

# 学位論文

表題：骨細胞 Sclerostin の脱負荷に伴う分布域変化の解析

所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

歯科矯正学分野

投稿者：大住 隆太

原稿総紙数： 28 枚(本文, 図の説明, 表題脚注, 文献)

図： 4 枚 (図 1, 2, 3, 4)

写真： 3 枚 (図 2, 3, 4)

表： 0 枚

電子媒体： CD-R (1 枚)

別刷数： 50 部

連絡先：大住 隆太 (PHS: 8642)

メールアドレス：de20008@s.okayama-u.ac.jp

(勤務先) 〒700-8525

岡山市北区鹿田町 2-5-1

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

歯科矯正学分野 (内線 6691)

骨細胞 Sclerostin の脱負荷に伴う分布域変化の解析

大住 隆太

## 緒言

寝たきりや宇宙生活に伴う機械的負荷の低下は骨量の減少を引き起こすことが知られている<sup>1)-3)</sup>。機械的負荷は骨量をコントロールする決定的なファクターの一つであり、骨細胞が機械的負荷の感受において重要な役割を果たしている可能性が示唆されてきた<sup>3)</sup>。骨細胞は、骨芽細胞に由来し、骨系の細胞の 90-95%

を占める<sup>4)</sup>。骨細胞は神経細胞様の多くの細長い細胞突起を介して、隣接する骨細胞同士、骨表面に存在する破骨細胞や骨芽細胞とも密接に接触しており、この三次元的な細胞間ネットワークはコネキシンと呼ばれる膜貫通型タンパク質により構成されるギャップジャンクションを介して形成される<sup>5), 6)</sup>。骨細胞が機械的負荷を感受するという可能性が示唆されてきたのは、局在や細胞形態および骨細胞固有の複雑なネットワークを背景としている<sup>7)-9)</sup>。

骨量の減少を誘導する因子の一つとして、骨細胞特異的に分泌される Sclerostin (以下 Scl) があり、骨の代謝調節において重要な役割を果たしている<sup>10)</sup>。Scl は *SOST* 遺伝子によってコードされており、Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5、LRP 6 及び Frizzled 受容体を介する古典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 経路を阻害する<sup>10), 11)</sup>。骨芽細胞の分化誘導には古典的 Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が必要であり、Scl はこの経路を抑制することで骨の形成を阻害する<sup>12)-18)</sup>。*SOST* ノックアウトマウスでは、骨形成抑制因子である Scl が産生されないため、ヒトの Sclerostosis (硬結性骨化症) や Van Bechem 病にみられるような過度な骨形成や骨密度増加が認められる<sup>19)-23)</sup>。また、Scl は骨の機械的負荷に対する応答において中心的な役割を担っており、Scl は脱負荷により産生量が増加し、機械的負荷が加わると産生量が低下する<sup>14), 18), 24)-26)</sup>。また、脱負荷下では、Scl が広範囲に分布し、負荷下では分布が狭い範囲に限局することが報告されており<sup>14)</sup>、Scl は発現のみならずその分布が骨量に影響すると考えられる<sup>15)</sup>。しかしながら、機械的負荷・脱負荷に伴う Scl の分布変化に関して細胞組織学的手法を用いた詳細な解析は極めて少ない。

Scl は主に成熟骨細胞で産生されることが報告されている<sup>27), 28)</sup>。骨細胞は成熟に伴い、細胞質および細胞内小器官が乏しくなるため<sup>29)</sup>、骨細胞による Scl の産生量の変化のみが、その分布域を劇的に変化させる可能性は少ない。そこで、我々は、機械的負荷・脱負荷が、Scl の分布変化に大きな影響を与えると考えた。機械的負荷下では骨組織が圧力を受け変形し、骨小腔や骨細管内の液体流動が生じ、産生された Scl が骨細管外へと押し出される。一方で、脱負荷下では、液体流動が乏しいため、産生された Scl が骨小腔や骨細管内に貯留するという仮説を立てた。その仮説の検証のためには、骨細胞内、骨小腔内及び骨細管内の Scl の分布を詳細に観察する必要がある。本研究では、ラットの下肢神経切断モデルを用いて、大腿骨で機械的負荷・脱負荷の条件を付与した。この条件下で Scl の分布が顕著に変化する領域を蛍光免疫染色法により同定した。さらに、この領域における骨細胞内、骨小腔内、骨細管内の Scl の分布の変化を免疫電顕法により解析し、機械的負荷・脱負荷による Scl の分布変化について詳細な細胞組織学的解析を行った。

## 材料ならびに方法

### 1. 実験動物

岡山大学動物実験委員会の承認（OKU-2016367）のもと、すべての動物実験を行った。実験には、12週齢の雄性SDラット10匹（日本クレア、静岡、日本）を用いた。実験の間、室温を21~24℃に保ち、飼料と水道水を自由に摂取できる状態にした。

### 2. 下肢不動化モデルの作製方法

3~4%イソフルラン（Mylan, Canonsburg, Pennsylvania, 米国）吸入麻酔下で、右側大腿部に約2cmの切開を加えた後、筋膜を切開し、坐骨神経を剖出した。坐骨神経は神経断端部の癒着を防ぐため切断ではなく約5.0mm区域切除を行った。加えて、右側鼠径部に約2cmの切開を加え、大腿神経を剖出し、約5.0mm区域切除を行った。左側大腿部は坐骨神経、大腿神経の剖出のみのシャム手術を施した。

### 3. 試料作製

右側の坐骨神経と大腿神経を区域切除後、7日目に4%パラホルムアルデヒド固定液（PFA）を用いて灌流固定を行い、神経切断側の右側大腿骨（以下Cut側）、シャム手術を施した左側大腿骨（以下Control側）を採取し、4%PFAにて4℃下で12時間の後固定を行った。その後、大腿骨を約17%エチレンジアミン四酢酸（EDTA）溶液（OSTEOSOFT, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, 米国）にて28日間4℃下で脱灰を行った。蛍光免疫染色に用いる脱灰組織は、上昇エタノール系列及びキシレンによる脱水処理、パラフィン（Paraplast Plus: Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, 米国）による包埋を施し、7µm厚の冠状断の連続切片を作製した。免疫電顕法に用いる脱灰組織は、上昇エタノール系列による脱水後、LR-White（London Resin Company Limited, London, 英国）にて包埋し、90nm厚の切片を作製した。

### 4. pQCT法（peripheral Quantitative Computed Tomography）による大腿骨骨量の解析

後固定後の非脱灰大腿骨のCut側、Control側の骨幹部（骨長の約1/2の部位）及び遠位骨幹部（遠位成長板軟骨から約3.0mmの部位）を動物研究用pQCT骨密度測定装置（XCT Research SA+, Stratec Medizintechnik GmbH, フォルツハイム, ドイツ）を用いて骨量を測定した。測定条件は、スライス厚0.46mm、ボクセルサイズ0.12mmとした。解析には、XCT 6.20 Software

