

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659909

研究課題名(和文)筋形成抑制因子ミオスタチンの骨リモデリングに対する関与について

研究課題名(英文)THE EFFECT OF MYOSTATIN ON BONE REMODELING

研究代表者

上岡 寛(KAMIOKA, HIROSHI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80253219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：筋組織から骨組織への液性因子による介在を検討するために、筋肉成長を抑制する液性因子として知られるミオスタチンの骨形成に対する影響を検討することを当初の目的として実験を行った。その過程で、骨形成を検討するために必要な2つの系、すなわち、骨組織中の生細胞のリアルタイムカルシウムイメージング、また、骨質の検討のために必要な3次元微細構造解析での検討において成果があがったので報告する。

研究成果の概要(英文)：In order to examine the participation of muscle to the bone via humoral factor, we focused on the myostatin, which inhibits muscle growth. Firstly, we tried to examine the effect of myostatin on the bone formation. In the process of examining the bone formation, we could establish realtime calcium imaging of bone cells as well as 3D analysis of microstructure of bone.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：筋組織 骨組織

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

筋組織から産生されるサイトカイン(ミオカイン)の一つであるミオスタチンは、筋肉形成を抑制し、その遺伝子が欠損したマウス、牛では、筋肉量が倍増することが報告された。一方、我々が行う矯正治療では骨リモデリングを利用して歯の移動を行うが、顔面筋、咬合筋による機械的刺激は、歯の移動、後戻りに影響を及ぼすことが知られている。つまり、矯正治療による歯の移動と隣接する筋肉は密接に関連している。また、顔面形態と歯の移動のスピードには、相関関係があり、咬筋の発達したローアングルケース(一般にエラの張った顔)では、歯の移動は遅く、逆に咬筋の発達の弱いハイアングルケース(一般に長い顔)では、歯の移動は速いことが知られている。従来では、この歯の移動の違いは、咬合力の差によって解釈されてきた。しかしながら、筋肉から産生されるミオスタチンなどのミオカインが骨リモデリングに働き、歯の移動に影響を与えるのかは検討されていない。すなわち、筋組織と骨組織の相互関係を液性因子に着目し探索する研究は国内外において論文報告されていない。

2. 研究の目的

(1)ミオスタチンの骨リモデリングに対する *in vivo* での影響を検討

ミオスタチンに競合する ACVR2 を用いて、骨形成作用にミオシンが影響するのかを検討するために、ACVR2 の歯槽骨内投与を実験的歯牙移動モデル Waldo 法によって検討する予定であったが、より骨組織での動態を観察しやすいようにリアルタイムでの骨組織中の細胞を観察する方法を検討した。この観察では、ACVR2 を投

与後、骨組織中の骨芽細胞や骨細胞のカルシウム応答を指標に検討する。

(2) ミオスタチンの骨基質形成に与える影響を検討

ミオスタチンの骨形成に与える影響を検討するためには、その最終的産物である骨組織構造を検討することが必要となる。そこで、骨の *ex vivo* での培養を行い、その培地にミオスタチンまたは ACVR2 を投与し、形成された骨の基質構造の違いをマイクロオーダーからナノオーダーまでの集束イオンビームを併用した SEM で観察し、立体構築し、ミオスタチンが骨組織形成にどのような影響をもたらすのかを検討する。

3. 研究の方法

(1)ニワトリ胚頭蓋骨内での骨芽細胞、骨細胞の細胞内カルシウム動態の観察

17 日齢ニワトリ胚頭蓋骨を取り出し、培地中で、細胞内カルシウム指示薬 Fluo-8(10 μ M)と細胞への透過性を上げるための 10% Pluronic F-127 を投与するその後、37 $^{\circ}$ C で 40 分間培養した。その後、培地にて洗浄し、ACVR2 を添加して、骨組織中の骨芽細胞、骨細胞などの細胞内カルシウムの動態を観察する。観察には、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、40 倍の対物レンズでの視野を 512x512pixel の解像度で撮影した。撮影は、1 秒ごとに行った。

(2)器官培養系でのミオシンの骨形成作用についての検討

ニワトリ胚頭蓋骨を グルコールフォスフェートとアスコルビン酸を含む骨形成促進培養液中で 3 日間器官培養する。アリザリンレッドを石灰化の指標として骨形成に対する影響を検討する。

(3)集束イオンビームを併用したSEMを用いた骨組織の観察

骨組織の構造はコラーゲン線維の構造の変化でもある。よって、ミオスタチンの骨形成に与える影響を検討するために、骨組織を電子染色し、集束イオンビームで切片を作成し、その表面をSEMで観察し、これを繰り返すことで、コラーゲン線維の走行に変化を3次元的に観察する。

ミオスタチンによる影響を検討するためには、ACVR2を表面付着させた金ビーズを器官培養上に配置して、その隣接する部位と周囲の部位でのコラーゲン線維の走行の変化を比較する。

4. 研究成果

(1) ニワトリ胚頭蓋骨内での骨芽細胞、骨細胞の自立的細胞内カルシウムの変化

最初に、骨表面に存在する骨芽細胞の自立的細胞内カルシウム応答を検討した。結果、図1にみられるFluo-8で映し出された骨芽細胞を追跡したところ、図2に示されるように計測された時間内に、自立的にカルシウム応答をおこなっていることが確認できた。

