

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11088

研究課題名(和文) 実験動物用マイクロX線CTによるBmal-1遺伝子ノックアウトマウスの解析

研究課題名(英文) Analysis of the BMAL1 knockout mice using in vivo micro-CT

研究代表者

本田 和也 (HONDA, Kazuya)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：30199567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類において恒常的な概日リズムは、視交叉上核にあるペースメーカーによって制御されているが、末梢の細胞も概日リズムを持ち、Bmal-1遺伝子を含む時計遺伝子のグループが制御因子の1つであることが知られている。また、Bmal-1ノックアウトマウスでは、腫骨腱をはじめ、肋軟骨、椎間板、膝関節周囲靭帯などに異所性骨形成が起こるとされていることが解明されている。しかし、下顎頭の形態変化の継続的観察についての報告はない。本研究は、Bmal-1遺伝子をノックアウトしたマウスでは、下顎頭にも老化現象が現れていること示し、概日リズムが下顎頭形態変化に影響があることを示した。

研究成果の概要(英文)：Brain and muscle BMAL1 knockout mice exhibit accelerated ageing, glucose metabolism disorder, and adipocyte differentiation, among other phenotypes, as clearly identified effects of the BMAL1 gene. However, studies on the continuous changes in deformation of the mandibular condyle have not been reported. Images of the mandibular condyle were taken after birth under inhalation anesthesia. In BMAL1 knockout mice, deformation of the mandibular condyle was confirmed in 8 of 12 joints. In wild-type mice, deformation was confirmed in 2 of 12 joints. In BMAL1 knockout mice, deformation in areas surrounding the mandibular condyle, which were considered to undergo calcification, was confirmed in 2 of 12 joints. In wild-type mice, deformation was confirmed in 0 joint. In BMAL1 knockout mice, an ageing phenomenon was observed in the mandibular condyle, indicating that the circadian rhythm affects changes in the shape of the mandibular condyle.

研究分野：歯科放射線学

キーワード：Bmal-1遺伝子ノックアウトマウス 骨リモデリング, マイクロCT 顎関節症 変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

Bmal-1 (Brain and muscle Arnt-like protein-1) は脳・筋肉・骨・脂肪組織など全身の細胞に存在し、概日リズムの調節および脂肪細胞の分化や脂肪の生成の促進に関与すると考えられており、加齢およびメタボリックシンドロームに関連したタンパクとして、近年非常に注目されている。この Bmal-1 遺伝子をノックアウトすると、成長につれて、概日リズムの周期性がなくなる、活動性の低下、歩行異常、体重減少、寿命の短縮化の他、軸骨格・体枝骨格における靭帯・腱の石灰化を示す事が知られている (McDearmon EL et al.: Dissecting the functions of the mammalian clock protein BMAL1 by tissue-specific rescue in mice, Science 314:1304-1308 (2006)) が、靭帯・腱の石灰化の過程を経時的におった研究は殆どみられない。一方、動物に対し、低侵襲で経時的变化の観察が可能な実験動物用マイクロ X 線 CT が開発され、優れた研究が多く発表されている。

我々は、Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスの研究における実験動物用マイクロ X 線 CT の画像の信頼性を調査し、「実験動物用マイクロ X 線 CT による Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスの足根関節の観察：食餌と性別が腱の石灰化に及ぼす影響について」と題する研究により、Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスの足根関節の腱の石灰化の経時的観察に実験動物用マイクロ X 線 CT が有効である事を示した。なお、足根関節の腱の石灰化部位を組織標本で評価したところ、石灰化部位に骨細胞と骨様組織の存在が認められ、異所性石灰化と骨代謝との関連性が強く疑われた。(本研究は、第12回EADMFR(ヨーロッパ顎顔面放射線会議)にて発表し、原著論文として公表した。Kai Y et al.: Observation of the Tarsus Joint in the Mop-3/Bmal-1 Gene Knock-out Mouse Using "In vivo" Micro-CT: Influence of Diet and Sex on Calcification of the Tendon of the Tarsus Joint, Journal of Hard Tissue Biology 21:133-140 (2012))

次に、実験動物用マイクロ X 線 CT を用いて、足根関節の腱の石灰化の経時的評価を行い、Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスが加齢に伴って石灰化が出現する過程を観察することができた。

異所性石灰化については足根関節のみならず、胸骨、膝関節および腰椎など、全身の骨格で見られるという報告があるが、その発生順や性差に関する詳細な報告はみられない。また、従来の研究においては頭蓋部で異所性石灰化がみられるという確定された報告はない。