(Stratec Medizintechnik GmbH)を使用した。骨の輪郭の検出には、自動検出の解析モードを使用した（解析に用いたソフトウェアのContour mode 2）。海綿骨領域は、相対的に低い密度を有する全断面積の35%の領域として解析し（解析に用いたソフトウェアのPeel mode 20）、皮質骨は、 $690 \text{ mg/cm}^3$ 以上の密度を有する領域と定義した（解析に用いたソフトウェアのCortical mode 1）。

## 5. 蛍光免疫組織染色

大腿骨骨幹部を摘出し、パラフィン包埋を行い、冠状断切片を作製した。ブロッキングワシ Histo（ナカライテスク、京都、日本）によるブロッキング処理を行い、1%ウシ血清アルブミン（以下BSA）を含有する $0.01 \text{ mol/l}$ リン酸緩衝生理食塩水（以下PBS）で1:200に希釈したヤギ抗マウスSc1抗体（AF1589, R&D systems, Minneapolis, Minnesota, 米国）を用いて $4^\circ\text{C}$ で12時間反応させた。2次抗体には、1%BSAを含有するPBSで1:200に希釈したAlexa Fluor488標識ウサギ抗ヤギIgG抗体（Molecular Probes, Eugene, Oregon, 米国）を用い、室温で1時間反応させた。蒸留水で1:1000に希釈した4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI, Sigma Aldrich, 米国）を用いて核染色を行った<sup>10), 30)</sup>。観察は、共焦点レーザー顕微鏡（対物レンズ：20倍、63倍, LSM 780, CarlZeiss, オーバーコッペン, ドイツ）を用いて行い、タイリング画像を作製した。得られた画像を、ZEISS Efficient Navigation（CarlZeiss, オーバーコッペン）を用いて解析し、IMARIS（Bitplane, チューリッヒ, スイス）を用いて3次元画像構築を行った<sup>15), 31)</sup>。

## 6. 免疫電顕法による観察

$0.05 \text{ M}$  グルタルアルデヒド含有 $6 \text{ M}$  尿素溶液にて10分間エッチングを行い洗浄後、1%BSAを含有する10%ウサギ血清にてブロッキング処理を15分間行った。抗体として、1次抗体は1%BSAを含有するPBSで1:100に希釈したヤギ抗マウスSc1抗体（AF1589, R&D systems, Minneapolis, Minnesota）を用いて $4^\circ\text{C}$ で12時間反応させた。2次抗体には、1%BSAを含有するPBSで1:50に希釈した10 nm 径金コロイド標識ウサギ抗ヤギIgG抗体（EMRAG10, BBI Solutions, Crumlin, 英国）を用い、室温で2時間反応させた。PBSにて洗浄後に1%グルタルアルデヒドを用いて5分間の後固定を行った。電子染色には、50%メタノール溶液に溶解した2%酢酸ウラン溶液及びクエン酸鉛液を使用した。観察は、透過型電子顕微鏡（H-7650, 日立ハイテクノロジーズ, 東京, 日本）を用いた。骨細胞内、骨小腔内、骨細管内に存在するSc1を標識した金コロイドの数をカウントし、金コロイドの単位面積当たりの密度（金コロイドの個数/ $\mu\text{m}^2$ ）を定量し、Cut側、Control側で評価した。骨細胞、骨小

腔、骨細管の面積の計測には Image J software (US National Institute of Health, Bethesda, Maryland, 米国) を使用した。

## 7. 統計解析

得られた定量結果の 2 群間比較については、Student's *t*-test を用いた。多群間比較には二元配置分散分析を用いた。なお、*p* 値 0.05 以下を統計的有意差があると判断した。

### 結果

#### 1. 大腿骨骨量の解析

遠位骨幹端部において、Cut 側では Control 側と比較して全骨密度、皮質骨および海綿骨の骨密度の減少が有意に認められた (図 1A)。骨幹部においては、全骨密度、皮質骨密度に有意な差が認められなかった (図 1B)。

#### 2. 蛍光免疫組織染色の解析

Sc1 抗体を用いて大腿骨骨幹部の蛍光免疫染色を行い (図 2A)、得られた蛍光輝度のデータをもとに Sc1 の分布解析を行った。観察部位は、前方部、後方部、外側部、内側部の 4 領域とした (図 2A)。蛍光輝度による定量方法の概略図を図 2B に示す。4 領域にて皮質骨の骨髄側から骨膜側にかけて幅 400  $\mu\text{m}$  の区域を対象に蛍光輝度の計測を行った。輝度値の平均値を定量し、プロファイルを作成した (図 2Ba)。プロファイルは empirical mode decomposition (EMD) にて極大値が一つのグラフに変換し、極大値を示す領域 (蛍光輝度の大きさがピークに達する領域) が皮質骨の中央部から離れている程度を示す指標を離心率と定義した (図 2Bb)。Control 側、Cut 側の 4 領域で離心率を指標にして Sc1 の分布を評価した。Control 側の外側部領域の Sc1 の分布の離心率が他の領域と比較して有意に骨髄側へ偏位していた (図 2C)。Cut 側では、それぞれの領域間に Sc1 の分布の離心率に有意な偏位は認められなかった (図 2C)。

次に、外側部領域に着目し、骨髄側から骨膜側までを 4 等分し、I、II、III、IV の 4 領域を定義した (図 3A, B)。これらの 4 領域における全骨細胞 (DAPI で核が染色された細胞) に対する Sc1 陽性骨細胞の割合を定量した (図 3C)。その結果、最も骨膜側に近接する領域において、Control 側で Cut 側と比較して Sc1 陽性骨細胞の割合が有意に減少していた (図 3C)。さらに、外側部の骨膜側領域の 3 次元構築画像から、Cut 側では Control 側と比較して Sc1 が広範囲に分布していることが分かった (図 3D)。

#### 3. 免疫電顕法による解析

Sc1 の組織内分布をより詳細に解析するため、金コロイド標識した Sc1 抗体を用いて免疫電顕を行った (図 4 A)。皮質骨外側部の骨膜側領域で骨細胞、骨小腔、骨細管内の Sc1 の分布密度の計測と定量を行った (図 4 B)。その結果、Cut 側では Control 側よりも骨細管内の Sc1 の分布密度が有意に高かった (図 4 B)。次に、Control 側と Cut 側のそれぞれの群の中での Sc1 分布について検討した (図 4 B)。Control 側では、骨細管内の Sc1 の密度が骨小腔内のものより有意に高かったが、骨細胞内と骨小腔内および骨細胞内と骨細管内の間には、Sc1 の分布密度に有意な差はなかった (図 4 C)。Cut 側では、骨細管内の Sc1 の密度が骨細胞内、骨小腔内の両方のものに対して有意に高かった。骨細胞内と骨小腔内の Sc1 の分布密度には有意差がなかった。

