

57. 感覚神経を介した神経系による骨代謝調節機構の解明

福田 亨

*東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 細胞生理学分野

Key words : Sema3A, 骨代謝

緒 言

骨は運動・支持器官としての強度と血中カルシウム濃度の恒常性を保つため、一生涯にわたり形成と破壊を繰り返している。骨の形成は骨芽細胞、破壊（骨吸収）は破骨細胞が担っており、形成と破壊の巧妙なバランスによって骨組織の恒常性が維持されている。近年の高齢化社会の進展に伴い、高齢者の生活の質の向上と維持の面からも骨粗鬆症に代表される運動機器疾患の制御と克服が社会的にも求められている。我が国における骨粗鬆症患者は将来的に1,300万人にも達することが予想されており、特に75歳以上の女性の2人に1人は骨粗鬆症であると言われている。また、骨粗鬆症の進行による骨折は寝たきりの原因となり、死亡率も高めることが知られている。医療経済的にも骨関連疾患分野は急速に進展している領域であることから、その効果的な治療法や治療薬の開発が強く求められている。このため、骨代謝の分子メカニズムを解明し、その成果を臨床応用することが社会的な急務となっている。

近年の分子生物学の進歩により、骨代謝研究は飛躍的に進展しており、骨代謝を担う各細胞群に対する種々のホルモンやサイトカイン類、転写因子等の重要性が明らかにされつつある。しかしながら、骨代謝調節機構には未解明な部分が多く、その全容は未だに明らかとなっていない。最近、生体の恒常性維持における液性因子や神経系を介した臓器間相互作用（臓器間ネットワーク）が注目されている。骨も例外ではなく、我々はこれまでに交感神経系や神経ペプチドが骨代謝を調節し、正常な骨量維持に重要な役割を果たすことを明らかにしている¹⁻⁶⁾。さらに最近、神経軸索ガイダンス因子である Semaphorin3A (Sema3A) を神経特異的に欠損させたマウスにおいて、骨内感覚神経形成の低下に伴う骨量低下を見出した。即ち、感覚神経系が単に感覚受容器として機能するだけでなく、新たに骨代謝調節機能も有していることを世界で初めて報告した⁷⁾。これらの一連の知見は、神経系が骨関連疾患の発症原因になりうるだけでなく、新たな治療薬や治療法の標的になる可能性を示唆している。グリア細胞は神経系を構成する神経細胞以外の細胞総称であり、神経栄養因子の合成や分泌、ミエリンの構成要素としての役割など、周辺組織の恒常性を維持に関わると考えられてきた。しかし最近では、グリア細胞にも様々な神経伝達物質の受容体が発現し、リガンド依存的にイオンを放出する現象が観察され、グリア細胞が神経系において積極的役割を果たす可能性が示唆されている。Sema3A は全身の組織においてユビキタスに発現していることから、グリア細胞由来の Sema3A が骨組織に対し何らかの作用を示す可能性が考えられた。そこで本研究では、グリア細胞が分泌する Sema3A に着目し、神経系による骨代謝調節機構の一端の解明を試みた。

方 法

グリア細胞を由来とする Sema3A の骨組織に対する機能を解明するため、Sema3A flox マウスとグリア細胞特異的に Cre を発現する GFAP (glial fibrillary acidic protein) -Cre マウスを交配し、グリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスを作製した。作製したグリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウス (12 週齢) にカルシウムキレート剤であるカルセインを注射し、血清、腰椎および下肢骨をサンプリングした。腰椎は固定、脱水後、樹脂法埋組織切片を作製し、von kossa 染色を行うと共に骨形態計測法にて骨代謝動態の解析を行った。下肢骨はマイクロ CT 撮影装置を用いて内部構造の解析を行った。さらに ELISA 法を用いて血中骨代謝マーカーを生化学的に分析した。

結果および考察

マイクロCTを用いた内部構造解析の結果、大腿骨において、骨量 (BV/TV) の有意な低下が認められた。また、骨梁幅 (Tb. Th) については変化は認められなかったものの、骨梁数 (Tb. N) の減少、および骨梁間隙 (Tb. Sp) の増加が観察された (図1)。これらの結果から、グリア細胞を由来とする Sema3A は長管骨における骨代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された。

