

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659813

研究課題名(和文) 鳥類の骨髓骨代謝と卵殻腺における石灰化の同調機構

研究課題名(英文) The mechanism of synchronization among the shell gland and medullary bone on the eggshell calcification in Japanese quail.

研究代表者

山本 敏男 (Yamamoto, Toshio)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30107776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵殻腺における卵殻石灰化と骨髓骨の同調機構について、プロゲステロン並びに殻腺に加わる張力に着目し、これらと骨髓骨破骨細胞の動態について調べた。プロゲステロン投与は卵殻石灰化の活発な時期の破骨細胞の活性を抑制した。また、卵殻石灰化時期の卵を卵殻腺から摘出し張力を除去すると、活発な時期の破骨細胞は不活発な様相呈するようになり、抑制を受けた。したがって、産卵周期に伴う骨髓骨破骨細胞の活性周期にはプロゲステロン並びに卵殻腺に加わる張力が重要であることが強く示唆された。

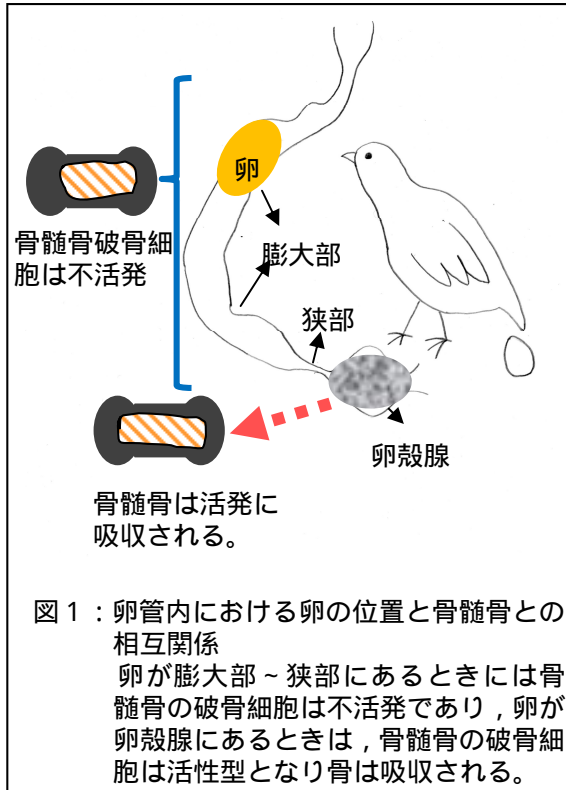
研究成果の概要(英文)：To study the synchronizing mechanism among shell gland and medullary bone for the eggshell calcification in Japanese quail, the effects of progesterone and the mechanical tension caused by plumped shell gland itself by an egg over the osteoclastic activity of medullary bone were examined. Progesterone administered at the active stage of medullary bone osteoclasts inhibited the osteoclasts. And the extraction of an egg from shell gland to remove mechanical tension also caused the inhibition of osteoclastic activity in medullary bone. These results strongly suggest that progesterone, and the mechanical tension in shell gland by pumping, respectively may play important roles for the periodic change of the osteoclastic activity synchronized with egg laying cycle in medullary bone.

研究分野：組織学

キーワード：ウズラ 骨髓骨 卵殻腺 破骨細胞 プロゲステロン 性ホルモン 骨吸収 鳥類

1. 研究開始当初の背景

産卵期の鳥類は卵殻石灰化に必要なカルシウム(Ca)の貯蔵所として骨髓腔に骨髓骨という特殊な骨を形成し、卵が卵殻腺(子宮に相当)に入ると骨髓骨の破骨細胞は活性化し、卵殻石灰化に際し大量のCaを供給する。他方、卵が卵殻腺以外の卵管に存在するときは骨形成が優位になる(図1)。この様に骨髓骨の吸収・形成は卵管内における卵の存在



部位と同調することが知られているが、その同調機構は判っていない(Barr, 2009)。そこで、著者らは卵管と骨髓骨の同調機構の要因の一つとして卵が卵殻腺に進入することによって卵殻腺に加わる張力が重要であろうと仮定した。また、プロゲステロン投与により卵殻腺における卵殻石灰化が阻害されたという報告がみられることから(Goto et al., 2002)、プロゲステロンも同調機構の要因の一つとして想定した。

2. 研究の目的

本研究は卵殻石灰化に伴う卵管、特に卵殻腺と骨髓骨の同調機構を調べることを目的として、(1)卵殻腺に加わる張力、ならびに(2)プロゲステロンがそれぞれ骨髓骨破骨細胞の動態におよぼす影響を組織学的に調べた。

