾の有無により引き留める細胞を変えること（step 4）で骨吸収窩の次段階を決定していると考えられる。

２．研究の目的

発生・成長の過程であるモデリング期の骨形成には、形成と吸収のバランスが保たれていることに加え、血管内皮細胞・骨芽細胞・破骨細胞の三者の相互作用により新しく形成される骨の場所が厳密に制御されていることも重要である。一般的に、骨を維持するリモデリング期は古い骨が吸収された部位を埋めるように新しい骨形成が起きるが、形態が活発に変化するモデリング期は、「骨形成を促す吸収窩」と「骨形成を促さない吸収窩」の両者が存在する。そこで本研究では骨吸収窩に豊富に存在する糖タンパク質の中でも、研究代表者が骨吸収窩のマーカー糖タンパク質として同定したマトリックスプロテアーゼ MMP-9 に着目し、骨吸収窩糖タンパク質による新しい骨形成制御機構を見つけることを目的とした。具体的には、モデリング期の骨形成時において「糖鎖修飾を受けた MMP- 9 が骨芽細胞に骨形成を促す部位を認識させる役割を果たしている」可能性について検証することを目的とした。

３．研究の方法

(1) 生体内糖鎖修飾型 MMP-9 の局在と骨形成部位の観察

内軟骨性骨化により形成される骨のうち、成長板をもつ長管骨（大腿骨・脛骨）と成長板をもたない耳小骨（ツチ骨）のパラフィン切片と凍結切片を作製し、「血管侵入、軟骨吸収、骨形成、骨石灰化、骨吸収」を観察した。血管内皮細胞はエンドムチンと CD31 の免疫染色を、骨芽細胞はＩ型コラーゲンとオステオカルシンの免疫染色を、破骨細胞はカテプシン K の免疫染色と TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)染色を行うことで検出した。また、骨形成部位はカルシウム結合蛍光色素カルセインを皮下注射したマウスからサンプリングすることで骨石灰化部位を可視化した。糖鎖修飾型 MMP-9 は MAH レクチンと抗 MMP-9 抗体を使って検出した。

(2) マウス耳小骨（ツチ骨）の発生過程における「血管侵入、軟骨吸収、骨形成、骨石灰化、骨吸収」の観察

生後 0、6、9、14、21 日齢のマウスから耳小骨を採取し、パラフィン切片と非脱灰凍結切片（川本法）を作製した。組織学的染色ではヘマトキシリン＆エオジン染色、サフラニン O 染色を行い、血管侵入が始まる時期や軟骨が骨に置き換わる時期の特定を行った。生体内の骨形成部位を検出するためにはカルシウム結合蛍光色素カルセイン、またはアリザリンコンプレキソンを皮下注射し、24 時間後にサンプルを回収した。骨吸収部位はパラフィン切片を TRAP 染色することで検出した。

(3) Ｉ型コラーゲン(Col1a1)の発現が低い骨芽細胞の同定と観察

骨芽細胞は「エンドムチン陽性の血管内皮細胞の周囲に存在し、成熟骨芽細胞マーカーのオステオカルシンを発現し、かつ石灰化能を有する細胞」として定義した。生後 0 日-21 日齢の耳小骨発生過程のサンプルを用意し、骨芽細胞マーカーであるＩ型コラーゲン（*Col1a1*)、オステオカルシン（*Bglap*)、Runx2 の in situ ハイブリダイゼーション を行い、マーカー遺伝子の発現がどのように変化するのかを観察した。

４．研究成果

本研究では骨吸収窩に豊富に存在する糖タンパク質の中でも、マトリックスプロテアーゼである MMP-9 に着目し、「糖鎖修飾型 MMP-9 が骨形成を促す部位を骨芽細胞に認識させる役割を果たしている」可能性について検証することを目的とした。研究代表者はこれまでに、シアル酸を認識するレクチン Maackia amurensis hemagglutinin（MAH）と抗 MMP-9 抗体との二重染色により、破骨細胞培養（*in vitro*)により形成された骨吸収窩では全ての吸収窩内にシアル酸修飾を受けた MMP-9 が存在していること、マウス生体内(*in vivo*)の成長板直下ではシアル酸修飾を受けた MMP-9 と受けていない MMP-9 が存在することを見つけてきた。長管骨の成長板は軟骨細胞が増殖を続けながら血管侵入、軟骨・骨吸収と骨形成が起きるため、各事象を切り離して考えることは困難である。実際、成長板直下の MMP-9 を観察してみると、シアル酸修飾を受けている MMP-9 と修飾を受けていない MMP-9 が混在していた（図 2)。そこで、「軟骨細胞の増殖・分化」状態が揃っているサンプルを用いた方が解析に適していると考え、内軟骨性骨化により形成されるが成長板を持たないマウス耳小骨（ツチ骨）に着目した。生後 0 日齢のマウス耳小骨は完全に軟骨であり、約 3 週間かけて石灰化した骨となる。生後 9 日目から 14 日目にかけては血管侵入と軟骨細胞の吸収、骨形成が継時的に観察できた。そこで、生後 10 日齢付近のマウス耳小骨（ツチ骨）を観察してみると、軟骨が骨に置き換わる血管侵入

