

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420754

研究課題名(和文) 遺伝子欠損骨疾患マウスを用いた咀嚼障害モデルによる結晶配向化制御

研究課題名(英文) Control of BAp orientation in mandible with the masticatory disturbance using gene-deleted pathological mice.

研究代表者

藤谷 渉 (FUJITANI, WATARU)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・技術専門職員

研究者番号：90379149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞機能不全を呈するc-src KOマウス下顎骨のBAp配向性を微小領域X線回折法で調べた。近遠心方向に垂直な皮質骨断面内の各部位における骨密度、配向性は対照群に比べて低くなった。骨力学特性の一つであるヤング率変化との相関は骨密度変化よりも配向性変化で強くなった。破骨細胞不全により骨微細構造と力学機能に顕著な影響を及ぼした。

研究成果の概要(英文)：In this research, we analyzed the biological apatite (BAp) c-axis orientation in the mandible of the c-src KO mice with osteoclast-malfunction utilizing the microbeam X-ray diffraction technique. In comparison with the control mice, the c-src KO mice showed a low degree of BAp orientation and reduced bone mineral density (BMD). The degree of BAp c-axis orientation rather than BMD largely correlated with the Young's modulus. Thus, it is suggested that the osteoclast malfunction had significant effects on bone microstructure and mechanical function.

研究分野：生体材料学

キーワード：生体アパタイト 配向性 下顎骨 咀嚼障害 微小領域X線回折 骨系細胞

1. 研究開始当初の背景

骨などの生体硬組織の力学機能は、骨量・骨質によって支配されている。中でも、力学的異方性を有する生体アパタイト(BAp)結晶は、生体内の各骨部位に応じた優先配向性を呈し骨力学機能を最適に制御していると考えられる。したがって、BAp 配向性の制御および制御する因子の解明は不可欠である。特に下顎骨は、曲げに起因する近遠心方向に沿った顎骨支持荷重と歯牙からの咀嚼荷重が複雑に負荷され全身骨格の中でも特異で重要な骨である。BAp 配向化のメカニズムとしてはこれまで咀嚼や成長などの *in vivo* 応力を感知して、コラーゲン線維の方向に BAp が c 軸配向し、骨量・骨密度が高まって力学特性を発揮するようになることを当グループで明らかにしてきた。したがって、これらの3つのパラメータは互いに影響しながら制御されている。

一方、一軸荷重が負荷される骨断面では、応力感受機能を有する骨細胞オステオサイト(OCY)は荷重方向に大きく伸展することが確認されている。下顎骨における複雑な *in vivo* 応力分布を反映し異方構造を示す BAp 配向変化を骨細胞レベルにおいてメカノセンサーとしての OCY の形態変化と対応させて考察することは極めて興味深い。

これまで、骨微細構造の異方性を示すパラメータに注目し、BAp 結晶の c 軸分布、すなわち配向性に代表される骨質を結晶学的手法で解析し、下顎骨に関して以下のような検討を行い、BAp に関わる新事実を見出してきた。

1. 特異な咀嚼荷重による応力状態の変化

ビーグル犬の臼歯を抜歯し咀嚼障害モデルとしたもの。ラット上顎第1臼歯を削り取ることで下顎に負荷される咀嚼荷重で除したものの。

2. エストロゲン欠乏による骨代謝変化

ラットの卵巣を摘出しエストロゲン欠乏状態とすることで BAp 配向性が制御される。

3. 細胞間情報伝達物質としての Ca イオン、Mg イオン欠乏による栄養障害
栄養障害として低 Ca、低 Mg 濃度のえさを与えたもの。

4. op/op マウスによる骨代謝変化

破骨細胞欠損による歯牙放出不全による咀嚼障害モデル。

以上より1と4の咀嚼障害モデルおよび破骨細胞欠損モデルの2つについては咀嚼や成長による *in vivo* 応力分布に対応して下顎骨の各部位で顕著な BAp 配向変化が認められた。

一方、2と3の骨代謝変化モデルや栄養障害モデルでは、下顎骨での配向化には骨代謝変化や栄養障害の影響は咀嚼荷重の変化に比べて極めて小さいことが示された。

以上の結果より、咀嚼の有無による骨量(骨密度、骨体積)骨質(BApのc軸配向性)の変化を、より明確にとらえるためには、

下顎骨に直接的に働く *in vivo* 応力を変化させること、骨代謝変化モデルにおいては遺伝子欠損させることにより細胞機能そのものを欠損もしくは不活性化させる因子を考慮していくことが効果的であるとの手がかりを得た。

