HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Chronological immunolocalization of sclerostin and FGF23 in the mouse metaphyseal trabecular and cortical bone [an abstract of entire text]
Author(s)	櫻井, 敦中
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12599号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65581
Type	doctoral thesis
File Information	Atsunaka_Sakurai_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

学位論文題目

Chronological immunolocalization of sclerostin and FGF23 in the mouse metaphyseal trabecurar and cortical bone

（マウス骨幹端骨梁および皮質骨におけるスクレロスチンと FGF23 の経時的局在変化）

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　櫻井　敦中

【緒言】

骨基質に埋め込まれた骨細胞は、周囲の骨細胞や骨表面の骨芽細胞と細胞突起を介した細胞間ネットワーク、すなわち、骨細胞・骨細管系を形成する。骨細胞は多彩な役割を示すことが報告されており、例えば、骨細胞・骨細管系を通じた周囲の骨基質ミネラルの維持やメカニカルストレスの感知を行う。さらに、骨細胞が産生する sclerostin は Wnt/β-catein シグナルを介した骨芽細胞活性を抑制し、また、fibroblast growth factor (FGF)23 は腎臓の FGFR1c/αklotho 複合受容体を介して血中リン濃度を低下させることから、骨細胞は骨リモデリングや血中ミネラルバランスに深く関わることが推測されている。ところが、sclerostin や FGF23 は骨基質や骨細胞ネットワークの成熟度に応じて、それらを産生する骨細胞の局在が変化することから(Ubaidus et al, 2009, Hasegawa et. al, 2013)、個体発生・成長においても sclerostin や FGF23 産生細胞の局在が変化する可能性が考えられる。そこで、本研究では、マウスの胎生期、新生期、成長期、成獣期における sclerostin と FGF23 陽性細胞の局在を組織化学的に解析した。

【材料と方法】

胎生 18 日齢および生後 1 日齢、1, 2, 4, 8, 20 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを、パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定し、右側の大腿骨・脛骨を摘出した。摘出したサンプルは 10%EDTA-Na 溶液を用いて脱灰し、パラフィン包埋の後、厚さ 5μm の切片を作成し H-E 染色、sclerostin、FGF23、組織非特異型アルカリフォスファターゼ(tissue non-specific alkaline phosphatase, TNAP)免疫染色を施した。検索部位としては、骨幹端の骨梁全長における成長板側（骨・軟骨移行部）4 分の 1 の領域（close region）、および、骨梁の端末側 4 分の 1 の領域（distant region）を選択した。これら領域の骨梁における全組織量あたりの TNAP 陽性領域、全骨細胞数あたりの sclerostin 陽性骨細胞数、close region の骨梁と皮質骨における全組織量当たりの FGF23 陽性骨芽細胞領域および全骨細胞あたりの FGF23 陽性骨細胞数を計測し、Tukey-Kramer 法を用いた多重比較検定を行った。また、左側の大腿骨・脛骨および腎臓から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により *Fgf23, Fgfr1c, αklotho* の遺伝子発現を解析した。

【結果と考察】

マウスの骨基質表面マウス大腿骨遠位部の骨幹端骨梁における close region において、胎生 18 日齢から生後 8 週齢では、骨梁全周に TNAP 陽性骨芽細胞系細胞は厚い細胞層を形成したが、生後 20 週齢では、TNAP 陽性骨芽細胞は扁平化する傾向を示した。統計学的解析を行うと、全組織量に対する TNAP 陽性骨芽細胞領域は生後 8 週齢まで維持されたが、生後 20 週齢には有意に減少した。また、胎生 18 日齢から生後 2 週齢の骨梁は薄い骨基質と少数の骨細胞を示したが、生後 4、8 週齢の骨梁は骨基質の量が増加し、豊かな細胞体を有する円形もしくは類円形状の骨細胞を有していた。さらに、生後 20 週齢では、細胞体のふくよかな骨細胞は減少し、骨表面に平行な紡錘形状の骨細胞が観察された。一方、骨梁端の distant region では、個体成長とともに、TNAP 陽性骨芽細胞系細胞層の厚みや数が減少し、また、骨梁内部に存在する骨細胞は円形からやや

扁平なものへと変化した。以上より、骨軟骨移行部の close region は骨モデリング部位であり、成獣期においても骨芽細胞活性が高く維持される可能性が、一方、骨幹側の distant region は骨リモデリング部位であり、骨リモデリングを重ねるにつれて骨形成が緩やかになる可能性が推察された。

これらの組織所見を踏まえて sclerostin 免疫染色を行うと、胎生 18 日齢から生後 2 週齢の close region の骨梁において sclerostin 陽性細胞はほとんど存在せず、生後 4 週齢以降には少数の sclerostin 陽性骨細胞が観察され、その後、その数は週齢と共に有意に増加していった。一方、distant region の骨梁では、生後 1 日齢で若干数の sclerostin 陽性骨細胞が認められ、その後、その数は個体成長ともに有意に増加した。

骨梁および皮質骨における FGF23 陽性細胞の分布を検索すると、胎生 18 日齢から 1 週齢にかけて、FGF23 陽性反応は骨細胞ではなく、主に、骨芽細胞に認められた。しかし、生後 2 週齢になると、骨芽細胞だけでなく骨細胞も FGF23 陽性反応を示すようになり、生後 4 週齢から 20 週齢では骨細胞が FGF23 強陽性反応を示すようになった。統計学的解析を行うと、close region の皮質骨における全組織量に対する FGF23 陽性骨芽細胞領域はマウスの個体成長とともに減少する一方、FGF23 陽性骨細胞は生後 1 週齢から僅かに出現し始め、2 週後に多くの骨細胞が陽性反応を示し、その後、有意に増加した。

遺伝子解析を行うと、*Fgf23* 遺伝子発現は生後 1 日齢まではわずかであったが、生後 1 週齢以降では経時的に増加する傾向が認められた。*Fgfr1c* と*αklotho* 遺伝子発現については、腎臓では全時点において同程度の発現を示したが、大腿骨・脛骨では生後 2 週齢まで高い発現量を示すものの、その後、経時的に減少した。従って、成長過程のマウス大腿骨・脛骨では、*Fgf23* と受容体を構成する *Fgfr1c* と*αklotho* は相反的に発現する傾向が示唆された。

【結語】

マウスの成長過程において、骨軟骨移行部の骨梁よりも骨幹側の骨梁端部で、骨細胞は早期から sclerostin を産生することが強く示唆された。また、胎生期から生後1週ぐらいまでは骨芽細胞が、一方、生後 2 週以降では骨細胞が主要な FGF23 産生細胞であることが考察された。さらに、胎生期から生後 1, 2 週にかけて *Fgfr1c* と*αklotho* 発現が認められることから、この時期においては、FGF23 は、腎臓を介さず骨組織内で局所的に作用する可能性が推察された。