### 考察

本研究では、機械的負荷・脱負荷に伴う骨組織の Sc1 の分布変化について細胞組織学的に解析することを目的とした。骨細胞単位の微小領域の Sc1 の分布変化を解析するためには、骨細胞内、骨小腔内、骨細管内の Sc1 を免疫電顕法により観察する必要がある。しかしながら、電子顕微鏡で観察できる範囲は非常に小さく限られるため、機械的負荷・脱負荷に伴う Sc1 の分布変化が顕著に認められる領域を特定する必要がある。そこで、まず、脱負荷による骨量減少モデルを作製し、抗 Sc1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った骨組織を共焦点レーザー顕微鏡にて広範囲に解析し、機械的負荷・脱負荷に伴い Sc1 の分布の変化が生じやすい領域を決定後、その領域における骨細胞と周辺組織を免疫電顕法にて観察し、骨細胞内、骨小腔内、骨細管内の Sc1 の分布を定量した。

不動化による骨量減少モデルとしては、ラットやマウスの尾部懸垂モデルや坐骨神経等の下肢神経の切断モデルが使用されてきた<sup>14), 17), 24)</sup>。本研究では、同一個体で機械的負荷及び脱負荷下の骨組織の評価を行うことが可能な下肢神経切断モデルを用いて解析した。pQCT による大腿骨骨密度の解析から、大腿骨遠位骨幹端部において脱負荷下である Cut 側の皮質骨および海綿骨密度の有意な減少を認めた (図 1 A, B)。これまで、大腿骨では成長板軟骨に近接する海綿骨が脱負荷により減少しやすいことが報告されている<sup>32)</sup>。この報告と一致して、本実験で用いた下肢神経切断モデルの遠位骨幹端部の海綿骨量は Cut 側において減少しており、実験モデルとしての妥当性が証明された。

次に、蛍光免疫染色法を用いて骨組織での Sc1 の分布について解析を行った。観察部位は、応力の分布が生じやすい骨幹部を選択した<sup>14)</sup>。Control 側は、皮質骨外側部における Sc1 の分布がピークに達する領域が骨髄側へ偏位し、Cut 側では皮質骨中央部に近接することが分かった (図 2 C)。そこで、外

側部領域の Sc1 の分布を詳細に観察するため、骨髄側から骨膜側までの領域を 4 等分し、領域毎の Sc1 陽性骨細胞の割合を定量することとした (図 3 A)。Cut 側は Control 側と比較して Sc1 陽性骨細胞の割合が高いという結果が得られた (図 3 C)。以上の結果から、外側部の 4 領域の中でも骨膜側の領域が脱負荷の影響により Sc1 の分布が大きく変化し、Sc1 陽性骨細胞が増加する領域であることが示唆された。そこで、外側部骨膜側領域の骨細胞の Sc1 の分布をより詳細に評価するために、三次元画像を構築した。三次元画像から、Cut 側の骨細胞では Sc1 が広範囲に分布しているのに対して、Control 側では Sc1 の分布が狭い範囲に局限していることを確認した (図 3 D)。以上の蛍光免疫染色法による解析結果から、外側部骨膜側領域が機械的負荷・脱負荷により、Sc1 の分布変化が顕著に認められる領域であることが分かった。

次に、外側部骨膜側領域の骨細胞内、骨小腔内、骨細管内の Sc1 の分布密度を詳細に調べるため、免疫電顕法による解析を行った。Sc1 の局在を示す金コロイドの単位面積当たりの密度を測定したところ、骨細胞内、骨小腔内の Sc1 の分布密度には、両群間で有意差が認められなかった (図 4 B 左および中央)。一方、骨細管内の Sc1 の分布密度は、Control 側と比べて Cut 側で有意に高いことが分かった (図 4 B 右)。次に、Control 側と Cut 側のそれぞれの群において、骨細胞内、骨小腔内、骨細管内の Sc1 の分布密度を比較した場合は、Control 側では骨細管内の Sc1 の分布密度は、骨小腔内のものとの比較では有意に高かったが、骨細胞内の分布密度との間に有意差は認められなかった (図 4 C 左)。一方、Cut 側の骨細管内における Sc1 分布密度は、骨細胞内および骨小腔内の両領域の分布密度に対して有意に高かった。これらの結果から、脱負荷状態にある Cut 側の骨細胞では Control 側に比べ、Sc1 が骨細管領域により広範囲に分布していることが分かった。今回の実験で対象とした領域では、Control 側と Cut 側の Sc1 全体量に有意差が認められなかったことから、機械的刺激に伴う骨細胞の Sc1 産生量の変化が分布の変化に与える影響が小さい可能性が示唆された。

骨小腔内及び骨細管内には液体が存在しており、その溶質の輸送は拡散あるいは液体の流動によって生じることが報告されている<sup>33)</sup>。拡散は濃度勾配に依存するが、流動は細胞周囲の空間を液体が移動するために生じる。Piekarski と Munro らの報告より、流体は非圧縮性であるため機械的負荷下の骨の変形は骨小腔、骨細管内の液体の流動を引き起こす (水を含んだスポンジを握ると水が溢れ出すように) ことが示されている<sup>34)</sup>。そのような、液体の流動を引き起こす機械的負荷は、筋活動や身体活動による反作用である<sup>34), 35)</sup>。これまでに、異なる大きさの分子量の溶質を用い、骨小腔や骨細管での輸送に関する研究がなされており、溶質の分子の大きさが輸送に大きく関係することが示され

てきた<sup>36)-39)</sup>。グルコース、ATPなどの1 kDa以下の小さな溶質は、流体内での拡散によって容易に移動するが、副甲状腺ホルモン(9.5 kDa)、Sc1(24 kDa)およびRANKL(35 kDa)のような大きな分子のホルモンおよびサイトカインは、液体の流動による輸送を必要とする可能性が報告されている<sup>36), 37), 40)-42)</sup>。以上の報告、本実験で得られた結果から、脱負荷下のCut側では産生されたSc1は骨細管内に貯留し、一方、Control側では負荷が加わり骨細管内のSc1が骨細管外へ液体の流動により輸送されて消失しているという可能性が示唆された。骨小腔内よりも骨細管内でControl側とCut側間のSc1の密度の差が大きいのは、骨小腔内と比較して骨細管内の方が機械的負荷に伴う液体の流動の影響を受けやすい可能性が考えられる。

