

137. 微小環境変化による組織転換メカニズムの解明

長谷川 智香

北海道大学 大学院歯学研究院 口腔健康科学講座 硬組織発生生物学教室

Key words : 骨芽細胞, 血管平滑筋細胞, 間葉系幹細胞, Gli1, 血管骨化

緒言

骨組織は、未分化間葉系細胞・造血系幹細胞などといった分化由来の異なる細胞だけでなく、血管や神経など多様な細胞群が存在する組織である。近年、分化由来の異なる骨の細胞（破骨細胞や骨芽細胞）と血管の間にダイナミックな細胞間相互作用が生じていることが報告されており [1, 2]、我々も骨芽細胞と血管における EphB4/ephrinB2 などのカップリングファクターを介した相互作用（骨血管連関）の可能性を明らかにしてきた [3, 4]。一方、骨血管連関だけではなく、慢性腎不全などで生じる大動脈の異所性石灰化が、物理的な石灰化沈着ではなく生物学的に生じている可能性、すなわち、大血管を構成する成熟した血管内皮細胞や血管平滑筋細胞が、微小環境変化によって骨の細胞へと転換し、石灰化を誘導する可能性も見出している [5]。これらの知見をもとに、我々は、「組織という多細胞による統一体が機能不全を起こした際には、その役割や機能を別の組織に求める組織転換というフィードバック機構（補償機構）が備わっているのではないか」という着想に至った。本構想において、組織転換は全身のどの組織でも誘導されうると推察しているが、まずは、全身の様々な組織・器官に分布する血管、および、一見して、循環器とは異なる機能を有する骨組織に注目し、生体内での微小環境変化に伴い血管および骨組織で組織転換が生じ得るのか、また、その細胞・組織間メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

本研究では、1. 骨から血管への転換：長期の環境変化（副甲状腺ホルモン投与）によって骨形成を行う骨芽細胞が血管系の細胞へと転換しうるか、2. 血管から骨への転換：骨とは離れた動脈の細胞が成熟した骨芽細胞になり骨基質形成を行うとともに骨の細胞群を誘導するなど、血管が骨組織に転換してしまう「血管骨化」が起こりえるか、また、その誘導メカニズム解明を中心に動物モデルを用いた解析を遂行した。

方法

1. 副甲状腺ホルモンによる骨血管連関の解析（骨芽細胞系細胞から血管系への組織転換）

骨組織に存在する骨芽細胞が、骨組織内の血管系を構成する血管内皮細胞・周皮細胞・平滑筋細胞に転換しうるか明らかにするため、野生型マウス（C57BL/6J）、ならびに、Gli1 陽性未分化間葉系幹細胞の子孫細胞追跡が可能な Gli1-CreErt2; Rosa26-tdTomato マウスに副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone : PTH）を投与し、大腿骨および脛骨における組織学的解析を行った。

生後 6 週齢 C57BL/6J マウス、および、同週齢の Gli1-CreErt2;Rosa26-tdTomato マウスに hPTH[1-34] (20 μ g/kg/day)、または、溶媒（生理食塩水）を 2 週間にわたって腹腔内投与した。なお、Gli1-CreErt2;Rosa26-tdTomato マウスには、hPTH 投与前にタモキシフェン (1 mg/day) を 2 日間投与し、Gli1 陽性細胞で tdtomato 蛋白を発現させた。これらのマウスは、麻酔下でパラホルムアルデヒド溶液を用いた灌流固定を行い、大腿骨および脛骨を摘出した。摘出した試料は、EDTA 脱灰後、パラフィンまたは OCT コンパウンドに包埋したのち、パラフィン切片および凍結切片作製に供した。これら切片を用いて、骨芽細胞・骨細胞関連因子（alkaline phosphatase、PHOSPHO1、podoplanin）、血管関連因子（endomucin、 α SMA、HIF1 α ）、未分化間葉系細胞

関連因子 (α SMA、c-kit) の局在を検討した。

2. *klotho* 遺伝子変異マウスを用いた血管骨化解析 (血管系から骨芽細胞系細胞への組織転換)