3. 研究の方法

実験動物には主としてニホンウズラを用い、また必要に応じてニワトリも用いた。

(1)卵殻腺に加わる張力が骨髓骨破骨細胞におよぼす影響を調べた。すなわち、産卵時刻から卵が卵殻腺に進入する時刻を推定し、

卵殻腺に卵が進入した直後(産卵後4～5時間)に総排泄腔から卵を摘出し、約10時間後(産卵後14～15時間)に骨髓骨を採取して破骨細胞の動態を調べた。

(2)プロゲステロンによる卵殻石灰化の阻害と骨髓骨の関連について下記の実験系を用いて調べた。

卵が卵殻腺に進入した後(産卵後4～5時間)にプロゲステロン(1 mg/0.1 mL)を投与し、10時間後(産卵後14～15時間)に骨髓骨を採取して破骨細胞の動態を観察した。

プロゲステロンの卵殻石灰化阻害は骨髓骨破骨細胞の骨吸収抑制の結果と考えられたので、オスウズラにエストロゲンを投与して実験的に骨髓骨形成を誘導し、形成された骨髓骨の吸収に対するプロゲステロンの影響を調べた。

4. 研究成果

(1)卵の進入によって卵殻腺に加わる張力と骨髓骨破骨細胞の活性について

産卵周期において、卵は、排卵後約5時間は膨大部～狭部に存在し、この間骨髓骨は骨形成が優位な時期である。引き続き卵は卵殻腺に入り約20時間存在し、その間に卵殻の石灰化が進行する。この時期、骨髓骨の破骨細胞は活発な骨吸収を行い、卵殻石灰化のためにCaを動員することが知られている。本研究において、卵が卵殻腺に入り骨髓骨破骨細胞が活発になる時期に卵を摘出し、約10時間後(産卵後約15時間)に骨髓骨を採取して観察したところ、破骨細胞は骨基質から遊離しているものが多く、また細胞内には空胞構造はみられず、不活発な様相を呈していた(図2A)。他方、対照として卵摘出を行わなかったものでは、破骨細胞は骨基質に密着し、基質に接している細胞質には大小の空胞構造が多数観察され、骨吸収が活発な様相を呈していた(図2B)。

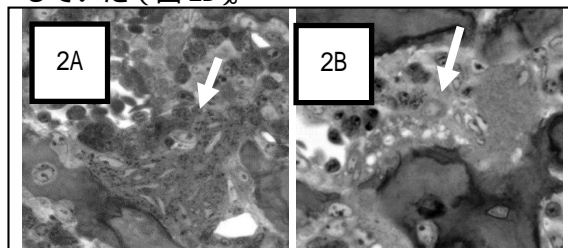


図2: 骨髓骨破骨細胞

2A: 張力を取り除くと、不活発な様相を呈する。2B: 対照群では活発な様相を呈していた。

この結果から、卵が卵殻腺中にあり、活発骨吸収を行う破骨細胞は卵の摘出によって不活発なることが初めて明らかとなった。したがって、卵の摘出すなわち卵殻腺にかかる張力の消失が骨髓骨破骨細胞の不活性化に関係することが強く示唆された。本研究におい

ては卵殻腺と破骨細胞の同調機構に介在する液性因子として RANK-RANKL 系を想定したが、今回は明らかにならなかった。ウエスタンブロット法ならびに免疫組織化学的に使用可能な抗体の作製等を行い、卵殻腺と骨髓骨の代謝に直接介在する因子を解明する必要がある。

(2) プロゲステロンが骨髓骨破骨細胞の活性におよぼす影響について

産卵ウズラに対するプロゲステロン投与の影響

前述の如くプロゲステロンは卵殻石灰化を抑制したという報告がみられることから、本研究では卵殻線維卵が進入する時期(産卵後4~5時間後)にプロゲステロン(1 mg/0.1 mL)を投与しその影響を調べた。その結果、産卵された卵の卵殻は、個体差はみられるものの、石灰化度は低く所謂軟卵状を呈していた。このことから、プロゲステロンにより卵殻石灰化が阻害されることが確かめられたと共に卵殻石灰化の低下は骨髓骨破骨細胞の骨吸収抑制によるCa供給低下によることが推察された。

前述の結果を基に、卵殻の石灰が活発な時期の骨髓骨破骨細胞におよぼすプロゲステロンの影響を調べた。

卵が卵殻腺に進入した後(産卵後4~5時間後)にプロゲステロンを投与(1 mg/0.1 mL)し、投与後約10時間(産卵後約15時間)で卵殻腺中の卵と骨髓骨を採取した。対照群は無処理の産卵ウズラとし、骨髓骨破骨細胞の活発な時期の産卵後約15時間のものとした。プロゲステロンを投与したウズラの卵は、卵殻は柔らかく石灰化が極めて悪く、且つ卵黄が透過してみえ黄色を呈していた(図3)。他方、産卵後約15時間の対照群の卵