骨細胞の*SOST*発現及びSc1産生を抑制することが、副甲状腺ホルモン(PTH)が骨形成促進作用(アナボリック作用)を発揮する機序の一つであることが、注目されており<sup>30), 43), 44)</sup>、機械的負荷がPTHのアナボリック作用を増強させる可能性を示唆している報告もある<sup>44)</sup>。故に、PTHのアナボリック作用と機械的負荷によるSc1の分布変化の有無についても、今後の興味深い検討事項であると考えられる。また、Sc1は骨量の重要な決定因子であり、近年骨粗鬆症の治療における標的分子としても注目されており<sup>46)-50)</sup>、抗Sc1抗体は骨粗鬆症の新しい治療薬として、第Ⅲ相臨床試験が行われている<sup>49), 50)</sup>。今回、機械的負荷・脱負荷に伴うSc1の分布変化の新たな知見を得ることができた。今後はそのメカニズムを調べ、寝たきりや宇宙空間滞在に伴う骨量の減少に対するSc1の分布変化を標的とした新たな診断・治療法の発展につながることを期待される。

## 結論

機械的負荷・脱負荷に伴う骨細胞のSc1の分布の変化を蛍光免疫および免疫電顕法により解析することができた。脱負荷下では、Sc1は骨細管領域に分布する傾向が高く、負荷下では骨細管領域の分布密度が減少することが明らかとなった。これらの所見は、脱負荷による骨量減少には、Sc1の発現量の変化とともに骨細管内の液体流動によるSc1の分布域の変化が関与する可能性が示している。本研究は、機械的負荷・脱負荷がSc1の分布に大きな影響を与えることを示唆しており、今後、そのメカニズムについて詳細に検討を行っていく予定である。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導、御校閲を賜りました岡山大学大学院医



歯薬学総合研究科歯科矯正学分野上岡寛教授に心より感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、御指導、御協力をいただきました愛媛大学プロテオサイエンスセンター（バイオイメーjing部門）飯村忠浩教授に謹んで感謝の意を表します。最後に本研究を行うにあたり、御援助と御協力をいただきました岡山大学医学部共同実験施設古谷満寿美様、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

#### 表題脚注

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 77 回日本矯正歯科学会学術大会（2018 年 11 月、横浜）

#### 図の説明

図 1 機械的負荷・脱負荷による大腿骨骨密度の変化

A. pQCT 法により測定した遠位骨幹端部における全骨密度、皮質骨密度および海綿骨密度を示す。平均値±標準偏差、n=5、※ $p < 0.05$ 、Student' s t-test

B. pQCT 法により測定した骨幹部における全骨密度、皮質骨密度および海綿骨密度を示す。平均値±標準偏差、n=5、Student' s t-test

図 2 機械的負荷・脱負荷による Sc1 分布の解析（蛍光免疫染色）

A. 抗 Sc1 抗体を用いて大腿骨骨幹部冠状断切片の蛍光免疫染色を行った（タイリング画像）。前方部、後方部、外側部、内側部の 4 領域に分けて評価を行った（黄色破線で示す）。黄色矢印は、蛍光輝度の計測を行った方向を示している。図中の★は骨髄を示しており、バックグラウンド染色が認められる。

緑：Sc1；スケールバー：1.0 mm

B. Control 側の外側部を例にした蛍光輝度の解析方法の概略を示す。

a. 皮質骨の骨髄側から骨膜側にかけて幅 400  $\mu\text{m}$  の領域で Sc1 の蛍光輝度を計測し、グラフ化した。グラフ縦軸は蛍光輝度の強さを示し、横軸は皮質骨の骨髄側からの距離を示しており、横軸の 0 は皮質骨の骨髄側との境界を示している。

b. 蛍光輝度のグラフを極大値が一つのグラフへ変換した。皮質骨中央部領域（一点鎖線）から Sc1 の分布がピークに達する極大値の領域（破線）までの距離を計測した。その距離を、骨髄側から骨膜側までの距離で割った値を離心率と定義した。離心率を指標として、皮質骨の中央部から Sc1 の分布のピークを評価した。

C. Control 側及び Cut 側で、前方部、後方部、外側部、内側部の領域の離心率を定量し、領域間で比較した結果を示す。平均値±標準偏差、n=4、※ $p < 0.05$ 、二元配置分散分析法

### 図 3 大腿骨外側部領域での Scl 陽性骨細胞の解析

A. 大腿骨外側部領域の蛍光免疫組織染色のタイリング画像。破線は皮質骨の骨髓腔との境界、一点鎖線は皮質骨の骨膜側を示す。皮質骨の骨膜側から骨髓側の領域を骨髓側から順に I、II、III、IV の 4 領域に分けた。緑：Scl、青：核。スケールバー：100  $\mu\text{m}$

B. I、II、III、IV の 4 領域の拡大像を示す。緑：Scl、青：核。スケールバー：20  $\mu\text{m}$

C. 全骨細胞（DAPI で核が染色された細胞）に対する Scl 陽性骨細胞の割合を I、II、III、IV の各領域で解析。Control 側、Cut 側で比較した結果を示す。平均値±標準偏差、n=4、※ $p < 0.05$ 、Student's t-test

D. 外側部領域の骨膜に近接する領域の 3 次元構築画像を示す。緑：Scl、青：核、スケールバー：10  $\mu\text{m}$

### 図 4 免疫電顕法による解析

A. 外側部骨膜側領域において、Scl 抗体を 10 nm 径の金コロイドで標識し、透過型電子顕微鏡で観察し、定量を行った。

a, b. 透過型電子顕微鏡像を示す。一点鎖線は、骨細胞と骨小腔の境界を示し、破線は、骨小腔と骨基質との境界を示し、二点鎖線は骨細管と骨基質との境界を示す。スケールバー：3  $\mu\text{m}$

c~f. 白枠の拡大像を示す。矢印は金コロイドを示す。スケールバー：300 nm

B. 確認された Scl を標識した金コロイドの単位面積当たりの密度（金コロイドの個数/ $\mu\text{m}^2$ ）を骨細胞内、骨小腔内、骨細管内の 3 領域で定量。Control 側、Cut 側間で比較した結果。平均値±標準偏差、n=13、※ $p < 0.05$ 、Student's t-test

C. 測定した金コロイドの単位面積当たりの密度（金コロイドの個数/ $\mu\text{m}^2$ ）を Control 側、Cut 側にて骨細胞内、骨小腔内、骨細管内の 3 領域間で比較した結果を示す。平均値±標準偏差、n=13、※ $p < 0.05$ 、※※ $p < 0.01$  二元配置分散分析法