実際に op/op マウスの下顎骨形状をソフト X 線投影画像や μ CT 断面画像で観察した場合、下顎骨第一大臼歯を含む下顎骨の形状は対照群と比較すると両検体で大きく異なっている。特に op/op マウスでは歯牙の萌出が認められない。さらに切歯も消失していることから皮質骨の断面形状も大きく異なっていることが確認できる。このような特徴的な形状変化より op/op マウスや一部の遺伝子組み換えマウスでは咀嚼障害を示すことは明らかで、BAp の配向化に対する *in vivo* 応力分布、細胞挙動の影響を評価し得る貴重なモデルであることが理解できる。

2. 研究の目的

下顎骨における BAp 結晶の c 軸配向性は、近遠心方向へ優先配向し、成長や咀嚼にともなう *in vivo* 応力分布の変化とともに協調的に制御されている。本研究では咀嚼の有無による骨量(骨密度、骨体積)骨質(BApのc軸配向性)の局所変化をミクロンオーダーの微小領域でとらえ、骨微細構造と骨力学機能との関連を明らかにする。具体的には OCY をメカノセンサーとして活用し、骨細胞レベルでの応力分布状態を OCY 形状変化としてとらえ定量化し骨微細構造パラメータとの対応を図る。本手法は顎骨において咀嚼形態の大きく異なる切歯、臼歯はもとより嚙咀障害モデルなどにも展開する。以上の結果より、咀嚼障害に起因する顎骨骨微細構造変化に対する制御因子を結晶工学的な解析から解明する。

3. 研究の方法

生体骨検体および咀嚼障害モデルの作製法樹立と X 線による結晶学的な解析を行う最適な測定条件の確立、そして測定部位の決定を行う。試料として用いる各種マウス顎骨(n=5)は 5, 12, 24 週齢の成長期および成熟期試料を準備する。下顎骨咀嚼障害モデルは咀嚼による *in vivo* 応力を制御する。以下項目ごとに実験方法を記す。

3-1. op/op マウスより下顎骨を摘出

- ・各週齢の op/op マウスに対して吸引麻酔を行う。(ジエチルエーテル)
- ・各週齢の op/op マウスに麻酔薬(ソムノペンチル 共立製薬(株) ペントバルビタールナトリウム含有)を適量腹腔内に投与する。
- ・麻酔下において各週齢の op/op マウスより下顎骨を速やかに摘出する。

- ・ダイヤモンドホイール (Model 660 South Bay Technology Inc.) を用いて下顎骨に近遠心方向に垂直に切り出す。
- ・切歯、臼歯の存在および咀嚼の影響を考慮して切断部位を選択する。

3-2. *c-src* 遺伝子ノックアウトマウス (*c-src* KO マウス) の作製と下顎骨の摘出

c-src KO マウスは、M-CSF 欠損の *op/op* マウスとは異なり、血液系幹細胞の分科の下流に位置することから、骨片や生体外由来の物質に対して、マクロファージの出現がない。その上、成長にともない破骨細胞が復活を始める *op/op* マウスに比べ、一生涯正常な破骨細胞 (波状縁の欠損) の出現が認められない。したがって、*op/op* マウスよりも本研究にはより適しているといえるが、その繁殖力が弱く、系統維持が困難である。そこでまず *op/op* マウスを用いた研究を先行し、*c-src* KO マウスに対しての繁殖法を確立する。それが成功した後の下顎骨の摘出については、前項と同様であり、最終的に、切歯、臼歯の存在および咀嚼の影響を考慮して切断部位を選択する。

3-3. 組織の観察

a. 光学顕微鏡観察

- ・中性 10%ホルマリン溶液に浸漬し組織固定を行う。
- ・実態顕微鏡等により外形状を観察する。
- ・切片を作製する場合は組織固定、アルコール脱水後 EDTA 脱灰を行う。
- ・包埋前処理の後パラフィン包埋を行う。
- ・切片を切り出し HA 染色し光学顕微鏡 (BX60, CKX31 オリンパス) にて骨組織を観察する。
- ・切片を TRAP および ALP 染色し骨組織や骨系細胞の活性状態を確認する。
- ・切片を染色し共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-D オリンパス) によりオステオサイト (OCY) の 3D 形態変化を定量測定する。

b. 電子顕微鏡観察

- ・骨組織を摘出後、固定液中で組織の乾燥を防ぎながら細かく切断する。
- ・グルタルアルデヒド+カコジル酸緩衝溶液で 1 時間前固定を行う。
- ・四酸化オスミウム溶液で 1 時間後固定の後、カコジル酸緩衝溶液で洗浄しアルコール脱水を行う。
- ・乾燥の後金パラジウム蒸着を行い走査型電子顕微鏡 (JSM-840A 日本電子) を観察する。
- ・エポキシ樹脂包埋後ダイヤモンドナイフを用いてマイクロトーム (LEICA ULTRACUT UCT 日本電子) で切片を作製する。
- ・カーボン蒸着の後透過型電子顕微鏡 (JEM-2010, JEM-3010 日本電子) を観察する。

c. X 線撮影

- ・軟 X 線撮影により投影画像および外形状を

観察する。

- ・ μ CT (SMX-100CT 島津製作所), 軟 X 線 (X'sy 型 島津製作所) 撮影により骨の形状を評価する。
- ・ナノ X 線 CT (nano 3DX, Rigaku) を用いて OCY 形状の観察を行う。

