

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592710

研究課題名(和文)メッケル軟骨の消失機構とその意義

研究課題名(英文)Mechanism and significance of Meckel's cartilage disappearance

研究代表者

天野 修 (AMANO, Osamu)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：60193025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスメッケル軟骨では、1)間葉凝集と2)軟骨形成後の軟骨膜に限定してアポトーシスが検出された。以上のことから、メッケル軟骨の消失にはアポトーシスは関与しないことが明らかとなった。1)と2)はともに軟骨芽細胞の増殖分化が活発な部位なので、アポトーシスは軟骨芽細胞から軟骨細胞への分化の過程で重要であることが示唆された。また、アポトーシスを抑制するとメッケル軟骨の形成不全が発生した。さらに、脂肪酸結合タンパク質の局在をメッケル軟骨と骨端板軟骨で調べたところ、セプトクラストと呼ばれる非石灰化軟骨吸収細胞であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：During the development of mouse Meckel's cartilage, apoptosis was detected limitedly at 1) the mesenchymal condensation and 2) the perichondrium. No apoptotic cells were found in Meckel's chondrocytes; therefore, apoptosis does not participate in the degeneration of Meckel's cartilage. Because substantial proliferation and differentiation occur in the area of 1) and 2), apoptosis may play important roles in chondroblast differentiation for the development of Meckel's cartilage. Inhibition of apoptosis induced the dysplasia of Meckel's cartilage. In addition, immunolocalization of fatty acid-binding protein (FABP) in Meckel's and the growth plate cartilages, epidermal type FABP was exclusively expressed in the septoclast, a absorbing cells of uncalcified cartilage matrix.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：メッケル軟骨 細胞死 アポトーシス オートファジー 脂肪酸結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の胎仔の頭頸部で見られる組織消失について、昨年度までの科学研究費課題(20592146)の解析の過程で、メッケル軟骨の発生過程に、アポトーシスに陥る軟骨細胞がほとんど認められないことが示された。このことから、メッケル軟骨の消失過程では、他の細胞死機構により細胞の消滅と組織吸収が生じることが示唆された。また、メッケル軟骨の発生初期や軟骨膜で認められるアポトーシスの役割は不明のままである。近年の研究で、関節炎や骨端板の軟骨細胞でオートファジーの存在が報告されるようになった。また、オートファジーを制御する HIF-1 と -2 が共に肥大軟骨細胞に局在していることも最近分かってきた。また、HIF-1a の下流にある Hsp90 および Hsp70 も発現している (Genin et al. 2008)。これらの因子は栄養環境の変化に伴う低酸素状態に対する反応と考えられている。Hsp70 はメッケル軟骨での局在が報告されている (Trichilis and Wroblewski, 1997)。これらの状況は、メッケル軟骨にオートファジーとその制御機構が存在することを強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究では大きく次の点について解析する。