### 参考文献

1. Bonewald, L. F., Johnson, M. L.: Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling.

- Bone.*, 42 (4), 606–615, 2008.
2. Lin, C., Xuan, J., Zhongquan, D., Xizhi, G., Tujun, W., Jun, W., Yinghui, L., Guoyin, F., Xiang, G., Lin, He.: Sclerostin Mediates Bone Response to Mechanical Unloading Through Antagonizing Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *J Bone Miner Res.*, 24 (10), 1651–1661, 2009.
  3. Keune, J.A., Branscum, A.J., Iwaniec, U.T., Turner, R.T.: Effects of Spaceflight on Bone Microarchitecture in the Axial and Appendicular Skeleton in Growing Ovariectomized Rats. *Sci Rep.*, 22 (5), 18671, 2015.
  4. Schaffler, M.B., Cheung, W.Y., Majeska, R., Kennedy, O.: Osteocytes: Master Orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int.*, 94 (1), 5–24, 2014.
  5. Kamioka, H., Honjo, T., Takano-Yamamoto, T.: A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone.*, 28 (2), 145–149, 2001.
  6. Ishihara, Y., Kamioka, H., Honjo, T., Ueda, H., Takano-Yamamoto, T., Yamashiro, T.: Hormonal, pH, and calcium regulation of connexin 43-mediated dye transfer in osteocytes in chick calvaria. *J Bone Miner Res.*, 23 (3), 350–360, 2008.
  7. Feng, J.Q., Ward, L.M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., Yu, X., Rauch, F., Davis, S.I., Zhang, S., Rios, H., Drezner, M.K., Quarles, L.D., Bonewald, L.F., White, K.E.: Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet.*, 38 (11), 1310–1315, 2006.
  8. Bonewald, L.F.: The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.*, 26 (2), 229–238, 2011.
  9. Sugawara, Y., Kamioka, H., Ishihara, Y., Naoko, F., Kawanabe, N., Yamashiro, T.: The early mouse 3D osteocyte network in the presence and absence of mechanical loading. *Bone.*, 52 (1), 189–196, 2013.
  10. Odagaki, N., Ishihara, Y., Wang, Z., Ei Hsu Hlaing E., Nakamura, M., Hoshijima, M., Hayano, S., Kawanabe, N., Kamioka, H.: Role of Osteocyte-PDL Crosstalk in Tooth Movement via SOST/Sclerostin. *J Dent Res.*, 97 (12): 1374–1382, 2018.
  11. Delgado-Calle, J., Sato, A.Y., Bellido, T.: Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone.*, 96, 29–37, 2017.
  12. Kramer, I., Halleux, C., Keller, H., Pegurri, M., Gooi, J.H., Weber, P.B., Feng, J.Q., Bonewald, L.F., Kneissel, M.: Osteocyte Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol.*, 30 (12), 3071–3085, 2010.
  13. Kennedy, O.D., Herman, B.C., Laudier, D.M., Majeska, R.J., Sun, H.B., Schaffler, M.B.: Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone.*, 50

- (5), 1115-1122, 2012.
14. Moustafa, A., Sugiyama, T., Prasad, J., Zaman, G., Gross, T.S., Lanyon, L.E., Price, J.S.: Mechanical loading-related changes in osteocyte sclerostin expression in mice are more closely associated with the subsequent osteogenic response than the peak strains engendered. *Osteoporos Int.*, 23 (4), 1225-1234, 2012.
  15. Watanabe, T., Tamamura, Y., Hoshino, A., Makino, Y., Kamioka, H., Amagasa, T., Yamaguchi, A., Iimura, T.: Increasing participation of sclerostin in postnatal bone development, revealed by three-dimensional immunofluorescence morphometry. *Bone.*, 51 (3), 447-458, 2012.
  16. Yavropoulou, M.P., Xygonakis, C., Lolou, M., Karadimou, F., Yovos, J.G.: The sclerostin story: From human genetics to the development of novel anabolic treatment for osteoporosis. *Hormones (Athens).*, 13 (4), 323-337, 2014.
  17. Lv, J., Sun, X., Ma, J., Ma, X., Xing, G., Wang, Y., Sun, L., Wang, J., Li, F., Li, Y.: Involvement of periostin-sclerostin-Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the prevention of neurectomy-induced bone loss by naringin. *Biochem Biophys Res Commun.*, 468 (4), 587-593, 2015.
  18. Spatz, J.M., Wein, M.N., Gooi, J.H., Qu, Y., Garr, J.L., Liu, S., Barry, K.J., Uda, Y., Lai, F., Dedic, C., Balcells-Camps, M., Kronenberg, H.M., Babij, P., Pajevic, P.D.: The Wnt Inhibitor Sclerostin Is Up-regulated by Mechanical Unloading in Osteocytes in Vitro. *J Biol Chem.*, 290 (27), 16744-16758, 2015.
  19. Brunkow, M.E., Gardner, J.C., Van Ness, J., Paeper, B.W., Kovacevich, B.R., Proll, S., Skonier, J.E., Zhao, L., Sabo, P.J., Fu, Y., Alisch, R.S., Gillett, L., Colbert, T., Tacconi, P., Galas, D., Hamersma, H., Beighton, P., Mulligan, J.: Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet.*, 68 (3), 577-589, 2001.
  20. Balemans, W., Patel, N., Ebeling, M., Van Hul, E., Wuyts, W., Lacza, C., Dioszegi, M., Dikkers, F.G., Hilderling, P., Willems, P.J., Verheij, J.B., Lindpaintner, K., Vickery, B., Foerzler, D., Van Hul, W.: Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet.*, 39 (2), 91-97, 2002.
  21. Staehling-Hampton, K., Proll, S., Paeper, B.W., Zhao, L., Charmley, P., Brown, A., Gardner, J.C., Galas, D., Schatzman, R.C., Beighton, P., Papapoulos, S., Hamersma, H., Brunkow, M.E.: A 52-kb deletion in the SOST-MEOX1 intergenic region on 17q12-q21 is associated with van Buchem disease in the Dutch population. *Am J Med Genet.*, 110 (2), 144-152.2002.
  22. van Bezooijen, R.L., Roelen, B.A., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt,