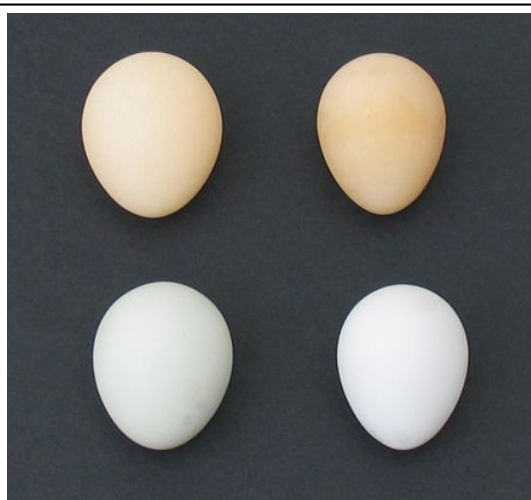


図3：卵殻腺中の卵

上段はプロゲステロン投与したもので、卵殻の石灰化が極めて悪く、且つ卵黄色が透けて全体的に黄色を呈している。

下段は無処理のもので、卵殻の石灰化が進行し、白色を呈する。

は卵殻の石灰化が進行しており、硬く且つ白色を呈していた(図3)。骨髓骨の破骨細胞を観察すると、卵殻の石灰化する時期の骨髓骨破骨細胞は骨基質に接し、細胞質には大小の空胞構造が観察され(図4A)、また破骨細胞の標識酵素であるTRAP活性も強陽性を呈しており、破骨細胞は活発な様相を呈していた。

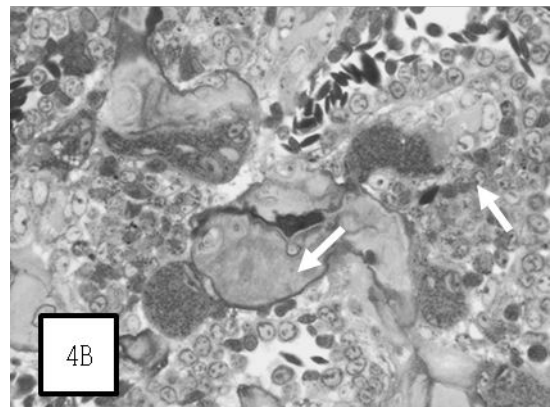
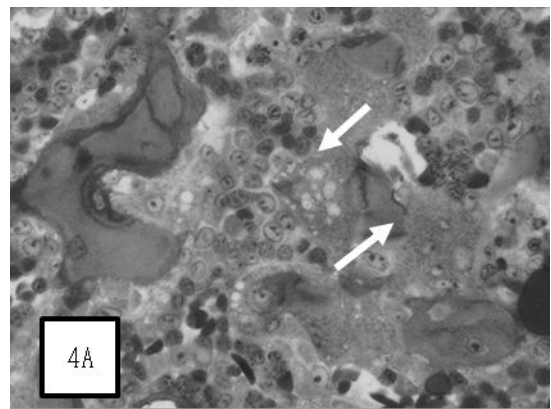


図4：ウズラ骨髓骨の破骨細胞(OCL)

4A：無処理の骨髓骨(産卵後15時間)
OCL()には多数の空胞構造がみられ、活発な様相を呈している。

4B：プロゲステロン投与の骨髓骨(産卵後15時間)
活発なOCL()にみられる空胞構造が消失しており、不活発な様相を呈する。

プロゲステロンを投与した骨髓骨の破骨細胞を観察すると、破骨細胞は骨基質から遊離し、細胞内の空胞構造は激減していた(図4B)。また、TRAP活性も若干減少していた。以上の結果から、産卵ウズラの活発な骨髓骨破骨細胞はプロゲステロンによって抑制されることが明らかとなった。

オスウズラにエストロゲン投与し一過性に誘導された骨髓骨の吸収過程に対するプロゲステロンの影響

の結果が極めて新規性に富むものであった。他方プロゲステロンは卵殻腺にも作用することが考えられ、破骨細胞の抑制経路が卵殻腺経由の可能性もある。本実験では、オスウズラにエストロゲンを単回投与(0.5 mg/0.1 mL)し、一過性に骨髓骨形成を誘導した。形成された骨髓骨はエストロゲンの効

