



Title	骨細胞ネットワークの形成に関わる分子生物学的検討
Author(s)	西澤, 千晶
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101531
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (西 澤 千 晶)

論文題名

骨細胞ネットワークの形成に関わる分子生物学的検討

【研究背景・目的】

骨の基本構造は骨髄と骨基質とがあり、骨基質は高度に石灰化された緻密な層板構造によって骨の外側を構成する皮質骨と、骨の内側にて石灰化度の低いハニカム構造を呈する海綿骨に分けられる。その両構造に共通して骨基質中に骨細胞 (Osteocyte; Ocy) が埋没して存在し、Lacunar-Canalicular Network (LCN) と呼ばれる骨細胞ネットワークを形成しており、骨代謝の中核を担う重要な細胞として近年注目されている。

骨細胞は骨表面に存在する骨芽細胞と破骨細胞とともに骨を構成する細胞の一つで、骨芽細胞分化系列における最終分化の一形態である。骨を構成する細胞の9割以上を占めると言われている。そして何らかの未知のメカニズムにより、一部の骨芽細胞が骨基質内に埋め込まれ、樹状突起を伸ばし、すでに埋め込まれている骨細胞や骨芽細胞や破骨細胞といった骨表面の細胞とのつながりを保つためにネットワークを形成している。

骨細胞の機能は一般的に以下の3つに大きく分けられる。①骨表面に存在する骨芽細胞と破骨細胞に対する液性因子を介したリモデリングの調整、②骨細胞自身が骨基質の吸収・産生を行う骨小管周囲リモデリング、Perilacunar/canalicular remodeling (PLR) による骨基質の維持、③線維芽細胞増殖因子23 (FGF 23) に代表される骨と遠隔臓器との機能的連関に関わる内分泌機能を有している。

顎顔面口腔外科領域では、先天性のほか、外傷、感染、腫瘍の切除などにより大小さまざまな骨欠損を生じ、骨移植術や骨再建術を行うことは少なくない。その際、骨増生後は必ず再生部分が皮質骨と海綿骨に区分されて再生、治癒していく。私は、このような骨再生において骨細胞の領域による何らかの分子生物学的な差異が関わっているのではないかと考えた。

そこで、本研究では骨基質に含まれる『骨細胞の機能的多様性』を追求するために、ヒトの生理的な骨に含まれる骨細胞のトランスクリプトーム解析を試み、骨細胞の領域ごと (皮質骨および海綿骨) の遺伝子発現変化について検討し、骨再生における新たな概念を創成するための遺伝子発現制御機構を探索することを目的とした。

【方法と結果】

① 骨細胞に焦点を当てた網羅的遺伝子解析を可能にするための骨片の作成

骨細胞に焦点を当てたRNAシーケンス解析のための準備として、マウス初代骨細胞単離法 (Miyagawa et al, *Plos One*, 2014) を応用して、ヒト余剰腸骨組織の皮質骨および海綿骨の骨片から骨細胞を単離するための反応条件を設定した。しかし、単離細胞から得られる全RNAはほとんどが骨髄や骨膜などの軟組織細胞由来であり、骨細胞に富む分画由来のRNAはわずかであった。そこで、骨を皮質骨と海綿骨に分離し、前処理によって軟組織や骨芽細胞を取り除いた骨片より全RNAを回収する方法を適用した。処理前後におけるH-E染色や酵素染色を用いた組織染色や、骨芽細胞・骨細胞マーカー分子を用いた免疫染色を行い、骨細胞を豊富に含む骨片であることを確認した。また、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析でも、骨芽細胞マーカーが発現低下し、骨細胞マーカーが発現上昇していることを確認した。

② ヒト腸骨組織を用いた皮質骨および海綿骨におけるRNAシーケンス解析

6例の片側性唇顎口蓋裂患者にて顎裂部自家腸骨移植術を実施した患者から採取した余剰腸骨組織の皮質骨と海綿

骨の骨細胞に富む分画における網羅的遺伝子解析を実施した。摘出直後の骨片には骨細胞以外の細胞も多く含まれており、これらを骨片から取り除くため、マウス初代骨細胞単離法を応用して、骨芽細胞を取り除き、骨細胞を豊富に含む皮質骨の骨片（Osteocyte-rich Fragments of Cortical bone；以下 Ct. Ocy-Fr）と海綿骨の骨片（Osteocyte-rich Fragments of Trabecular bone；以下 Tr. Ocy-Fr）を得た。Total RNAを抽出し、bulk-RNA解析を行った。