- E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., ten Dijke, P., Lowik, C.W.: Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med.*, 15,199 (6), 805-814, 2004.
23. Li, X., Ominsky, M.S., Niu, Q.T., Sun, N., Daugherty, B., D'Agostin, D., Kurahara, C., Gao, Y., Cao, J., Gong, J., Asuncion, F., Barrero, M., Warmington, K., Dwyer, D., Stolina, M., Morony, S., Sarosi, I., Kostenuik, P.J., Lacey, D.L., Simonet, W.S., Ke, H.Z., Paszty, C.: Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res.*, 23 (6), 860-869, 2008.
24. Robling, A.G., Niziolek, P.J., Baldrige, L.A., Condon, K.W., Allen, M.R., Alam, I., Mantila, S.M., Gluhak-Heinrich, J., Bellido, T.M., Harris, S.E., Turner, C.H.: Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.*, 283 (9), 5866-5875, 2008.
25. Tu, X., Rhee, Y., Condon, K.W., Bivi, N., Allen, M.R., Dwyer, D., Stolina, M., Turner, C.H., Robling, A.G., Plotkin, L.I., Bellido, T.: Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone.*, 50 (1), 209-217, 2012.
26. Galea, G.L., Lanyon, L.E., Price, J.S.: Sclerostin's role in bone's adaptive response to mechanical loading. *Bone.*, 96, 38-44, 2017.
27. Poole, K.E., van Bezooijen, R.L., Loveridge, N., Hamersma, H., Papapoulos, S.E., Löwik, C.W., Reeve, J.: Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J.*, 19 (13), 1842-1844, 2005.
28. Sebastian, A., Loots, G.G.: Transcriptional control of Sost in bone. *Bone.*, 96, 76-84. 2017.
29. Irie, K., Ejiri, S., Sakakura, Y., Shibui, T., Yajima, T.: Matrix mineralization as a trigger for osteocyte maturation. *J Histochem Cytochem.*, 56 (6), 561-567, 2008.
30. Ogura, K., Iimura, T., Makino, Y., Sugie-Oya, A., Takakura, A., Takao-Kawabata, R., Ishizuya, T., Moriyama, K., Yamaguchi, A.: Short-term intermittent administration of parathyroid hormone facilitates osteogenesis by different mechanisms in cancellous and cortical bone. *Bone Rep.*, 5, 7-14, 2016.
31. Nishiyama, Y., Matsumoto, T., Lee, J.W., Saitou, T., Imamura, T., Moriyama, K., Yamaguchi, A., Iimura, T.: Changes in the spatial distribution of sclerostin in the osteocytic lacuno-canalicular system in alveolar bone due to orthodontic forces, as detected on multimodal confocal fluorescence imaging analyses. *Arch Oral Biol.*, 60 (1), 45-54, 2015.
32. Murakami, H., Nakamura, T., Tsurukami, H., Abe, M., Barbier, A., Suzuki, K.:

- Effects of tiludronate on bone mass, structure, and turnover at the epiphyseal, primary, and secondary spongiosa in the proximal tibia of growing rats after sciatic neurectomy. *J Bone Miner Res.*, 9 (9), 1355-1364, 1994.
33. Wang, L., Wang, Y., Han, Y., Henderson, S.C., Majeska, R.J., Weinbaum, S., Schaffler, M.B.: In situ measurement of solute transport in the bone lacunar-canalicular system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (33), 11911-11916, 2005.
  34. Piekarski, K., Munro, M.: Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature.* 269 (5623), 80–82, 1977.
  35. Weinbaum, S., Cowin, S.C., Zeng, Y.: A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech.*, 27 (3), 339-360, 1994.
  36. Knothe, Tate, M.L., Niederer, P., Knothe, U.: In vivo tracer transport through the lacunocanalicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading. *Bone.*, 22 (2), 107–117, 1998.
  37. Tami, A.E., Schaffler, M.B., Knothe, Tate, M.L.: Probing the tissue to subcellular level structure underlying bone's molecular sieving function. *Biorheology.*, 40 (6), 577-590, 2003.
  38. Wang, L., Ciani, C., Doty, S.B., Fritton, S.P.: Delineating bone's interstitial fluid pathway in vivo. *Bone.*, 34 (3), 499–509, 2004.
  39. Ciani, C., Doty, S.B., Fritton, S.P.: An effective histological staining process to visualize bone interstitial fluid space using confocal microscopy. *Bone.*, 44 (5), 1015–1017, 2009.
  40. Li, W., You, L., Schaffler, M.B., Wang, L.: The dependency of solute diffusion on molecular weight and shape in intact bone. *Bone.*, 45 (5), 1017–1023, 2009.
  41. Price, C., Zhou, X., Li, W., Wang, L.: Real-time measurement of solute transport within the lacunocanalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow. *J Bone Miner Res.*, 26 (2), 277–285, 2011.
  42. Wang, B., Zhou, X., Price, C., Li, W., Pan, J., Wang, L.: Quantifying load-induced solute transport and solute-matrix interactions within the osteocyte lacunar-canalicular system. *J Bone Miner Res.*, 28 (5), 1075-1086, 2013.
  43. Leupin, O., Kramer, I., Collette, N.M., Loots, G.G., Natt, F., Kneissel, M., Keller, H.: Control of the SOST bone enhancer by PTH using MEF2 transcription factors. *J Bone Miner Res.*, 22 (12), 1957-67, 2007.
  44. Silva, B.C., Costa, A.G., Cusano, N.E., Kousteni, S., Bilezikian, J.P.: Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J Endocrinol Invest.*, 34 (10), 801-10, 2011.

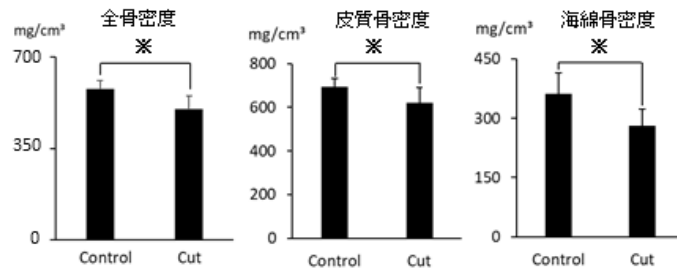
45. Sugiyama, T., Saxon, L.K., Zaman, G., Moustafa, A., Sunters, A., Price, J.S., Lanyo, L.E.: Mechanical loading enhances the anabolic effects of intermittent parathyroid hormone (1-34) on trabecular and cortical bone in mice. *Bone.*, 43 (2), 238-248, 2008.
46. Wagner, E.R., Zhu, G., Zhang, B.Q., Luo, Q., Shi, Q., Huang, E., Gao, Y., Gao, J.L., Kim, S.H., Rastegar, F., Yang, K., He, B.C., Chen, L., Zuo, G.W., Bi, Y., Su, Y., Luo, J., Luo, X., Huang, J., Deng, Z.L., Reid, R.R., Luu, H.H., Haydon, R.C., He, T.C.: The therapeutic potential of the Wnt signaling pathway in bone disorders. *Curr Mol Pharmacol.*, 4 (1), 14-25, 2011.
47. Lewiecki, E.M.: Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis.*, 6 (2), 48-57, 2014.
48. Cosman, F., Crittenden, D.B., Adachi, J.D., Binkley, N., Czerwinski, E., Ferrari, S., Hofbauer, L.C., Lau, E., Lewiecki, E.M., Miyauchi, A., Zerbini, C.A., Milmont, C.E., Chen, L., Maddox, J., Meisner, P.D., Libanati, C., Grauer, A.: Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med.*, 375 (16), 1532-1543, 2016.
49. Spatz, J.M., Ellman, R., Cloutier, A.M., Louis, L., van Vliet, M., Dwyer, D., Stolina, M., Ke, H.Z., Bouxsein, M.L.: Sclerostin antibody inhibits skeletal deterioration in mice exposed to partial weight-bearing. *Life Sci Space Res (Amst)*., 12, 32-38, 2017.
50. Saag, K.G., Petersen, J., Brandi, M.L., Karaplis, A.C., Lorentzon, M., Thomas, T., Maddox, J., Fan, M., Meisner, P.D., Grauer, A.: Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med.*, 377 (15), 1417-1427, 2017.