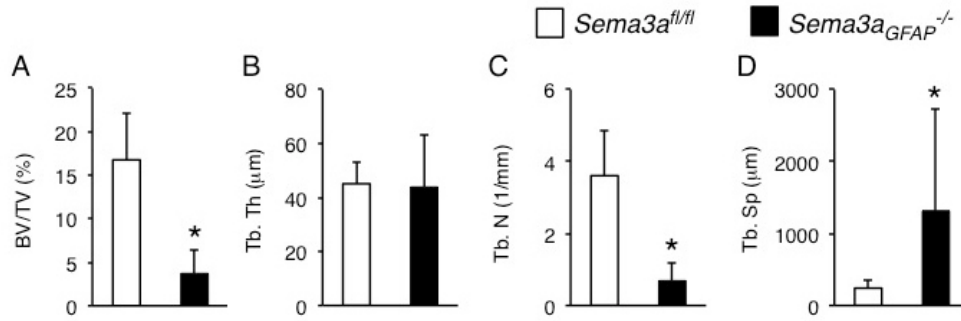


図1. グリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスにおける大腿骨のマイクロCT解析

A) 骨量、B) 骨梁幅、C) 骨梁数、D) 骨梁間隙。グリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスにおいて骨量の低下と骨梁間隙の拡大が認められた。* $P < 0.05$, Student's *t*-test.

次に、Sema3A の骨代謝に対する作用を詳細に解析するため、グリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスの腰椎を用い、組織学的および骨形態計測解析を行った。その結果、腰椎においても大腿骨と同様の骨量の低下が観察された (図2)。骨形態計測解析では骨形成速度 (BFR) やミネラル沈着速度 (MAR) および骨芽細胞数 (Ob.S/BS) に変化は認められなかったものの、破骨細胞数 (No.Oc./B. Pm) の有意な上昇が認められた (図2)。これらの結果からグリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスで観察された骨量減少は破骨細胞が増加したことによる骨吸収の亢進が原因である可能性が考えられた。

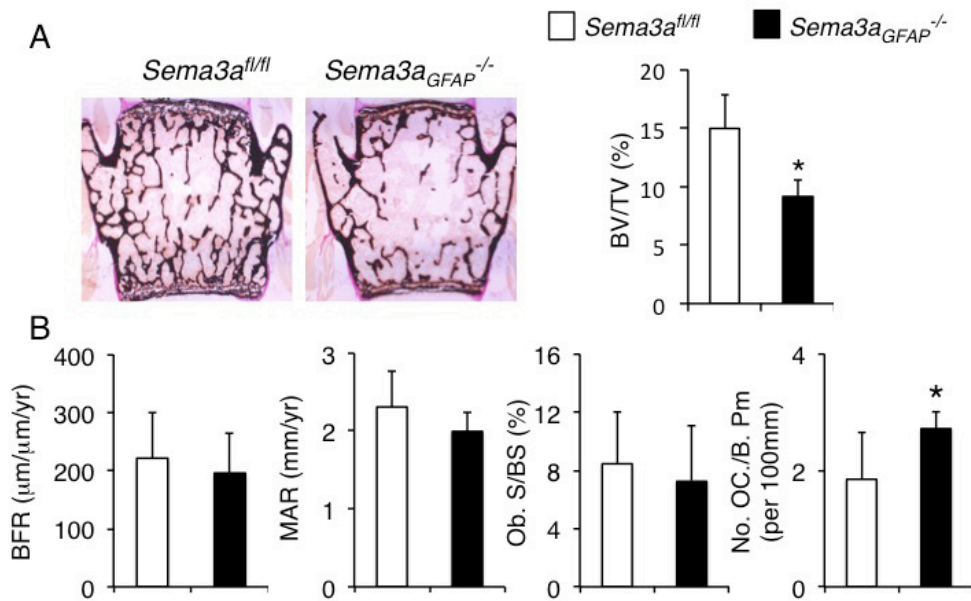


図2. グリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスの腰椎を用いた骨形態計測解析

A) von kossa 染色、B) 骨形態計測。グリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスにおいて骨量の低下および破骨細胞数の減少が認められた。* $P < 0.05$, Student's *t*-test.

