

第34回

ISSN 1349-0761

# 日本骨代謝学会学術集会

*The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Bone and Mineral Research*

## 第3回アジア太平洋骨代謝学会議

*The 3rd Asia-Pacific Bone & Mineral Research Meeting*

### プログラム抄録集

*Program & Abstracts*

会長

宗圓 聰 (近畿大学医学部奈良病院整形外科・リウマチ科)

会期

2016年7月20日(水)~23日(土)

会場

大阪国際会議場

〒530-0005 大阪府大阪市北区中之島5-3-51

TEL: 06-4803-5555 (代表) FAX: 06-4803-5620

ホームページ

<http://www2.convention.co.jp/34jsbmr-apbmr2016>





**P2-51** マウス骨細胞系 MLO-Y4 細胞株においてシバスタチンは NADPH oxidase 1 および 2 発現の抑制を介してホモシステインによるアポトーシスを促進を解除する  
竹野 歩, 金沢 一平, 田中賢一郎, 野津 雅和, 横本 真希, 杉本 利嗣

高根大学 医学部 内科学講座内科学第一

【背景】 Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase 阻害薬であるスタチンは骨芽細胞分化を促進し骨形成に働くことは知られているが、骨細胞への影響については不明である。ホモシステイン (homocysteine: Hcy) は酸化ストレスを増加させることにより骨芽細胞・骨細胞のアポトーシスを誘導する。一方、スタチンは NADPH oxidase (Nox) などの酸化ストレス誘導因子を制御して酸化ストレスを緩和することが知られている。したがって、スタチンが Hcy による骨細胞のアポトーシスを誘導に対して抑制的に働く可能性が考えられる。【目的】 マウス骨細胞系 MLO-Y4 細胞株においてスタチンが Hcy によるアポトーシスを抑制するか、また酸化ストレス誘導因子である NADPH oxidase (Nox) の発現に影響するか否かを明らかにする。【方法】 スタチンは脂溶性である simvastatin (SIM) と水溶性である pravastatin (PRA) を用いた。MLO-Y4 細胞がコンフルエントになった後に各試薬を添加し、60 時間後にヌクレオソーム断片を検出する ELISA 法、72 時間後に TUNEL 染色にてアポトーシスを検討した。Nox の発現について real-time PCR を用いて検討した。【結果】 TUNEL 染色において Hcy 5 mM は MLO-Y4 細胞のアポトーシスを有意に増強した。Hcy と SIM 10<sup>9</sup> M および 10<sup>8</sup> M の同時添加は、Hcy のアポトーシス誘導作用を有意に阻害した。ELISA でも SIM の抗アポトーシス作用を確認した。一方、PRA の添加では有意な抗アポトーシス効果は認められなかった。Real-time PCR にて Hcy 5 mM の添加により Nox1 および Nox2 mRNA 発現が増加した。SIM 10<sup>9</sup> M および 10<sup>8</sup> M の添加は、Hcy による Nox1 および Nox2 mRNA 発現の増加を有意に抑制した。Hcy および SIM は Nox4 発現に影響しなかった。【考察】 SIM は Hcy による骨細胞のアポトーシスを抑制することが明らかとなり、その機序として Nox1 と Nox2 を抑制することが示唆された。一方、PRA には明らかな抗アポトーシス作用は確認されず、class effect がある可能性が示唆された。【結語】 SIM は Hcy による骨細胞のアポトーシスと、それにより引き起こされる骨脆弱性を軽減する可能性がある。

**P2-53** Alternation in gap-junctional intercellular communication capacity during the ex vivo transformation of osteocytes in the embryonic chick calvaria

Ziyi Wang, Naoya Odagaki, Tomoyo Tanaka, Mana Hashimoto, Hiroshi Kamioka

Department of Orthodontics, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Japan

**Introduction:** The intercellular network of cell-cell communication among osteocytes is mediated by gap junctions. Gap junctional intercellular communication (GJIC) is thought to play an important role in the integration and synchronization of bone remodeling. To further understand the mechanism of bone development it is important to quantify the difference in the GJIC capacity of younger and mature osteocytes ex vivo.