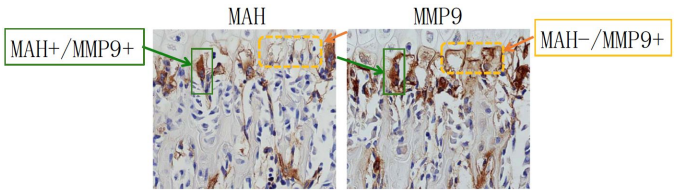

図 2 マウス脛骨成長板直下の MMP-9 の局在とシアル酸修飾の様子
割面を共有している組織切片で、シアル酸修飾認識レクチン MAH 染色（左）と抗 MMP-9 抗体を用いた免疫染色（右）を行った。その結果、成長板直下にはシアル酸修飾された MMP-9（緑枠）と修飾されていない MMP-9（橙枠）が存在することが分かった。

部位ではシアル酸修飾されていないMMP-9が発現していた。この結果は、軟骨・骨接合部の血管侵入部位に存在するシアル酸修飾されていないMMP-9が血管内皮細胞を誘引している可能性を示唆している。また、同じ時期の軟骨・骨基質上に存在する破骨細胞と吸収窩ではシアル酸修飾を受けたMMP-9が発現していた。耳小骨の石灰化は「骨形成性血管」を介して進行する。骨形成性血管の形成過程では、血管周囲に破骨細胞が出現して軟骨・骨を吸収し、血管が拡張する空間を作り、その空間へ骨芽細胞が集積する。つまり、シアル酸修飾されたMMP-9が存在する付近で骨芽細胞の分化誘導が促されることが強く示された。また、破骨細胞欠損マウスの耳小骨を解析したところ、血管周囲への骨芽細胞の集積が見られなかった（日本骨代謝学会、2016年にて発表）。以上の結果は、骨芽細胞の誘引には破骨細胞が必須であることを示しており、破骨細胞から分泌されるシアル酸修飾型MMP-9に重要な役割があることを示唆している。興味深いことに、研究代表者が耳小骨の解析を進めていくと、耳小骨の骨形成性血管を構成している骨芽細胞は一般的な骨芽細胞とは異なる性質を持つ新しい種類の骨芽細胞であることが分かった（米国骨代謝学会・日本骨代謝学会、2017年・2018年にて発表）。この新しい骨芽細胞は、一般的な骨芽細胞では発現が高いことで知られるⅠ型コラーゲン（Col1a1）の発現が低い。しかしながら、成熟骨芽細胞マーカーであるオステオカルシンの発現は高く、石灰化能も一般的な骨芽細胞よりも高いことが明らかとなった。今後は石灰化能の高い骨芽細胞の性質を明らかにしつつ、破骨細胞から分泌されたシアル酸修飾型MMP-9の機能は一般的な骨芽細胞と耳小骨の骨芽細胞の両者に共通の機構かどうかを調べていきたいと考えている。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　6　件）

1. Matsuo K., Ji S., Miya A., Yoda M., Hamada Y., Tanaka T., Takao-Kawabata R., Kawaai K., Kuroda Y., Shibata S., Innervation of the tibial epiphysis through the intercondylar foramen, 2019年, Bone,査読有, 120, 297 – 304, doi: 10.1016/j.bone.2018.11.007

2. Edamoto M., Kuroda Y., Yoda M., Kawaai K., Matsuo K., Trans-pairing between osteoclasts and osteoblasts shapes the cranial base during development, 2019年, Scientific Reports, 査読有, 9, 1956, doi: 10.1038/s41598-018-38471-w

3. Sakamoto A., Kuroda Y., Kanzaki S., Matsuo K., Dissection of the Auditory Bulla in Postnatal Mice: Isolation of the Middle Ear Bones and Histological Analysis, 2017年, J Vis Exp, ,査読有, 119, e55054, doi: 10.3791/55054

〔学会発表〕（計　10　件）

1. Yukiko Kuroda, Hypermineralization of bones by Col2a1-expressing osteoblasts, ASBMR 2018 Annual meeting（国際学会）, 2018年

2. 黒田有希子、骨密度の高い骨はII型コラーゲンを産生する「超石灰化骨芽細胞」によって作られる、第36回日本骨代謝学会学術集会、2018年

3. Yukiko Kuroda, A novel osteoblast subpopulation initiates endochondral ossification by forming osteogenic capillaries, ASBMR 2017 Annual meeting（国際学会）, 2017年

4. 黒田有希子、内軟骨性骨化～軟骨が骨に置き換わる部位では特殊な骨芽細胞が働いていた、第16回松本ボーンフォーラム、2017年

5. 黒田有希子、Col1a1low骨芽細胞は内軟骨性骨化で働く新たな骨芽細胞群である、第35回日本骨代謝学会学術集会、2017年

6. 黒田有希子、軟骨内の骨形成性毛細血管構築には破骨細胞が必要である、第34回日本骨代謝学会学術集会、2016年

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/
慶應義塾　研究者情報データベース　https://k-ris.keio.ac.jp

６．研究組織

(1)研究分担者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。