メッケル軟骨の消失に非アポトーシス性の細胞死(有力な候補様式はオートファジー)が関与するのか否か。

メッケル軟骨に生じるアポトーシスの発生学的意義は何か。

メッケル軟骨を含む軟骨組織に存在する脂肪酸から、脂質による軟骨の吸収消失機構は何か。

メッケル軟骨が正常に発生・消失しない場合に下顎形成に与える影響を調べ、哺乳類におけるメッケル軟骨の役割を解明する。

3. 研究の方法

A) 細胞死検出に関する実験

電子顕微鏡による観察

細胞死関連因子の局在の組織化学的解析

細胞死関連因子の遺伝子発現の解析

B) 器官培養系を用いた実験

胎齢 10 および 13 日齢のマウス胎仔下顎を器官培養し、約 8 日間無血清培地内で培養する。

4. 研究成果

(1) メッケル軟骨および関連領域に生じるアポトーシスの役割

メッケル軟骨の発生から消失までの過程におけるアポトーシスの出現の時期と局在を組織化学的に検索し、さらに器官培養系を用いた実験により、アポトーシスの役割を

解明した。胎齢 12.0 日齢(E12.0)のオトガイ孔予定域では、メッケル軟骨に分化する間葉凝集の周囲に多数のアポトーシスが見られた。E14.0 の前方・中間部では、メッケル軟骨の下外側部の軟骨膜に多数のアポトーシスが見られた。E15.0 の前方部では、外側の軟骨膜にアポトーシスが見られた。中間部では、軟骨小腔の拡大が認められたが、軟骨膜にはアポトーシスは見られなかった。E16.0 の中間部では、軟骨の肥大や基質の破壊が進み、より多くのアポトーシスが周囲の骨形成部に見られたが、メッケル軟骨と軟骨膜にはアポトーシスは見られなかった。新生仔(P0)の中間部および後方部では軟骨基質もほとんどなくなり、アポトーシスはほとんど見られなかった。マウス胎仔下顎の器官培養系を用いて Z-VAD-fmk を投与した実験群では、メッケル軟骨の軟骨膜にはアポトーシスは見られず、前方部、中間部の欠損および異所性の腺様組織が認められた。対照群ではメッケル軟骨周囲にアポトーシスが見られ、メッケル軟骨の形も正常であった。以上の結果より、アポトーシスは軟骨膜における軟骨芽細胞の分化と不要な組織の除去に関わり、メッケル軟骨の正常な形態形成に必須であることが示された。

(2) オートファジー関連因子の発現

マウスメッケル軟骨の発生過程で、当初有力と思われた HIF-1 と HIF-2 は、免疫組織化学的には検出できなかった。用いた抗体の特異性に依存する組織化学的な問題があるとも思われたが、オートファジーによらない細胞死機構の存在も示唆された。また電子顕微鏡的では積極的にオートファジーを思わせる微細形態学的所見はほとんど得られなかった。

Ishizeki らによれば、メッケル軟骨細胞は消失後も骨細胞や線維芽細胞に transdifferentiate して後継組織中で生存する可能性が示されたので、細胞死自体が軟骨細胞には生じないことも考えられた。

(3) 肝細胞増殖因子アンタゴニスト

HGF はメッケル軟骨の成長に関与することが申請者らの研究で明らかにされてきたが、そのアンタゴニスト NK4 を器官培養系に適用して HGF の受容体レベルでの結合競合阻害を試みたところ、メッケル軟骨の小型化、軟骨細胞の肥大化、骨化に類似した形質の発現が認められた。このことから HGF の軟骨中での減少がメッケル軟骨の成長抑制と軟骨細胞の肥大化を引き起こすことが示唆された。

(4) 脂肪酸による軟骨基質吸収機構

本研究では、表皮型脂肪酸結合タンパク(E-FABP)がマウス骨端(成長)板軟骨吸収帯に存在する septoclast に特異的に局在すること、軟骨内骨化で非石灰化軟骨基質を吸収する septoclast が E-FABP を特異的に発現し

ていること,および胎生期の一次骨化中心の発生直後から骨端板に存在することを明らかにした。

さらに,脳に強く発現する脳型脂肪酸結合タンパク(B-FABP)の硬組織における局在を,成獣マウスに対して,抗B-FABP抗体および抗MAC-2抗体を用いた免疫組織化学および酵素組織化学的TRAP染色を行い検索した。その結果,破骨細胞・破軟骨細胞にB-FABPが特異的に局在することが分かった。

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12件)

1. Bando Y, Yamamoto M, Sakiyama K, Inoue K, Takizawa S, Owada Y, Iseki S, Kondo H, Amano O.: Expression of epidermal fatty acid binding protein (E-FABP) in septoclasts in the growth plate cartilage of mice. *J Mol Histol*. [Epub ahead of print, PubMed PMID: 24879443] 2014
2. Sekine S, Shimodaira C, Uesawa Y, Kagaya H, Kanda Y, Ishihara M, Amano O, Sakagami H, Wakabayashi H.: Quantitative structure-activity relationship analysis of cytotoxicity and anti-UV activity of 2-aminotropones. *Anticancer Res*. 34(4):1743-50. 2014
3. Sakiyama K, Takizawa S, Bando Y, Inoue K, Sasaki A, Kurokawa K, Shimoo Y, Suzuki M, Abe S, Amano O.: Characteristics and effects of muscle fibers surrounding lingual carcinoma. *J Hard Tissue Biol* 22(2):215-220. 2013
4. 土居孝資, 山田 亨, 佐々木会 坂東康彦, 崎山浩司, 鐘ヶ江晴秀, 須田直人, 天野修: マウスメッセル軟骨の発生過程におけるアポトーシスの役割. *明海歯科医学* 42:75-86. 2013
5. Rodríguez-Vázquez JF, Sakiyama K, Verdugo-López S, Amano O, Murakami G, Abe S.: Origin of the torus mandibularis: An embryological hypothesis. *Clin Anat*. 26(8):944-52. 2013
6. Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K.: Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: -overview of the Japan salivary glandsociety-sponsored workshop-. *Acta Histochem Cytochem*. 45(5):241-50. 2012

