

令和元年6月17日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15778

研究課題名(和文) 無重力環境下における歯と骨の代謝機構解明に向けたモデル動物としてのメダカ活用戦略

研究課題名(英文) Medaka utilization strategy as a model animal for elucidation of tooth and bone metabolism mechanism under microgravity

研究代表者

茶谷 昌宏 (Chatani, Masahiro)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：80628628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：以前の研究から宇宙飛行によってグルココルチコイド(GC)の下流シグナルが上昇することが示された。破骨細胞と骨芽細胞が蛍光タンパク質で標識された遺伝子改変メダカを作製し、メダカにGC製剤を投与したところ、骨代謝が盛んな咽頭歯骨、骨折修復部でGC濃度依存的に破骨細胞と骨芽細胞を減少した。GC受容体であるGR2の欠損メダカを作製、骨折によって動員される破骨細胞と骨芽細胞の量が増加した。GCが骨代謝を抑制することが示唆された。また、重力作用を調べるため加重力環境でメダカを飼育すると脊椎骨形成と耳石形成に異常が見られた。今後、メダカを用いた研究で重力作用の解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グルココルチコイドは過剰に投与されると骨粗鬆症の原因になるともされ、グルココルチコイドによる骨影響のメカニズムは早期の解明が期待されている。宇宙の実験で用いたメダカでは、グルココルチコイドの下流遺伝子の発現が上昇しており、宇宙でのグルココルチコイド作用の原因究明が重要となっている。これから宇宙時代を迎える人類にとってグルココルチコイドによる骨影響の基礎データを得ることは社会的意義がある。また、本研究でメダカを加重力環境で飼育することで脊椎骨形成、耳石形成に異常が見られることがわかった。今後、メダカを用いた解析から重力作用が明らかにすることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have shown that the downstream signal of glucocorticoid (GC) was increased during space flight. We examined the participation of osteoblasts and osteoclasts in osterix-DsRed/TRAP-EGFP double transgenic (Tg) medaka treated with synthetic GCs. The results showed that the decrease of osteoclast and osteoblast in the pharyngeal tooth and bone fracture site. Furthermore, we generated a defective medaka for GR2 which is a GC receptor. The amount of osteoclasts and osteoblasts mobilized by fracture increased in the GR2 deficient medaka. These data suggested that GC suppresses bone metabolism. Also, to study the effects of development of hard tissue by hypergravity, we utilized a biological gravity experimental device. Micro-CT analysis revealed vertebral curvature towards the dorsal side and abnormally formed otoliths, which function to control equilibrium sensation. Our findings indicate that the shape of skeleton as well as otoliths are depended on the fold of gravity.

研究分野：骨生物学

キーワード：メダカ 破骨細胞 骨芽細胞 グルココルチコイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は修士課程の際、幼生が透明であるメダカに哺乳類と同様の破骨細胞が存在すること(根本ら Bone 2007)に着目し、破骨細胞が特異的に光るトランスジェニックメダカを作製することで破骨発生を明らかにした。さらに、破骨細胞分化に必要な c-fms 受容体のゼブラフィッシュ変異体を解析することで魚の骨モデリングについて世界に先駆けて報告した(茶谷ら *Dev Biol* 2011)。そして尾ヒレ骨折治癒モデルを確立し(武山、茶谷ら *Dev Biol* 2014)、さらには魚固有の歯である咽頭歯骨は歯と骨の代謝回転が速く、リモデリング研究にとって優れた実験系であることを見出した。申請者らは c-fms 受容体ノックアウトメダカを作製し、骨吸収されない咽頭歯骨が過剰に残ることを明らかにした(萬徳、茶谷ら 日本骨代謝学会 2015)。次に造骨(osterix-DsRed)と破骨(TRAP-GFP)の細胞が同じ個体で生きたまま観察できるメダカダブルトランスジェニックラインを作製し 2012 年の宇宙実験に用いたところ 2 か月間の無重力の影響により破骨細胞が活性化し、咽頭歯骨の骨量が減少していることが明らかになった。さらに遺伝子発現を調べたところグルココルチコイド受容体(GR)の下流遺伝子の発現上昇を示した(茶谷ら *Sci Rep* 2015)。2014 年の宇宙実験では、孵化直後のメダカを生きたままジェルに包埋し、無重力の初期応答として造骨と破骨マーカーが一過的に上昇することを示した(茶谷ら 米国骨代謝学会 2015 口演)。また、破骨細胞の分化を抑制する OPG と促進する RANKL のダブルノックアウトメダカを作製し、破骨細胞の骨認識メカニズムに新たな因子が必要であることを報告した(茶谷ら 米国骨代謝学会 2015 口演 Young Investigator Award)。以上のようなメダカを用いた破骨と造骨研究の新たな視点から、これまでにない骨リモデリング機構を明らかにすることが期待される。