図1

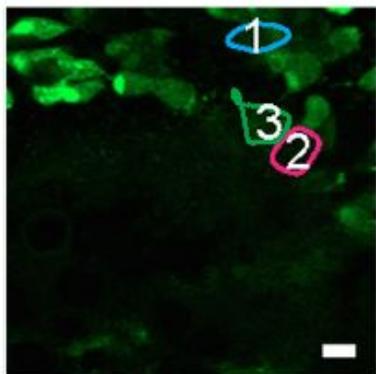
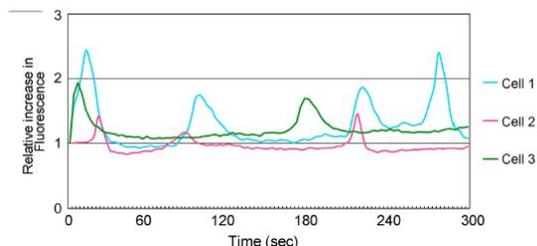


図2



また、同様に骨深部に存在する骨細胞の自立的細胞内カルシウム応答を検討した。結果、図3にみられるFluo-8で映し出された骨細胞を追跡したところ、図4に示されるように計測された時間内に、自立的にカルシウム応答をおこなっていることが確認できた。

図3

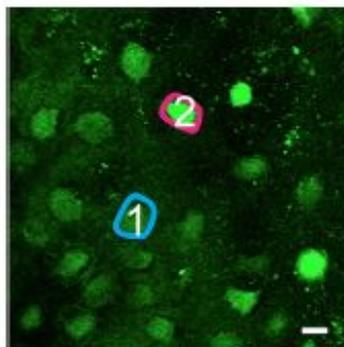
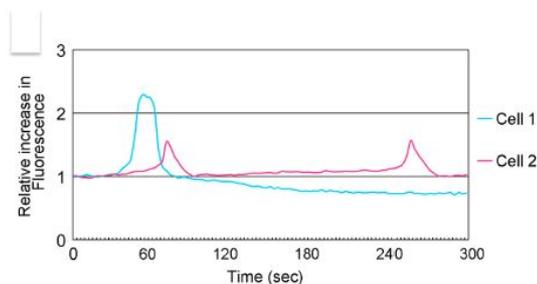


図4



この系を用いて、現在、骨芽細胞と骨細胞にACVR2を投与して、それぞれの細胞の細胞内カルシウムを検討している。両細胞にわずからながら細胞内カルシウム応答が観察されており、現在、その結果を解析中である。

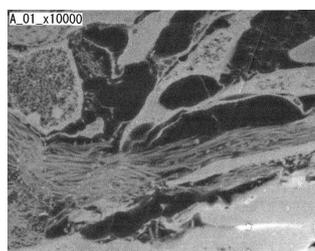
(2) 器官培養系でのミオスタチンの骨形成作用についての検討

ニワトリ胚頭蓋骨を3日間器官培養して、アリザリンレッドを石灰化の指標として骨形成に対する影響を検討する。まず、器官培養を行っている3日間で骨形成促進培養液中でニワトリ胚頭蓋骨の骨梁が太くなるのが光学的にも観察され、アリザリンレッドによって、その染色される範囲が広がっていることが確認された。従来 of *in vivo* の報告によれば、ミオスタチンは、頭蓋骨の大きさを増大することが報告されているが、今回形態的に ACVR2 による影響は観察されなかった。これは、胎生期で成長中の頭蓋骨を使用したために、差がでなかったのかもしれない。現在、成熟した頭蓋骨(つまり骨形成の盛んでない状態の骨)を用いた ACVR2 の影響について検討を行っている。

(3) 集束イオンビームを併用した SEM を用いた骨組織のコラーゲン線維を中心とした微細構造について

(2)の研究で、ACVR2による骨の大きさの影響が観察された場合には、骨基質の微細構造の確認が必要である。そこで、集束イオンビームを併用した SEM 観察でコラーゲン線維を中心とした微細構造の観察を行った。まず、観察条件を検討するために、固定、電子染色を検討した。図5のように電子染色でコラーゲン線維の走行の観察が可能であることが確認できた。

図5



このようにミオスタチンの骨形成に対する影響を検討し、プレリミナリーであるが、上記の実験で、一部骨形成に対する反応がみられた。今後は、この機序について更なる検討が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Yoshihito Ishihara, Yasuyo Sugawara, Hiroshi Kamioka, Noriaki Kawanabe, Keiji Naruse, Takashi Yamashiro. Oscillatory intercellular Ca²⁺ responses in living bone. *Journal of Oral Biosciences* 査読有, 印刷中 DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2014.03.002>

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 上岡 寛、骨芽細胞から形成されるコラーゲンの高詳細3次元イメージング、第34回日本骨形態計測学会(招待講演)、2014年6月12日~6月14日

2. 上岡 寛、骨組織の動態を探る蛍光イメージング、第55回(平成26年度)日本生化学会中国・四国支部例会(招待講演)2014年6月6日~6月7日、松山市

3. 上岡 寛、亀尾佳貴、安達泰治、骨細管イメージモデルを用いた流れ解析、日本機械学会 2013年度年次大会 2013年9月8日~9月11日、岡山市

4. 上岡 寛、保崎留美子、原徹、原由佳、張偉珠、長岡紀幸、山城 隆、直交型 FIB-SEM を用いた骨組織の観察、第119回日本解剖学会総会・学術大会(招待講演) 2014年3月27日~3月29日、下野市

5. 上岡 寛、骨細胞のバイオイメージングと

ナノモデル解析 第 55 回歯科基礎医学会学
術大会・総会(招待講演) 2013 年 9 月 20 日
～9 月 22 日、岡山市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上岡 寛 (KAMIOKA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 80253219

(2)研究分担者

柳田 剛志 (YANAGITA TAKESHI)

岡山大学病院・助教

研究者番号 : 90534793