**Materials and Methods:** We first established an embryonic chick calvaria growth model to show the growth of the calvaria in embryos at 13 to 21 days of age. We then applied a fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) technique to compare the difference in the GJIC capacity of younger osteocytes with that of more mature osteocytes. Finally, we quantified the dye (Calcein-AM) diffusion from the FRAP data using a mathematic model of simple diffusion which was also used to identify simple diffusion GJIC pattern cells (fitted model) and accelerated diffusion GJIC pattern cells (non-fitted model).

**Results:** The relationship between the longest medial-lateral length of the calvaria (frontal bone) and the embryonic age fit a logarithmic growth model:  $length = 5.326 \times \ln(day) - 11.595$ . The morphometric data during osteocyte differentiation showed that the cellular body becomes more spindle-shaped and that the cell body volume decreased by approximately 22% with an increase in the length of the processes between the cells. However, there were no significant differences in the cellular body surface area or in the distance between the mass centres of the cells. The dye-displacement rate in younger osteocytes was significantly higher than that in mature osteocytes: dye displacement only occurred in 26.88% of the mature osteocytes, while it occurred in 64.38% of the young osteocytes. Additionally, in all recovered osteocytes, 36% of the mature osteocytes were the non-fitted model cells while 53.19% of the young osteocytes were the non-fitted model, which indicates the active transduction of dye molecules. However, there were no statistically significant differences between the young and mature osteocytes with regard to the diffusion coefficient, permeability coefficient, or permeance of the osteocyte processes, which were  $3.93 \pm 3.77 (\times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s})$ ,  $5.12 \pm 4.56 (\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s})$  and  $2.99 \pm 2.47 (\times 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{s})$  (mean  $\pm$  SD) respectively.

**Conclusions:** These experiments comprehensively quantified the GJIC capacity in the embryonic chick calvaria and indicated that the cell-cell communication capacity of the osteocytes in the embryonic chick calvaria was related to their age.

**P2-52** 授乳期のカルシウム欠乏食給餌マウスにおける骨細胞周囲の骨基質の微細構造学的変化について

本郷 裕美<sup>1</sup>, 佐々木宗輝<sup>2</sup>, 斎藤 雅美<sup>3</sup>, 宇田川信之<sup>4</sup>, 網塚 憲生<sup>1</sup>

北海道大学 歯学部 硬組織発生生物学教室<sup>1</sup>, 長崎大学 医歯薬学総合研究科 口腔インプラント学分野<sup>2</sup>, ブルカー AXS 株式会社 松本歯科大学 口腔生化学講座<sup>4</sup>

【目的】 授乳期のマウスは乳汁を介してカルシウム (Ca) の排出量が多くなるため、時として低カルシウム血症に陥ることが知られている。そこで妊娠マウスを、アレンドロネート投与群 (破骨細胞の骨吸収抑制) と非投与群に分け、さらに Ca 欠乏食を給餌することで Ca の供給量を減らし、骨細胞周囲の骨基質に変化が現れるか微細構造学的に検索した。

【材料と方法】 生後 12 週齢の妊娠マウスをアレンドロネート投与群 (1mg/kg, 10 日間) と非投与群に分け、出産直後から Ca 欠乏食 (Ca:0.018%) を給餌した。それぞれ数時間後に固定し、血中 Ca 濃度測定、TRAP 染色、トルイジンブルー染色、von Kossa 染色、原子間力顕微鏡 (AFM) によるナノインデンテーション、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察、共焦点レーザー顕微鏡観察、<sup>45</sup>Ca 安定同位体投与による同位体顕微鏡観察を行った。