A

遠位骨幹端部



B

骨幹部

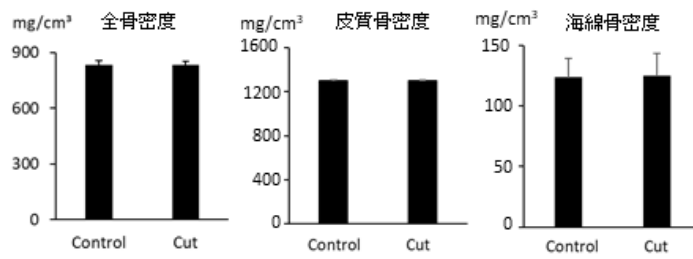


図1. 大住 隆太

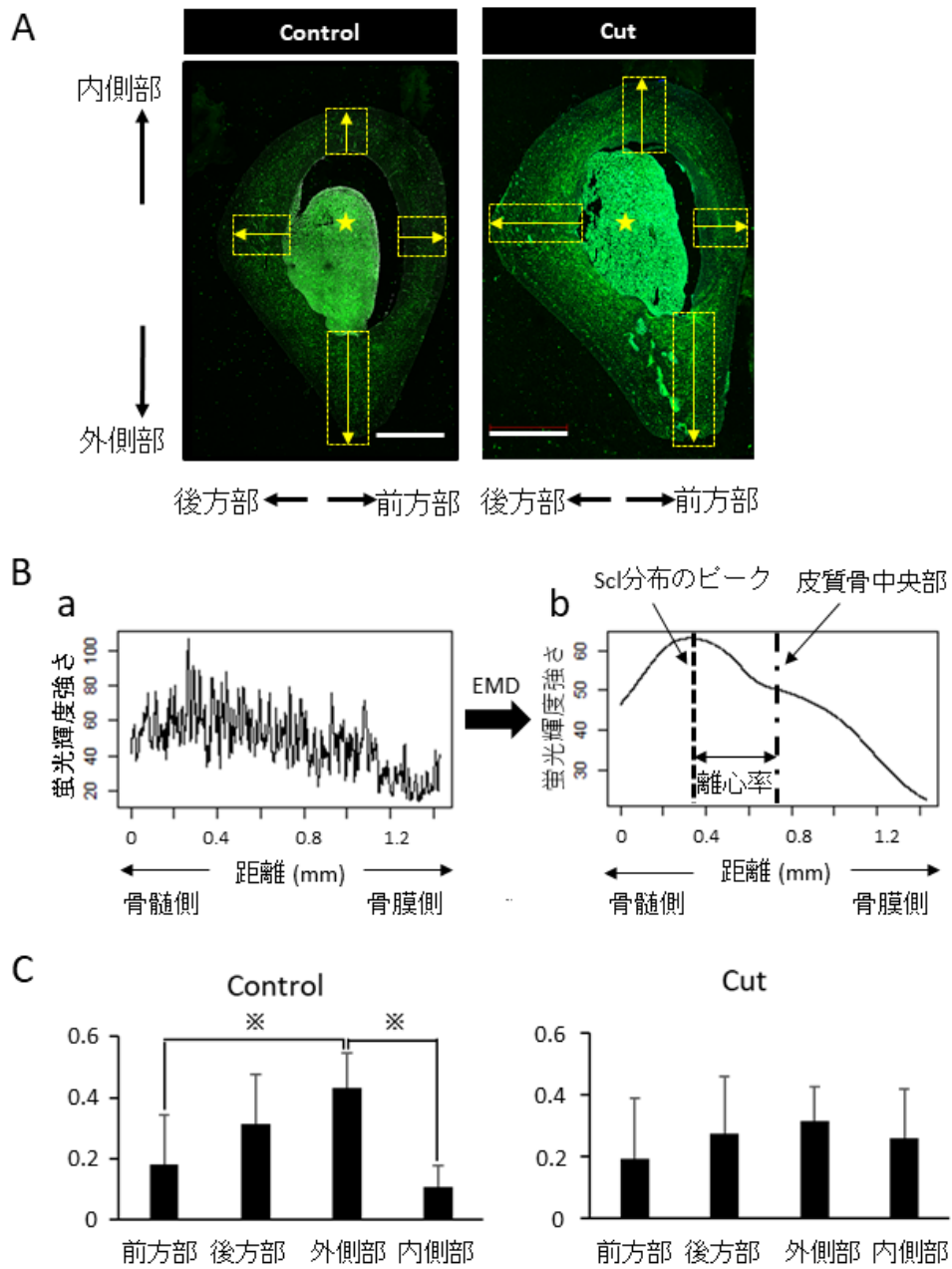


図2. 大住 隆太

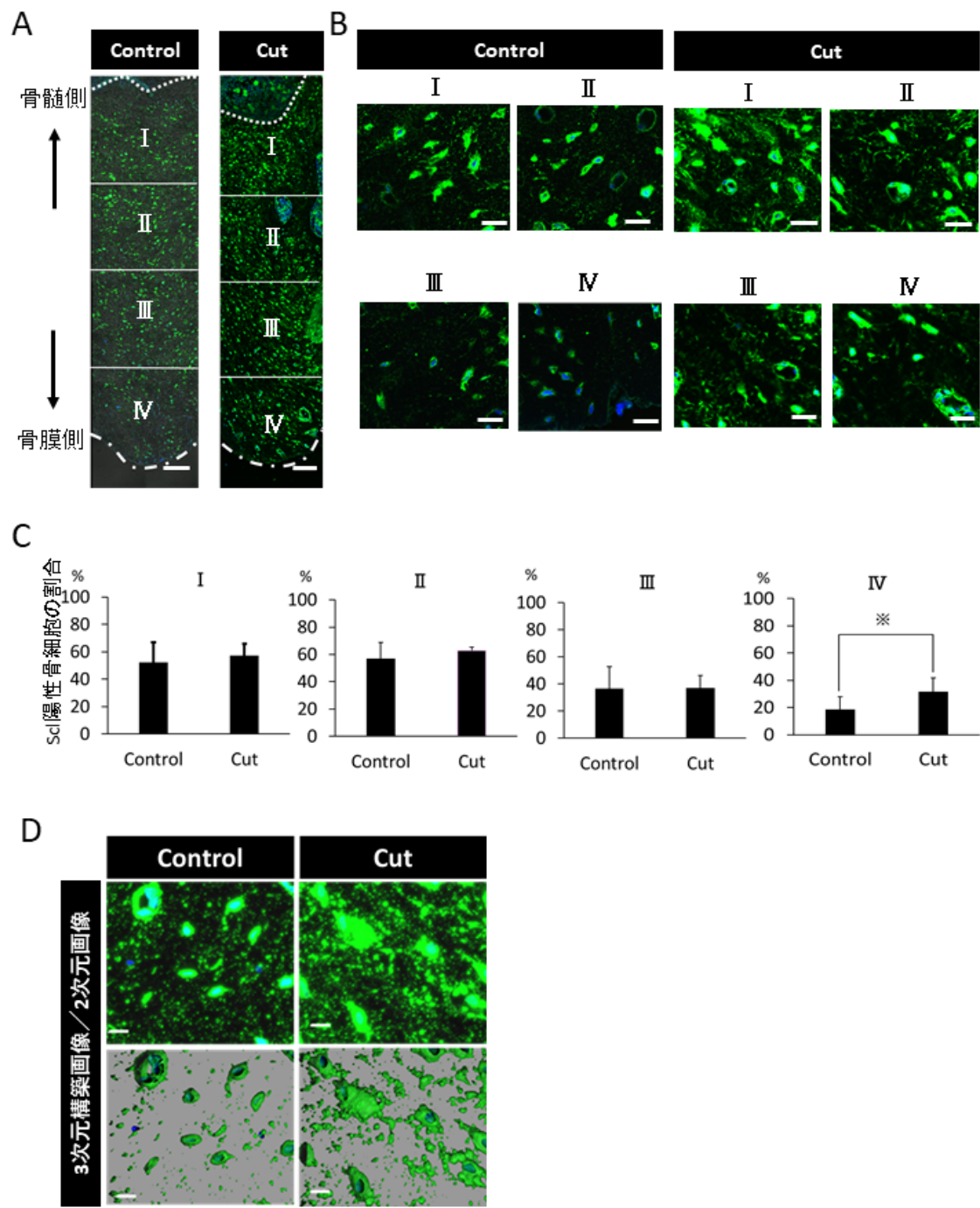