骨組織とは離れた部位に存在する大動脈が骨組織に転換する現象とそのメカニズムを明らかにするため、高リン・高カルシウム血症を呈する *klotho* 遺伝子変異 (*kl/kl*) マウス大動脈の組織学的解析および遺伝子発現解析を行った。

生後 8 週齢 *kl/kl* マウスを麻酔下で安楽死させ、大動脈を摘出した。摘出した大動脈は、パラホルムアルデヒド固定後マイクロ CT 撮影を行い、血管石灰化の確認を行った。その後、パラフィン切片を作製し、血管石灰化・骨化部位における骨芽細胞分化関連因子や骨基質蛋白 (Runx2、osterix、alkaline phosphatase、ENPP1、osteopontin、type I collagen など)、破骨細胞関連因子 (酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ: TRAP、cathepsin K など)、骨細胞関連因子 (FGF23、DMP1 など) の局在検討に供した。また、一部の血管石灰化・骨化部位から total RNA を抽出し、血管関連因子や骨芽細胞分化関連因子・骨基質蛋白の遺伝子発現を解析した。

結果および考察

1. 副甲状腺ホルモン投与マウスでは未分化間葉系細胞が骨芽細胞系細胞だけでなく血管系の細胞にも分化する

PTH を投与した野生型マウスの大腿骨骨幹端部では、骨梁周囲や骨髓腔に存在する endomucin 陽性骨特異的血管の周囲に、未分化間葉系細胞マーカーである c-kit および α SMA 陽性、かつ、骨芽細胞系細胞のマーカーである alkaline phosphatase (TNALP) 陽性を示す細胞が厚い細胞層を形成していた。また、endomucin 陽性骨特異的血管を取り囲む α SMA 陽性血管平滑筋細胞の増加や、血管系における HIF1 α 陽性反応の増強も認められ、PTH が骨芽細胞系細胞のみならず、血管系の細胞や間葉系細胞にも影響を及ぼす可能性が推測された (図 1)。

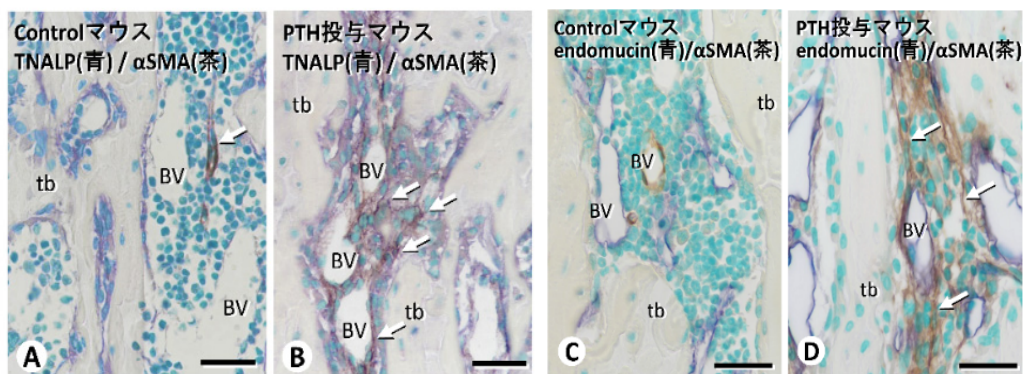


図 1. PTH 投与マウスの骨組織における骨芽細胞・血管系と間葉系幹細胞 (文献 [6, 7] を改変)
A、B) 溶媒投与 (control) マウスと PTH 投与マウス骨組織における alkaline phosphatase (TNALP) 陽性骨芽細胞系細胞 (青色) と α SMA 陽性間葉系幹細胞・血管平滑筋細胞 (茶色) の局在。PTH 投与マウスでは、骨梁や血管周囲の骨髓腔に α SMA 陽性細胞が増加しており、これらの細胞の一部は骨芽細胞のマーカーである alkaline phosphatase 陽性を示している。
C、D) control マウスと PTH 投与マウス骨組織における endomucin 陽性骨特異的血管 (青色) と α SMA 陽性間葉系幹細胞・血管平滑筋細胞 (茶色) の局在。PTH 投与マウスで増加した α SMA 陽性細胞の一部は、endomucin 陽性骨特異的血管を取り囲む血管平滑筋細胞として観察される。
スケールバー : 30 μ m。