③ トランスクリプトーム解析

RNA-seq解析によって検出された遺伝子のうちCt. Ocy-FrとTr. Ocy-Fr による2群間の遺伝子発現差解析によって発現変動遺伝子（Differentially Expressed Genes；DEGs）を抽出した。DEGsを対象としたIngenuity™ Pathway Analysis (IPA)を用いたPathway解析では、登録されている生物学的pathwayのうちZ-score解析にてCt. Ocy-Fr およびTr. Ocy-Frにて有意な差を認めたPathwayのうち約97 %がCt. Ocy-Frで活性化していると判定された。その中で細胞代謝やストレス応答に関わるPathwayがCt. Ocy-Fr において最も差のあるシグナルであった。一方で約3 %のみがTr. Ocy-Frで活性化していると判定された。Ct. Ocy-FrでTr. Ocy-Frより2倍以上発現が高かった遺伝子群を対象としたMetascapeによるEnrichment解析やNetwork解析では、細胞外基質の形成、石灰化、骨格成長、血管新生、成長因子への応答性に関わる生物学的プロセスや神経軸索形成に関連するTermが確認され、これらは複雑に関連していた。さらに、遺伝子発現差解析においてTr. Ocy-Frと比較しCt. Ocy-Frで有意に2倍以上発現が高かった遺伝子を抽出したところ、皮質骨と海綿骨に含まれる骨細胞間において転写制御機構に違いがあるものを発見した。特にEnrichment解析にて顕著に高い生物学的プロセスである神経軸索形成に所属することも分かった。IPAを用いたUpstream regulator解析では特定のシグナル伝達機構において有意な差が認められた。

④ 3D/4D画像解析ソフトウェアIMARIS™を用いた骨細胞突起の定量化

非症候性唇顎口蓋裂患者の腸骨余剰検体の皮質骨および海綿骨を用いて4%パラホルムアルデヒドにて固定・EDTA脱灰した凍結切片を作製し、Phalloidinによって骨組織に含まれる骨細胞のF-actinを染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて骨細胞を高解像度な三次元画像として撮影し、3D/4D画像解析ソフトウェアIMARIS™を用いて骨細胞突起同士の結合数について定量化を行い、皮質骨と海綿骨で比較した。その結果、年齢を問わず、皮質骨の骨細胞で有意に細胞突起の結合数が多かった。また、海綿骨の骨細胞は細胞突起の分岐が少ない単純な形態をしていた一方で、皮質骨の骨細胞は細胞突起の分岐が多く、複雑に絡み合っていることが認められた。

⑤ 免疫蛍光染色によるタンパク質発現解析

4%パラホルムアルデヒド固定りん酸緩衝液による固定とEDTAにて脱灰したヒト腸骨組織から凍結切片を作製し、バイオインフォマティクスにて得られた特定の分子について、抗体を用いた免疫染色を行った。皮質骨の骨細胞は海綿骨の骨細胞と比較し、切片上に存在する骨細胞のうち因子X陽性骨細胞の割合が平均で約20倍以上有意に高かった。

【考察】

既知のマウスの形態的評価では、皮質骨の骨細胞の方が海綿骨の骨細胞よりも細胞小器官が乏しく、細胞体も小さいため代謝活性が低いと理解されていた（Sarah L Dallas, *Endocr Rev.*, 2013）。しかし今回のヒト骨組織を用いた皮質骨と海綿骨に含まれる主に骨細胞に焦点を当てた比較では、皮質骨の骨細胞は細胞内代謝活性が高く、さらに皮質骨に特異的な転写機構の存在が示唆された。近年に至るまで骨細胞の研究は主としてマウスなどの個体の小さなモデル動物で検討されることが多く、領域ごと（皮質骨、海綿骨）の骨細胞における遺伝子発現プロファイルは存在しなかった。本研究では、生理的なヒト骨組織に含まれる骨細胞に着目したトランスクリプトーム解析を行った結果、骨細胞の機能的多様性が存在する可能性を見出した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (西 澤 千 晶)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 田中 晋
	副 査	教授 大庭 伸介
	副 査	准教授 伊藤 祥作
	副 査	講師 村上 智彦

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨基質に含まれる骨細胞の機能的多様性を追求するために、ヒトの生理的な骨に含まれる骨細胞のトランスクリプトーム解析を試み、皮質骨および海綿骨における骨細胞の遺伝子発現変化について検討した。

その結果、骨細胞は領域ごとに多様性が存在し、皮質骨の骨細胞は海綿骨と比較して細胞内代謝活性が高いことが示唆された。

以上の結果は骨再生、骨代謝機序を明らかにする上で重要な知見であり、骨細胞研究の今後の発展に寄与するものである。よって博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。