2. 研究の目的

Bmal-1 (Brain and muscle Arnt-like protein-1) は脳・筋肉・骨・脂肪組織など全身の細胞に存在し、概日リズムの調節および脂肪細胞の分化や脂肪の生成の促進に関与すると考えられている。この Bmal-1 遺伝子をノックアウトすると、成長につれて、概日リズムの周期性がなくなり、活動性の低下、歩行異常、体重減少、寿命の短縮化の他、軸骨格・体枝骨格における靭帯・腱の石灰化を示す事が知られている。しかし、石灰化の過程を経時的におった研究は殆どみられていない。今回実験動物用マイクロ X 線 CT によって、Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスの全身的異所性石灰化の経時的観察を行う事により、その発生過程や性差等について分析し、石灰化のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスの全身的異所性石灰化のメカニズムを解明するために、Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスおよび野生型のコントロールマウスを用意し、6週齢からリガク社製実験動物用マイクロ X 線 CT による両側足根関節腱部、両側顎関節部、腰椎椎間部、胸骨周囲部および両側膝関節部の撮影を開始する。撮影は開始 1 日目、3 日目、7 日目に撮影を行い、以下 25 週齢まで、毎週撮影を行う。実験動物用マイクロ X 線 CT の画像評価はモリタ製 i-ViewR を用い、歯科放射線科医による石灰化の有無の判定を行う。撮像終了後、採血を行い生化学検査を行った後に、組織標本を作製し、顕微鏡下で評価を行う。得られたデータについて解析を行い、石灰化の発生過程および性差について分析する。

(1) 平成 27 年度

実験に必要な Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスおよび野生型のコントロールマウス

は、日本大学薬学部より提供を受け、実験に必要な頭数である雄各 10 匹、雌各 10 匹が用意できるように、日本大学歯学部 1 号館トランスジェニックマウス室（準 S P F 環境）にて繁殖飼育中である。

Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスは劣性遺伝であり、個体が弱い為、繁殖には通常のマウスよりも期間を要するが、既に繁殖は成功している。

(2) 平成 28 年度

Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスの骨構造を解明するために、28 年度は Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウス (KO) および野生型のコントロールマウス (CL) のリガク社製実験動物用マイクロ X 線 CT (μ CT) による撮影データの解析を新規に行った。撮影には、筋肉 KO 週齢 10 ヶ月を 4 匹、CL を 4 匹、全身 KO 週齢 7 ヶ月を 6 匹、CL を 5 匹、全身 KO 週齢 2 ヶ月を 3 匹、CL を 2 匹の計 24 匹を使用した。撮影システムとして日本大学歯学部 1 号館に設置されている μ CT を用いた。撮影条件は 90kV, 200 μ A, 撮影時間は 60 秒とした。撮影部位については過去に骨形態変化の報告がある、両側顎関節部に加えて、顎関節部との比較を対象とし、人体でも骨構造の変化がみられやすい両側下顎骨下縁を対象とした。画像再構成は i-ViewR (モリタ) を使用した。ホルマリン固定保存していた屠体について、今年度、90kV, 200 μ A, 撮影時間は 2 分での撮影を行った。撮影後、全身 KO 週齢 7 ヶ月から 3 匹、CL から 1 匹、計 4 匹について、病理組織学的資料の作成を行った。染色法は、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE) 染色およびコッサ染色の二種類とした。コッサ染色はリン酸カルシウム塩と炭酸カルシウム塩のみを黒く染色でき、顎関節部において CL と比較した KO の変形を視覚的に把握できた。HE 染色では CL と比較した KO の骨リモデリングに関与する細胞数の変化を確認できた。 μ CT および病理組織検査にて、顎関節部の骨形態変化を改めて確認し、下顎骨下縁部に変化をきたさないことを新たに確認できた。

(3) 平成 29 年度

Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウス (KO) の

骨構造を解明するために、29 年度は KO および野生型のコントロールマウス (CL) の μ CT による撮影データの追加解析を行った。顎関節部を主軸とし、その他顎顔面骨での形態変化の探索を新規に行った。顎関節部に関しては、「Observation of changes in shape of the mandibular condyle over time in BMAL1 knockout mice using in vivo micro-CT」のタイトルで Journal of Oral Science に投稿した。

29 年度は、28 年度に撮影されたものと同様の筋肉 KO 週齢 10 ヶ月を 4 匹、CL を 4 匹、全身 KO 週齢 7 ヶ月を 6 匹、CL を 5 匹、全身 KO 週齢 2 ヶ月を 3 匹、CL を 2 匹の計 24 匹を使用した。撮影条件は 90kV, 200 μ A, 撮影時間は 2 分で μ CT を用いて撮影した。解析部位は両側顎関節部に加えて、人体では下顎角に相当する部位を対象とした。画像再構成は i-ViewR (モリタ) を使用した。下顎角相当部の画像にて、KO では μ CT 画像上で、骨外形に変化があることを新たに発見した。 μ CT 画像で変化を認めた箇所を組織学的に検討するために、去年度病理標本の作製を行った 4 匹を除く、24 匹中 20 匹の顎関節部及び下顎角部の病理標本作製を行った。染色法は、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE) 染色およびコッサ染色の二種類とした。