7. Tamura N, Hirano K, Kishino K, Hashimoto K, Amano O, Shimada J, Sakagami H.: Analysis of type of cell death induced by topoisomerase inhibitor SN-38 in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Anticancer Res*. 32(11):4823-32. 2012
8. Ohno S, Kobayashi K, Uchida S, Amano O, Sakagami H, Nagasaka H.: Cytotoxicity and type of cell death induced by midazolam in human oral normal and tumor cells. *Anticancer Res*. 32(11):4737-47. 2012
9. Kobayashi K, Ohno S, Uchida S, Amano O, Sakagami H, Nagasaka H.: Cytotoxicity and type of cell death induced by local anesthetics in human oral normal and tumor cells. *Anticancer Res*. 32(7):2925-33. 2012
10. 徳永寛司, 坂東康彦, 崎山浩司, 天野修: 肝細胞増殖因子による舌筋細胞の増殖と分化の促進-器官培養法と連続切片法による解析-. *明海歯科医学* 41:128-133. 2012
11. Otsuki S, Sugiyama K, Amano O, Yasui T, Sakagami H.: Negative regulation of NaF-induced apoptosis by Bad-CA11 complex. *Toxicology*. 287(1-3):131-6. 2011
12. Sasaki A, Yamada T, Inoue K, Momi T, Tokunaga H, Sakiyama K, Kanegae H, Suda N, Amano O.: Localization of heat shock protein 27 (hsp27) in the rat gingiva and its changes with tooth eruption. *Acta Histochem Cytochem*. 44(1):17-24. 2011

[学会発表](計7件)

1. 坂東康彦, 崎山浩司, 井上勝元, 大和田祐二, 天野修: マウス骨端板軟骨のseptoclastにおける表皮型脂肪酸結合タンパク(E-FABP)の局在. *日本組織細胞化学会第52回学術集会(金沢)* 2011/9
2. 坂東康彦, 崎山浩司, 井上勝元, 瀧澤将太, 大和田祐二, 天野修: マウス脛骨骨端板のseptoclastにおける表皮型脂肪酸結合タンパク(E-FABP)の免疫組織化学的局在と発生過程における分布変化. *日本解剖学会第117回総会・全国学術集会(甲府)* 2012/9
3. 天野修, 坂東康彦, 崎山浩司, 大和田祐

二:硬組織における脳型脂肪酸結合タンパクの局在 .日本解剖学会第 117 回総会・全国学術集会 (甲府) 2012/9

4. 天野 修 : J.F.Meckel 一族と Meckel 軟骨の発見とその意義 . 日本解剖学会第 118 回総会・全国学術集会 (高松) 2013/3
5. 崎山浩司 , 瀧澤将太 , 坂東康彦 , 天野 修 : 下顎隆起発生の期限に関する仮説 . 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (岡山) 2013.9
6. Amano O , Bando Y , Sakiyama K , Owada Y . Occurrence of B-FABP/FABP7 in mouse osteoclast . 2nd IADR-Asia Pacific Region (Bangkok) 2013.8
7. Bando Y , Takizawa S , Sakiyama K , Owada Y , Amano O : Localization of E-FABP in the epiphysal plate of mice . 2nd IADR-Asia Pacific Region (Bangkok) 2013.8

6 . 研究組織

(1)研究代表者

天野 修 (AMANO , Osamu)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号 : 6 0 1 9 3 0 2 5