果が失われると吸収されることが知られている。したがって、プロゲステロンがこの骨吸収を抑制するかどうかを調べた。エストロゲン投与後7日、14日に骨髓骨を採取することとし、実験群には7日目にプロゲステロン(1mg/0.1mL)を1日おきに投与した。エストロゲン投与7日目では、骨髓骨の骨梁は骨髓腔の中心に向かって1/2~1/3程度に伸長していた。14日目では対照群の骨髓骨は皮質骨から僅かに骨梁がみられる程度に減少していた(図5A)。他方、7日目からプロゲステロンを投与したものでは、骨量の減少はほとんど認められなかった(図5B)。したがって、プロゲステロンは骨吸収を阻害す

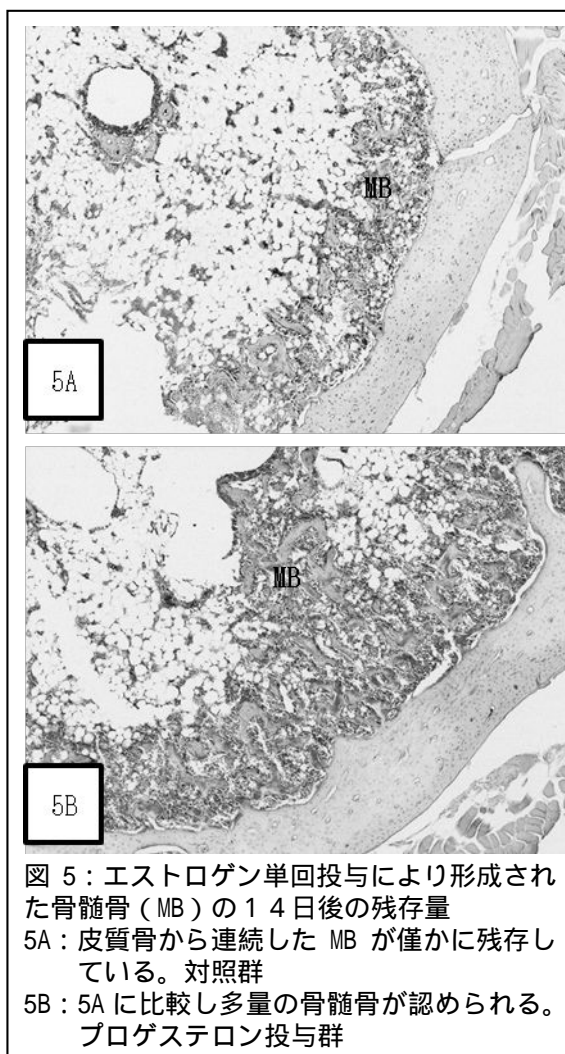


図5: エストロゲン単回投与により形成された骨髓骨(MB)の14日後の残存量
5A: 皮質骨から連続したMBが僅かに残存している。対照群
5B: 5Aに比較し多量の骨髓骨が認められる。プロゲステロン投与群

ることが明らかになり、且つプロゲステロンは骨髓骨破骨細胞に直接作用する可能性が強く示唆された。

総括

研究成果(1)から、卵殻腺から卵を除去する、すなわち張力を除去することにより骨髓骨破骨細胞の活性が抑制された。このことから卵が卵殻腺に入り張力が高まることにより卵殻腺から破骨細胞の活性化因子が放出される可能性を示唆するものである。

研究成果(2)から、プロゲステロンが骨髓骨破骨細胞の活性を抑制することが本研究により初めて明らかにされたと考えられる。エストロゲン、アンドロゲンと骨代謝については多くの報告があるが、プロゲステロンと骨代謝についてはほとんど知られておらず、生殖器と骨代謝研究に新たな視点を提供する新規性のある所見と考えられる。

<引用文献>

Barr, A., Calcium transport in strongly calcifying laying birds: Mechanism and regulation. *Com. Biochem. Physiol, Part A.* 152, 2009, 447-469

Goto, H. et al., Effect of sex steroid hormone on gene expression of calcium-binding protein (CaBP-D28K) in the shell gland. *Jpn. Poul. Sci.* 39, 2002, J1-J10,

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)

[学会発表](計 1件)

山本 敏男, 塩津 範子, 片岡 陽平, 河井 まりこ, 池亀 美華
プロゲステロンは産卵ウズラの骨髓骨破骨細胞の活性を抑制する
第56回歯科基礎医学会学術大会・総会
2014年9月25~27日, 福岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 敏男 (YAMAMOTO, Toshio)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 30107776

(2)研究分担者

池亀 美華 (IKEGAME, Mika)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 70282986

河井 まりこ (KAWAI, Mariko)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 40379839

杉山 稔恵 (SUGIYAMA, Toshie)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号: 10272858