2. 研究の目的

骨は常に代謝され、骨吸収から骨形成に移る際に破骨細胞から骨芽細胞への働きかけがあり、それを骨のカップリングと呼ぶ。骨カップリングを理解することは骨研究者の夢であり、TGF-beta 等に加えていくつかのカップリング因子が提案されているが、その詳細は明らかではない。宇宙空間では無重力による骨量減少が生じ、重力によるメカニカルストレスが解除されるとなぜ骨が減るのか、骨リモデリングの仕組みをこれまでとは異なる方法で解き明かすことが可能である。申請者らが行った宇宙実験によってメダカはこれまで不可能であった重力変化に対する in-vivo での破骨と造骨を観察できる優れたモデル動物であることが証明された。本研究では、メダカを用いて重力に関連する骨カップリング機構の関係を調べ、新たな骨リモデリング機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

骨芽細胞が osterix 遺伝子のプロモーターにより、破骨細胞が TRAP 遺伝子のプロモーターによりそれぞれ蛍光タンパク質 DsRed, EGFP を発現する遺伝子改変メダカを用いて以下の実験で両細胞の蛍光面積を定量した。GC 製剤プレドニゾロン(PN)を 32 日間投与して咽頭歯骨を観察した。32 日間の PN 長期投与と 11 日間の GC 製剤デキサメタゾン(DX)短期投与が鱗の骨折修復に与える影響を解析した。骨折修復に対する GR2 の機能を調べるため、CRISPR/Cas9 により GR2 遺伝子欠損メダカ(GR2 変異体)を作製した。また、重力作用を調べるため、メダカ加重力専用遠心機を用いて、加重環境でメダカの長期飼育実験を行った。

4. 研究成果

PN 長期投与により咽頭歯骨の骨芽細胞と破骨細胞は有意に減少し、歯を支持する骨の形態異常が生じた。その鱗の骨折部位では骨修復の際に動員される骨芽細胞と破骨細胞が優位に減少し骨修復に障害が生じた。しかし DX 短期投与した骨折部位では破骨細胞のみ優位に減少した。一方 GR2 変異体の骨折部位では両細胞が野生型と比べ約 2 倍増加した。PN 長期投与はメダカの骨芽細胞と破骨細胞に対して抑制的に作用し、骨代謝異常が生じることを明らかにした。また骨折修復において DX 短期投与は破骨細胞に対し抑制的に作用することが示唆された。さらに GR2 変異体の骨折部位では両細胞が増加するため、GR シグナルが両細胞の動員を調整して骨折修復を制御している可能性が示唆された。重力作用を調べるため加重環境でメダカを飼育すると脊椎骨形成と耳石形成に異常が見られた。今後、メダカを用いた研究で重力作用の解明が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Kuritani M, Sakai N, Karakawa A, Isawa M, Chatani M, Negishi-Koga T, Funatsu T, Takami M:

Anti-mouse RANKL Antibodies Inhibit Alveolar Bone Destruction in Periodontitis Model

Mice.

Biol Pharm Bull. 2018;41(4):637-643. doi: 10.1248/bpb.b18-00026.

Chatani M, Morimoto H, Takeyama K, Mantoku A, Tanigawa N, Kubota K, Suzuki H, Uchida S, Tanigaki F, Shirakawa M, Gusev O, Sychev V, Takano Y, Itoh T and Kudo A (2016) Acute transcriptional up-regulation specific to osteoblasts/osteoclasts in medaka fish immediately after exposure to microgravity. Scientific Reports, **6**, 39545, p 1-14

〔学会発表〕(計 12 件)

Chatani M. The potential of medaka fish to uncover mechanisms of gravity response. 15th Korea-Japan Joint Seminar on Space Environment Utilization Research 2018年9月20日 仙台

Chatani M, Mitsuhashi A, Dodo Y, Azetsu Y, Sakai N, Kudo A, Takami M: Effects of gravity change on medaka fish hard tissues. 29th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society (ANZBMS) ANNUAL SCIENTIFIC MEETING, 2018年9月, クイーンズタウン ニュージーランド