【結果と考察】 授乳期マウスではアレンドロネート投与の有無に関わらず、Ca 欠乏食給餌 48h 後血中 Ca 濃度は低下した。また授乳期では TRAP 陽性破骨細胞が増加したが、アレンドロネート投与群では破骨細胞は明らかな波状縁を持たず、またアポトーシスに陥っているものも見られた。Ca 欠乏食給餌 48h 後の試料を AFM 観察すると、骨小腔周囲の骨基質の弾性率は低下傾向を示しており、それらを von Kossa 染色すると、アレンドロネート投与群・非投与群ともに骨小腔周囲に広い未石灰化骨基質が認められた。TEM 観察では、骨小腔周囲に不規則な外形を示し、骨小腔内部にはコラーゲン線維が分解されたと思われる不定形構造物が見られた。また Ca 欠乏食給餌 72 時間後から Ca 充足食に切り替えた骨を共焦点レーザー顕微鏡にて観察すると、骨小腔と細管に一致したカルセイン標識が認められた。<sup>45</sup>Ca 安定同位体を出産後 4~6 日間の間に与えて同位体顕微鏡にて観察すると、骨小腔周囲に <sup>45</sup>Ca 安定同位体の局在を認めた。以上より、骨細胞は、一過性に周囲の骨基質を溶解し、その後、石灰化沈着を誘導することが示唆された。



**P2-54** 骨細胞が産生する exosome に含まれる miRNA の解析

佐藤 真理, 田村 正人

北海道大学 大学院歯学研究科 口腔分子生化学教室

【目的】 骨細胞は胸腺や脂肪など遠隔他臓器への関与が示唆されているがその制御機構は明らかではない。本研究では骨細胞による遠隔他臓器制御機構の一端として、骨細胞が産生する exosome に含まれる microRNA に着目した。骨細胞が血中に放出する exosome に含まれる miRNA が遠隔他臓器の細胞を制御している可能性を検証することを目的とし、骨細胞 exosome に特異的な miRNA の同定を目指した。【方法】 野生型マウスと骨細胞除去マウス (Tatsumi et al. *Cell Metabolism*; 2007) の血清から exosomal miRNA を抽出し、miRNA アレイ解析を行った。マウス骨細胞株 MLO-Y4 細胞とマウス骨髄ストローマ細胞株 ST-2 細胞の細胞内および培養上清中から exosomal miRNA を抽出し miRNA アレイ解析を行った。MLO-Y4 細胞培養上清中の exosomal RNA に関してはさらに次世代シーケンズ解析を行い、成熟型 miRNA の定量を行った。これらのデータを比較、解析し骨細胞が血中に放出する exosome に特異的に含まれる miRNA の同定を行った。【結果】 1) 骨細胞除去マウスと野生型マウスの血清から抽出した exosomal miRNA のアレイ解析より、骨細胞除去マウスで増加または減少している exosomal miRNA を 30 種類ずつ同定した。2) MLO-Y4 または ST-2 の細胞培養上清中から抽出した exosomal miRNA のアレイ解析より、MLO-Y4 の exosome に多く含まれる 125 種類の miRNA を同定し、その内 85 種類の miRNA は細胞内よりも exosome 内に多く含まれていた。3) 骨細胞除去マウスの血清中 exosome で減少しており、かつ MLO-Y4 が放出する exosome に多く含まれている miRNA を 21 種類同定した。4) MLO-Y4 細胞培養上清中から抽出した exosomal small RNA の次世代シーケンズ解析によりリードカウント 10,000 以上の miRNA を 5 種類、1,000-9,999 の miRNA を 22 種類、999-95 の miRNA を 38 種類同定した。その内、miR3473-e は骨細胞除去マウスの血清中で減少し、MLO-Y4 細胞培養上清中で増加していた exosomal miRNA であった。【考察】 骨細胞が exosome を放出しておけるその exosome には骨細胞特異的と思われる exosomal miRNA が含まれることが分かった。今後の検討課題として 1) 骨細胞が放出する exosome が血液中にどれだけ放出されるのか 2) exosome がどの臓器のどの細胞にどれだけ取り込まれるのか 3) exosomal miRNA が他臓器の細胞で実際にどれだけ機能的に働くのかをあげられる。