そこで、この骨吸収の亢進を生化学的に確認するため、血清中の骨吸収マーカーである TRAP5b（酒石抵抗性フォスファターゼ 5b）の測定を行った。その結果、グリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスでは血清中の TRAP5b の濃度に変化は認められなかった（図3）。また、血中カルシウムおよびリン濃度の測定も行ったが、こちらのいずれも変化は認められなかった。

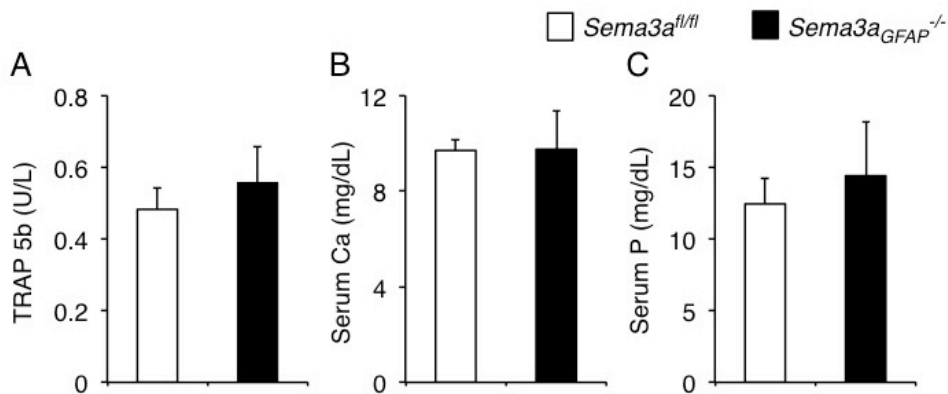


図3. グリア細胞特異的 Sema3A 欠損マウスの血清を用いた生化学的解析

A) 血清中 TRAP 5b 濃度、B) 血清中 Ca 濃度、C) 血清中 P 濃度。各マーカーの値に変化は認められなかった。

以上の結果より、グリア細胞を由来とする Sema3A も骨代謝を調節していることが明らかになった。しかし、骨形態計測の結果からこの制御は破骨細胞を介する可能性が示唆されているが、明確な証明には至っていない。今後は欠損マウス由来骨髄細胞を用いた初代破骨細胞培養系での検討を行うと共に、骨組織内への神経投射についても組織免疫化学的な解析を行い、骨量減少メカニズムを明らかにする予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は東京医科歯科大学細胞生理学分野の竹田秀、佐藤信吾、越智広樹、砂村聡子、片桐邦子および海野愛子である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. *Cell*. 2000 Jan 21;100(2):197-207. PMID: 10660043
- 2) Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):305-17. PMID: 12419242
- 3) Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G. *Nature*. 2005 Mar 24;434(7032):514-20. Epub 2005 Feb 20. PMID: 15724149
- 4) Sympathetic control of bone mass regulated by osteopontin. Nagao M, Feinstein TN, Ezura Y, Hayata T, Notomi T, Saita Y, Hanyu R, Hemmi H, Izu Y, Takeda S, Wang K, Rittling S, Nakamoto T, Kaneko K, Kurosawa H, Karsenty G, Denhardt DT, Vilaradaga JP, Noda M. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 25;108(43):17767-72. doi: 10.1073/pnas.1109402108. Epub 2011 Oct 11. PMID: 21990347
- 5) Anabolic action of parathyroid hormone regulated by the β 2-adrenergic receptor. Hanyu R, Wehbi VL, Hayata T, Moriya S, Feinstein TN, Ezura Y, Nagao M, Saita Y, Hemmi H, Notomi T, Nakamoto T, Schipani E, Takeda S, Kaneko K, Kurosawa H, Karsenty G, Kronenberg HM, Vilaradaga JP, Noda M. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 8;109(19):7433-8. doi: 10.1073/pnas.1109036109. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22538810
- 6) Central control of bone remodeling by neuromedin U. Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, Kato S, Kangawa K, Kojima M, Shinomiya K, Takeda S. *Nat Med*. 2007 Oct;13(10):1234-40. Epub 2007 Sep 16. PMID: 17873881
- 7) Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations. Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, Shibata S, Yoshida Y, Gu Z, Kimura A, Ma C, Xu C, Bando W, Fujita K, Shinomiya K, Hirai T, Asou Y, Enomoto M, Okano H, Okawa A, Itoh H. *Nature*. 2013 May 23;497(7450):490-3. doi: 10.1038/nature12115. Epub 2013 May 5. Erratum in: *Nature*. 2013 Aug 29;500(7464):612. PMID: 23644455