4 . 研究成果

(1) 下顎頭の形態変化は Bmal-1 ノックアウトマウスでは生後 6 週で 12 部位中 0 部位、15 週で 2 部位に発現し、25 週では 12 部位中 8 部位で確認された。一方、野生型マウスでは、25 週でも 12 部位中 2 部位であった (Figure 1)。

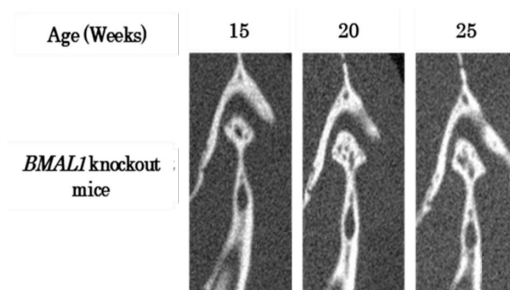


Figure 1. Deformation of the mandibular condyle. In Bmal-1 knockout mice, deformation and absorption were observed internally.

(2) 下顎頭周囲の石灰化と思われる形態変化は Bmal-1 ノックアウトマウスでは生後 6 週で 12 部位中 0 部位, 20 週以降では 12 部位中 2 部位で確認された。一方, 野生型マウスでは, 25 週でも 12 部位中 0 部位であった (Figure 2)。

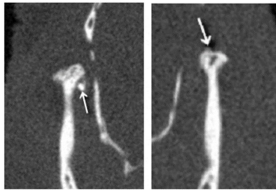


Figure 2. Calcification in areas surrounding the mandibular condyle in Bmal-1 knockout mice at 25 weeks of age. The left image shows the right mandibular condyle from a female mouse, while the right image shows the left mandibular condyle from a male mouse. A calcified substance detached from the mandibular condyle can be observed at the location indicated by the arrow.

(3) 野生型マウスは週齢の増加とともに体重が増加していくことに対し, Bmal-1 ノックアウトマウスでは, 15 週以降で減少傾向を示した。

(4) 6 週と 25 週の下顎頭幅径を計測し, 野生型は下顎頭の幅径に著変はみられなかったが, Bmal-1 ノックアウトマウスでは増加傾向にみられた。

(5) まとめ

事業期間全体を通した結果, KO マウスでは概日リズムが下顎頭の形態変化と下顎頭周囲の石灰化に影響を与えることを示した。また, 下顎角に関しては μ CT 画像上では形態的变化がみられるのに対し, 組織学的には著変をきたさないことを新たに確認できた。今後は, 下顎角と周囲筋群との関係も検討して報告する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Shigenori Hirai, Yusuke Hayashi, Motohiro Ito, Toshihiko Amemiya, Ko Dezawa, Yoshinori Arai, Ken-ichiro Ejima, Shigeki Shimba, Kazuya Honda. Micro-CT observation of in vivo temporal change in mandibular condyle morphology in BMAL1 knockout mice, Journal of Oral Science, 2018 in press

[学会発表](計 5 件)

平井重徳, 川嶋祥史, 林 悠介, 出澤 幸, 雨宮俊彦, 澤田久仁彦, 江島堅一郎, 新井嘉則, 本田和也: in vivo micro CT を用いた Bmal-1 遺伝子ノックアウトマウスの下顎頭形態変化の継時的観察
第 58 回日本歯科放射線学会総会. 2017 年.

松本邦史, 鈴木敏浩, 新井嘉則, 本田和也, 馬嶋秀行: 咀嚼機能の低下が顎関節に与える影響: ラット実験モデルによる経時的評価.
第 58 回日本歯科放射線学会総会. 2017 年.

Matsumoto K, Suzuki T, Arai Y, Honda K: Reduction of mastication activity induces hypotrophy of the mandibular condyle in an OVX animal model: Microcomputed tomography analysis in an experimental animal model.

The 11th ACOMFR Asian Congress of Oral and Maxillo-Facial Radiology. 2016.

Matsumoto K, Suzuki T, Arai Y, Honda K: Reduction of mastication activity induces hypotrophy of the mandibular condyle: Microcomputed tomography analysis in an experimental animal model.

The 15th European Congress of Dento MaxilloFacial Radiology. 2016.

松本邦史, 鈴木敏浩, 小日向清美, 新井嘉則, 本田和也: 咀嚼能力低下による下顎頭の退行性変化: 高齢モデルラットを用いた in vivo 研究.

第 28 回日本顎関節学会学術大会. 2015 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本田 和也 (HONDA, Kazuya)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：30199567

(2)研究分担者

川嶋 祥史 (KAWASHIMA, Shoji)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：30349976

松本 邦史 (MATSUMOTO, Kunihito)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：00508658

江島 堅一郎 (EJIMA, Ken-ichiro)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：50267093

澤田 久仁彦 (SAWADA, Kunihiko)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：00287658

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()