3-4. 骨量・骨質の評価

- ・pQCT (Stratec; XCT-Research SA+) により骨密度、骨断面面積の測定を行う。
- ・微小領域 XRD 法 (M18XHF22-SRA マックスサイエンス) により反射法で結晶配向性を評価する。
- ・微小領域 XRD 法 (D8 Discover with GADDS, Bruker AXS; Cu-K 線) により透過法で結晶の骨面内配向性を評価する。
- ・微小領域 XRD 法 (R-AXIS BQ, Rigaku; Mo-K 線) により透過法で結晶の骨面内配向性を評価する。
- ・パソコンでデータの解析を行い定量的な評価を行う。

3-5. 骨力学機能の測定

- ・ナノインデンテーション (ENT-1100a, ELIIONIX) を用いて局所領域のヤング率測定を行う。
- ・パソコンでデータの統計学的な処理を行い有意差検定等を行う。

4. 研究成果

4-1. 下顎骨の形状観察

op/op マウスおよび *c-src* KO マウス下顎骨のソフト X 線観察等の画像で認められた歯牙の萌出不全により、いずれも咀嚼の影響が極めて小さいと推察された。破骨細胞欠損 (*op/op* マウス) および破骨細胞機能不全 (*c-src* KO マウス) による骨吸収不全を呈するこれらの下顎骨モデルでは BAp 配向化に対する *in vivo* 応力分布、骨細胞挙動を評価し得る貴重なモデルであると考えられた。M-CSF タンパクの欠如および破骨細胞の機能不全によりもたらされたこれらの歯牙萌出不全は、結果として皮質骨面積・骨密度の減少をもたらす複雑な *in vivo* 応力分布の一因となっていることが明らかとなった。

4-2. 咀嚼障害モデルの BAp 配向性測定

咀嚼の有無による BAp 配向変化は顕著に表れた。*op/op* マウスおよび *c-src* KO マウス下顎骨の BAp の *c* 軸配向性は他の障害モデル、例えば抜歯モデルや上顎臼歯削合モデルなどと類似の結果を示したが、本モデルでは M-CSF タンパクの欠如あるいは破骨細胞の機能不全により骨密度や *c* 軸配向性に顕著な減少が認められた。これは *in vivo* 応力変化に加えて、破骨細胞数の減少機能不全により骨代謝回転に直接的に影響したためと推察された。さらに骨密度減少による応力伝達能

の低下に起因して *c* 軸配向性低下がもたらされた可能性も指摘された。すなわち、咀嚼荷重排除モデルの BAp 配向性変化は咀嚼荷重の有無による *in vivo* 応力分布を直接反映しているのに対して、遺伝子欠損モデルの *c-src* KO マウスでは破骨細胞の機能不全による歯牙形成異常、骨組織異常が認められそれらに関連して大理石骨症を呈し BAp 配向性の変化はより複雑であった。このような結果は、下顎骨特有であり長管骨など他の部位とは異なる特徴的な現象であると考えられる。

4-3. 骨微細構造の観察

大理石骨症を呈する *op/op* マウスおよび *c-src* KO マウス下顎骨の微細組織観察により、両試料で骨細胞の乱れ、骨芽細胞の活性低下が認められた。そして透過型電子顕微鏡観察ではコラーゲン走行方向に垂直なコラーゲンホールゾーンに由来する縞模様が消失した。また、回折リングは BAp 配向の等方性を示し対照群で認められる咀嚼方向への BAp の *c* 軸配向も全く認められなかった。このような顎を支える近遠心方向の骨質低下は骨代謝回転の不完全によりもたらされるとともに咀嚼荷重排除の影響も反映したもので骨力学機能に強く影響することが予想された。

4-4. ナノ X 線 CT による OCY の観察

応力感受機能を有する OCY の形状変化に注目し、ナノ X 線 CT を用いてメカノセンサーとして骨系細胞の定量観察を試みた。測定に必要な最適条件の調査を行った。試料の最適部位、サイズの見込みのみならず、装置自体の恒温保持や試料と検出器間の距離の最適化を行うことで分解能 270nm を実現することが可能となった。空間分解能に加えて時間分解能の極めて重要であることが明らかとなった。