これらを踏まえて、PTH 投与 Gli1-CreErt2; Rosa26-tdTomato マウスの解析を行ったところ、大腿骨骨幹端部で多数の Gli1/tdtomato 陽性を示す細胞が観察された。Gli1/tdtomato 陽性反応は、骨梁周囲の骨髓腔を満たす細胞層で認められたほか、TNALP 陽性骨芽細胞や podoplanin 陽性骨細胞、 α SMA 陽性血管平滑筋細胞にも認められたことから、Gli1 陽性未分化間葉系細胞は骨芽細胞系細胞に加えて、血管系の細胞(血管平滑筋細胞)にも分化する可能性が推測された。このことは、成熟骨組織の血管系の細胞は、一部、骨芽細胞系細胞と由来を同一とする間葉系幹細胞から分化することを示唆している。今後は、未分化間葉系細胞から骨芽細胞に分化が進んだ段階で発現が認められる osterix を指標とした osterix-CreErt2;Rosa26-tdTomato マウスを用いることで、骨芽細胞から血管系の細胞へ直接転換する可能性について解析を進めてゆきたい。

2. FGF23/klotho シグナルの破綻は、大動脈の血管平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞へ転換させる

FGF23/klotho シグナルが破綻した *kl/kl* マウスは高リン・高カルシウム血症を呈しており、大動脈中膜に著しい石灰化が認められた(図 2)。同部位では、変性・断裂した弾性線維が石灰化を受けており、石灰化基質には osteopontin や type I collagen などの骨基質蛋白の沈着が認められた。一方、血管平滑筋細胞は、骨芽細胞のマーカである TNALP や ENPP1 などの陽性反応を示すとともに粗面小胞体などの細胞内小器官を発達させており、周囲には、骨芽細胞が産生し骨基質石灰化の起点となる基質小胞様構造物を介した生物学的な石灰化が進行していた。遺伝子発現解析の結果、骨芽細胞や骨芽細胞分化関連因子(*Alp*, *Enpp1*, *Runx2*, *Osterix* 等)の発現が、野生型マウスと比較して有意に上昇しており、血管平滑筋細胞から骨芽細胞様細胞への転換が推測された。また、血管石灰化が著明に進行した部位には、石灰化基質に埋め込まれた DMP1 陽性骨細胞様細胞や、TRAP 陽性を示す破骨細胞様細胞も認められ、大動脈が単純に石灰化を受けるのみならず、機能的な骨組織が形成される血管骨化が生じている可能性が推測された。現在、血管平滑筋細胞から骨芽細胞様細胞への転換を誘導する候補因子をいくつか絞り込んでおり、これら誘導因子による血管-骨転換について検索を進めている。