図3. 大住 隆太

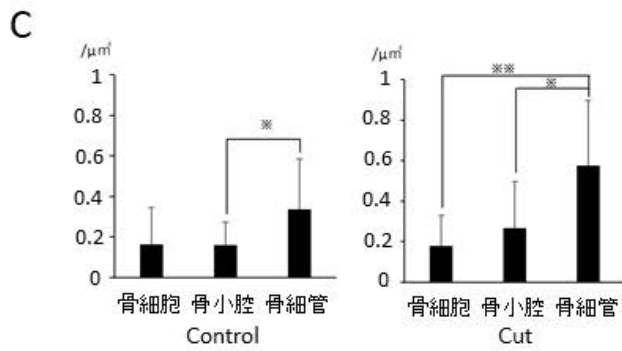
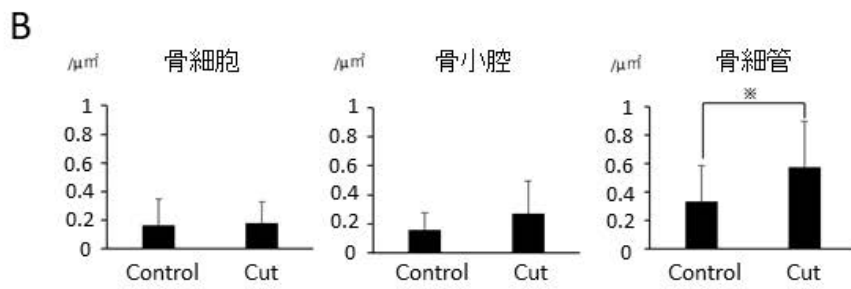
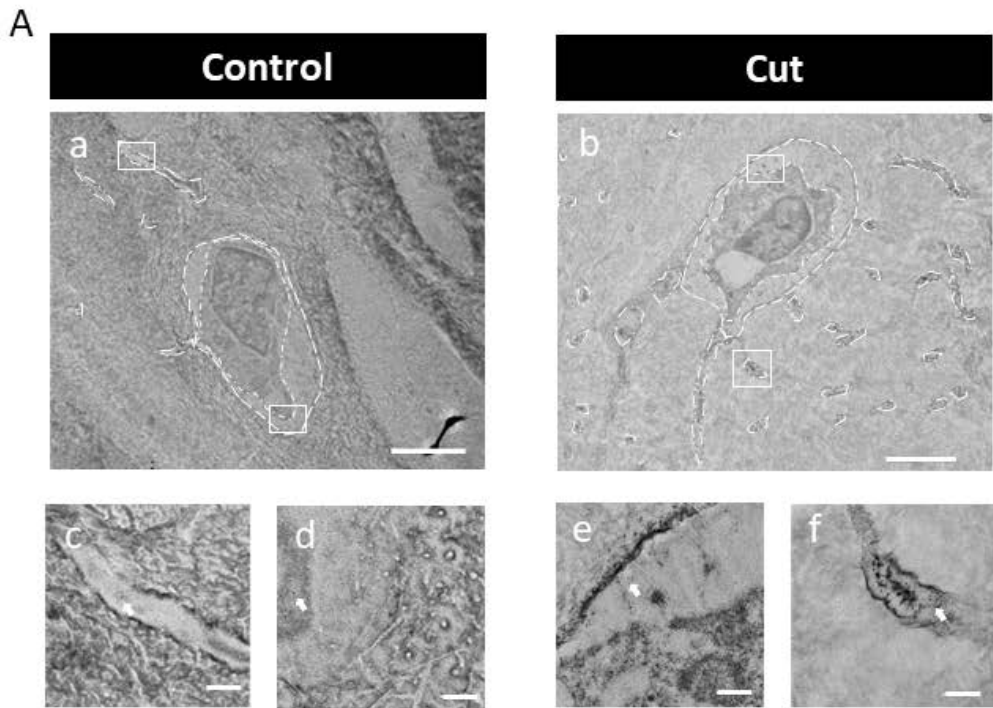


図4. 大住 隆太