咀嚼の有無による複雑な *in vivo* 応力変化を反映して OCY 形状は変化した。負荷応力の方向への伸長度合いや骨長手方向からの角度分布などを定量的に評価した。正常な対照群の下顎骨歯根直下においても近遠心方向以外から負荷される咀嚼荷重に影響により OCY 形状の変化を明確にとらえることができた。一方、*c-src* KO マウスにおいては下顎骨のみならず大腿骨など長管骨においても OCY の伸長度合いの低下や配向の乱れが認められた。これらの結果は BAp 結晶の *c* 軸配向変化と良い一致を示した。

4-5. 骨量・骨質と骨力学機能評価

BAp 結晶の *c* 軸配向性低下、骨系細胞の乱れは骨力学機能に影響をおよぼすことが懸念される。骨密度 BAp 結晶の *c* 軸配向性そしてナノインデンテーションで測定したヤング率について、各データに対し統計学的処理を行いその寄与率を求めた。

c-src KO マウス下顎骨においてヤング率

変化が骨密度変化に比べて BAp 結晶の *c* 軸配向性でより強い相関が認められたことから下顎骨の力学機能は骨密度に比べて BAp 配向性により強く支配されていることが示された。すなわち、遺伝子欠損骨疾患マウスにおいても正常の場合と同様、骨力学機能に対しては骨密度よりも配向性の寄与が大きく、下顎骨における骨力学機能には BAp 配向性が極めて重要であることを明らかとした。

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 2 件)

1) Takayoshi Nakano, Aira Matsugaki, Takuya Ishimoto, Mitsuharu Todai, Ai Serizawa, Ryoichi Suetoshi, Yoshihiro Noyama and Wataru Fujitani
“Control of Oriented Extracellular Matrix Similar to Anisotropic Bone Microstructure”
Materials Science Forum, Vols. 706-709 (2013) pp484-487
THERMEC2013(2013.12.5)

2) T. Nakano, A. Matsugaki, T. Ishimoto, M. Todai, A. Serizawa, R. Suetoshi, Y. Noyama, W. Fujitani
“Control of oriented extracellular matrix similar to anisotropic bone microstructure”
Materials Science Forum, Vol. 783 786 (2014), pp. 5-11.

[学会発表等](計 12 件)

1) 藤谷 涉、大橋 知弘、寺田 大将、辻 伸泰、芹澤 愛、中野 貴由
“医療用異種 Ti 合金の重ね圧延(ARB)による組織と力学特性”
日本金属学会(2013 9 18)金沢市

2) Takayoshi Nakano, Aira Matsugaki, Takuya Ishimoto, Mitsuharu Todai, Ai Serizawa, Ryoichi Suetoshi, Yoshihiro Noyama and Wataru Fujitani
“Control of Oriented Extracellular Matrix Similar to Anisotropic Bone Microstructure”
THERMEC2013(2013.12.5)ラスベガス

3) 藤谷 涉、中野貴由
“大理石骨病マウス(*op/op* マウス)下顎骨の骨量・骨質評価”
歯科理工学会(2014.4.13)東京都

4) 藤谷 涉、石本卓也、中野貴由
“指向性ポーラスインプラントによる骨配向化誘導の評価”

生物学技術研究会(2014.2.21)岡崎市

5) 石本卓也、王 俊、藤谷 涉、中野貴由
“ラット尺骨への人為的 *in vivo* 負荷に対する
骨配向化応答”
日本金属学会(2014.9.24)名古屋市

6) 藤谷 涉、中野貴由
“咀嚼荷重の有無による下顎骨の骨量・骨質変化”
歯科理工学会(2014.10.5)広島市

7) 藤谷 涉
“大理石骨病マウス(op/op マウス)下顎骨の骨
質測定”
生物学技術研究会(2015.2.20)岡崎市

8) 石本卓也、Kim Tea Wan、藤谷 涉、中野
貴由
“卵巣摘出ラット尺骨への強制応力負荷による
アパタイト配向化”
日本金属学会(2015.3.19)東京都

9) 藤谷 涉、中野貴由
“上顎臼歯を削合したラット下顎骨の咀嚼障
害にともなう骨量・骨質変化”
日本歯科理工学会(2015.4.12)仙台市

10) 藤谷 涉、中野貴由
“遺伝子欠損骨疾患マウス下顎骨の BAp 配向
性”
日本歯科理工学会(2015.10.4)東京都

11) 大瀬昌明、藤谷 涉、中野貴由
“X 線を用いた組織観察の生物学への応用”
生物学技術研究会(2016.2.18)岡崎市

12) 藤谷 涉、石本卓也、中野貴由
“遺伝子欠損骨疾患マウス下顎骨の骨質測定”
生物学技術研究会(2016.2.19)岡崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤谷 涉 (FUJITANI, Wataru)
大阪大学・大学院工学研究科・技術専門職員
研究者番号：9 0 3 7 9 1 4 9

(3) 連携研究者

中野 貴由 (NAKANO, Takayoshi)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：3 0 2 4 3 1 8 2