黒滝優太郎, 坂井 信裕, 唐川亜希子, 茶谷 昌宏, 根岸-古賀-貴子, 高見 正道:
脂質異常症モデルマウスは骨量減少と歯髄狭窄を発症する
第60回歯科基礎医学会学術大会, 2018年9月, 福岡

N. Sakai, N. Okamatsu, T. Negishi-Koga, A. Karakawa, M. Chatani, Y. Kiuchi, M. Takami: Administration of anti-RANKL antibody to pregnant mice results in impaired development of mammary gland and death of newborns. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (第18回国際薬理学会総会), 2018年7月, 京都

A. Karakawa, M. Isawa, N. Sakai, T. Negishi-Koga, M. Chatani, M. Takami: Effects of Anti-RANKL Antibodies and Zoledronate on Development of Young Mice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (第18回国際薬理学会総会), 2018年7月, 京都

茶谷 昌宏, 三橋 あい子, 畔津 佑季, 坂井 信裕, 工藤 明, 高見 正道:
重力が歯と骨の恒常性に及ぼす作用 - メダカを用いた加重力実験
第36回日本骨代謝学会学術集会, 2018年7月, 長崎(国内学会 口頭発表)

栗谷 未来, 坂井 信裕, 唐川 亜希子, 井澤 基樹, 黒滝 優太郎, 茶谷 昌宏, 根岸-古賀貴子, 高見 正道:
歯周病モデルマウスに対する抗 RANKL 抗体の歯槽骨破壊抑制効果
第36回日本骨代謝学会, 2018年7月, 長崎

茶谷 昌宏:
重力変化がメダカの硬組織に与える影響

第 347 回昭和大学学士会例会，2018 年 6 月，東京（口頭発表）

茶谷 昌宏 メダカ骨芽細胞/破骨細胞の微小重力環境に対する初期応答 第 5 回臨床骨ネットワーク研究会 2018 年 2 月 18 日 東京

茶谷昌宏、萬徳晃子、武山和弘、畔津佑季、森本博也、伊藤武彦、谷川直樹、久保田幸治、鈴木ひろみ、内田智子、谷垣文章、白川正輝、高野吉郎、高見正道、工藤明 “トランスジェニックメダカを用いた骨関連重力応答性遺伝子の解析” 第 2 回日本骨免疫学会ウインターセミナー ホテルマロウド軽井沢 2017 年 1 月 26-28 日

Masahiro Chatani, Kazushi Aono, Masamichi Takami, Akira Kudo, In-vivo behaviors of pre-osteoclasts in c-fms transgenic and knock-out medaka fish. 26th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting, Gold Coast Convention and Exhibition Centre, Poster, 2016 年 8 月 1-24 日

茶谷昌宏、北島未紀、高見正道、工藤明、TRAP ノックアウトメダカが示す ALP 活性化と骨形成の促進. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会 大阪国際会議場、口演、2016 年 7 月 21-23 日

〔図書〕(計 6 件)

Chatani M, Kudo A (2019) Fish as a model for research in space. In: Pathak Y et al. (eds) Handbook of Space Pharmaceuticals. Springer, Switzerland. doi: 10.1007/978-3-319-50909-9_5-1

Chatani M, Kudo A (2018) Fish in Space Shedding Light on Gravitational Biology. In: Hirata H and Iida A (eds) Zebrafish, Medaka and Other Small Fishes. Springer, Singapore. p 85-97 doi: 10.1007/978-981-13-1879-5_5

茶谷 昌宏 (2018) 400 km上空の生きた細胞を見る 月刊細胞 50 (12) p 38-39

茶谷 昌宏 (2018) メダカ骨芽細胞/破骨細胞の微小重力環境に対する初期応答 White 6(1) p 69-70

茶谷 昌宏、畔津 佑季、坂井 信裕、高見 正道 (2017) メダカ咽頭歯の制御システム - 歯の再生技術開発への応用を目指して - 昭和学士会雑誌 77 (6) p 698-702.

茶谷 昌宏. (2017) 【宇宙医学研究の最先端】骨 宇宙環境における骨研究 メダカ実験の意義とは、腎と骨代謝 (0914-5265)30 巻 3 号 p 185-194.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：畔津佑季

ローマ字氏名：Azetsu Yuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。