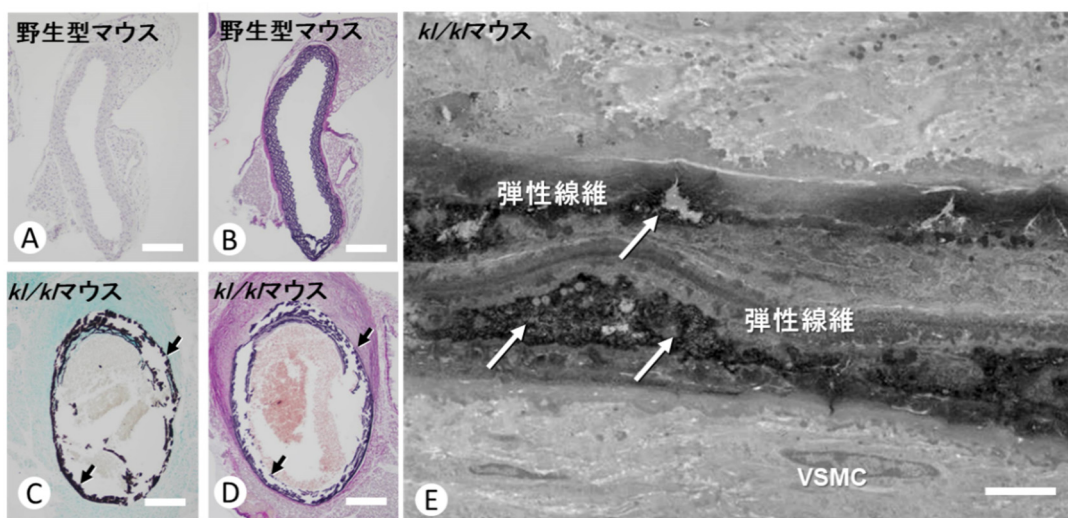


図 2. *kl/kl* マウス大動脈でみられた血管石灰化の組織像(文献 [5] を改変)

- A, C) 野生型および *kl/kl* マウス大動脈の von Kossa 染色像(石灰化物を黒色に染色)。
kl/kl マウスでは、大動脈中膜に石灰化物が認められる(C、矢印)
- B, D) 野生型および *kl/kl* マウス大動脈の van Gieson 染色像(弾性線維を紫に染色)。
kl/kl マウスでは、中膜の石灰化部位で弾性線維の断裂像が認められる(D、矢印)。
- E) *kl/kl* マウス大動脈石灰化部位の透過型電子顕微鏡像(矢印は石灰化物を示す)。
スケールバー : 300 μ m (A~D)、10 μ m (E)。

共同研究者・謝辞

本研究は、北海道医療大学歯学部組織学分野の細矢明宏教授、東京歯科大学口腔科学研究センターの溝口利英教授との共同研究として実施された。

文 献

- 1) Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):323-328. PMID: 24646994 DOI: 10.1038/nature13145.
- 2) Ramasamy SK, Kusumbe AP, Wang L, Adams RH. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):376-380. PMID: 24647000 DOI: 10.1038/nature13146.
- 3) Tsuchiya E, Hasegawa T, Hongo H, Yamamoto T, Abe M, Yoshida T, Zhao S, Tsuboi K, Udagawa N, Henrique Luiz de Freitas P, Li M, Kitagawa Y, Amizuka N. Histochemical assessment on the cellular interplay of vascular endothelial cells and septoclasts during endochondral ossification in mice. *Microscopy (Oxf)*. 2021 Mar 24;70(2):201-214. PMID: 32816022 DOI: 10.1093/jmicro/dfaa047.
- 4) Zhao S, Hasegawa T, Hongo H, Yamamoto T, Abe M, Yoshida T, Haraguchi M, de Freitas PHL, Li M, Tei K, Amizuka N. Intermittent PTH administration increases bone-specific blood vessels and surrounding stromal cells in murine long bones. *Calcif Tissue Int*. 2021 Mar;108(3):391-406. PMID: 33170307 DOI: 10.1007/s00223-020-00776-2.
- 5) Hasegawa T, Sasaki M, Liu Z, Yamada T, Yamamoto T, Hongo H, Suzuki R, Miyamoto Y, Yamamoto T, Freitas PHL, Li M, Amizuka N. Medial vascular calcification: a new concept challenging the classical paradigm of dystrophic calcification. *Hokkaido Journal of Dental Science*. 2013 Sep;34(1): 2-10.
- 6) Maruoka H, Zhao S, Yoshino H, Abe M, Yamamoto T, Hongo H, Haraguchi-Kitakamae M, Nasoori A, Ishizu H, Nakajima Y, Omaki M, Shimizu T, Iwasaki N, Freitas PHL, Li M, Hasegawa T. Histochemical examination of blood vessels in murine femora with intermittent PTH administration. *J Oral Biosci*. 2022 Sep;64(3):329-336. PMID: 35584768 DOI: 10.1016/j.job.2022.05.003.
- 7) Maruoka H, Yamamoto T, Zhao S, Hongo H, Abe M, Ishizu H, Yoshino H, Freitas PHL, Li M, Hasegawa T. Histological functions of parathyroid hormone on bone formation and bone blood vessels. *J Oral Biosci*. 2022 Sep;64(3):279-286. PMID: 35977651 DOI: 10.1016/j.job.2022.08.002.