

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462796

研究課題名(和文)軟骨吸収における脂肪酸と脂肪酸結合タンパク質の役割

研究課題名(英文) Roles of fatty acids and fatty acid-binding proteins (FABP) in cartilage resorption

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス骨端板の骨軟骨境界部に存在するセプトクラストに、表皮型脂肪酸結合タンパク(E-FABP)が発現することを見出した。その突起の形態は軟骨内骨化の活動と関連することが示唆された。E-FABPはレチノイン酸とも親和性をもつが、セプトクラストはレチノイン酸の過剰や不足に対して、PPARやCD-RAPを介してアポトーシスや突起減少などの形態変化を示した。メッケル軟骨の吸収にも、セプトクラストが関与することが分かった。以上の結果から、生理的な軟骨吸収にセプトクラストは重要な役割を果たすこと、セプトクラストにE-FABPに結合する脂肪酸やレチノイン酸を介するシグナル伝達機構が存在することが解明された。

研究成果の概要(英文)：We found the expression and localization of epidermal type-fatty acid-binding protein (EFABP) in septoclasts at the osseo-chondral junction of the growth plate in mice. Morphology of the septoclastic process was associated with an activity of the endochondral ossification. As E-FABP has affinity to retinoic acid, septoclasts showed apoptosis or morphological changes via PPAR and CD-RAP against overdose or deficiency of retinoic acid. E-FABP-positive septoclasts were also involved in absorption of the Meckel's cartilage. This project revealed that septoclasts play important roles in physiological cartilage resorption and they are regulated by signaling pathways via E-FABP-binding fatty acids or retinoic acid.

研究分野：口腔解剖学・組織学・発生学

キーワード：脂肪酸結合タンパク 軟骨吸収 軟骨吸収細胞 メッケル軟骨 骨端板 セプトクラスト

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸と骨形成

摂取する食品と骨成長・改造や骨密度の問題は、骨粗鬆症の発症頻度の関係から種々の疫学調査や動物実験的手法により研究がなされてきた。特に魚類や魚油食品に豊富に含まれる EPA (エイコサペンタエン酸) や DHA (ドコサヘキサエン酸) などは体内でカルシウム濃度を増大させ、カルシウムを体内に蓄積し、かつ骨強度を改善すると考えられている。EPA や DHA は n-3 系の長鎖不飽和脂肪酸で、水に不溶性の長鎖脂肪酸が細胞内で作用するには、脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid binding protein, FABP) と結合することにより細胞内への取り込みと輸送が可能になる。

脂肪酸結合タンパク質と骨組織

脂肪酸結合タンパク (FABP) は水に不溶性な長鎖脂肪酸と結合し、可溶化する一群のタンパク質で、脂肪酸の細胞内への取り込み調節、脂肪酸の細胞質内輸送および脂質の代謝に関与している (Owada et al. 2006)。n-3 系長鎖不飽和脂肪酸は表皮型 FABP (E-FABP, FABP5) と脳型 FABP (B-FABP, FABP7) と高い親和性をもつと報告されている (Owada et al. 2006) ことから、しかし、骨組織における E-FABP と B-FABP の局在や役割は明らかでない。また、E-FABP は骨代謝に関わるレチノイン酸とも結合することが最近わかった (Schung et al. 2007)。

申請者は前年度までの科研費 (基盤 C 23592710, 天野 修: メッケル軟骨の消失機構とその意義) の実験過程で、マウス胎仔メッケル軟骨を吸収する破軟骨細胞に B-FABP が局在することを見出した。さらに骨・軟骨組織全般における FABP の局在を免疫組織化学的に検索したところ、マウス骨端板軟骨に強い E-FABP 免疫活性を発現する単核で突起を有する細胞を多数見出した。また、破軟骨細胞と破骨細胞にも B-FABP の強い発現が確認された (下図)。



左から B-FABP, TRAP, E-FABP, cathepsin B

E-FABP は骨端板軟骨の骨軟骨境界に規則的に配列し、細い突起を軟骨基質に伸ばしているのが確認された。Lee らによって septoclast (セプトクラスト, 軟骨横隔吸収細胞) と命名された単核の軟骨吸収細胞であることが示唆された。また、周囲の破骨細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞またはマクロファージとは異なる細胞であることが、予備実験で確認された (Bando, Amano, et al. 2nd IADR-Asia Pacific Region, Bangkok, Thailand

2013)。

FABP の軟骨吸収における役割

Septoclast は非石灰化軟骨基質を吸収することが示唆されており、石灰化した軟骨基質や骨基質を吸収する破軟骨・破骨細胞と役割を分担していると推測されるが、両者が異なる FABP を発現していることから、異なる脂肪酸を利用してエネルギー代謝をおこなっていると推測される。

2. 研究の目的

本研究では、硬組織における脂肪酸代謝の機序を、特に E-FABP を発現し、脂肪酸代謝との関連が全く不明で、かつ研究実績が非常に少ない septoclast の役割に焦点を当てて解明する。E-FABP が n-3 系脂肪酸の他に骨端板に豊富に含まれるレチノイン酸とも結合するため、レチノイン酸 (RA) 摂取異常マウスの septoclast の形態変化を解析し、その原因からシグナル伝達機構を解明する。

レチノイン酸は①E-FABP または②RA 受容体である CRABP-II と結合し、①の場合は細胞の生存や増殖に、②の場合は細胞死や増殖抑制に働くと報告されている (Schung et al. 2007)。

以上のことから、「食食された軟骨基質中の RA は、E-FABP と結合し、septoclast の生存や増殖活性を調整する」との仮説を立て、これを検証する。

3. 研究の方法

共通手技

- ・全ての実験系には ddY マウスを使用する。
- ・下記の実験系のマウスの、脛骨頭の骨端板と胎仔のメッケル軟骨を試料として

(1) B-FABP および E-FABP の免疫陽性細胞の分布と形態を詳細に観察・解析する。

抗 B-FABP 抗体および抗 E-FABP 抗体は作製した東北大学大学院医学研究科大和田教授より供与を受け、既に予備実験・他研究においてその特異性や本研究への有効性を確認済みである。

(2) レーザー走査型顕微鏡を用いた三次元的微細形態の解析とその変動の解析

特に、septoclast の位置、突起の数と長さ、突起の先端部位についての詳細な観察と比較を行う。

(3) 電子顕微鏡を用いた、軟骨基質部位の超微構造の解析

septoclast は突起の先端部に小規模な微絨毛を持ち、軟骨基質と接しているため、その形態を中心に詳細な観察を行う。特に突起の発達程度は正常と実験群とを比較する。

(4) マイクロダイセクションによる局所的な

遺伝子発現の解析

septoclast が局在する骨軟骨境界部と破骨細胞が密集する骨梁部を切り出し、mRNA の発現を RY-PCR 法を用いて検出する。また、その発現程度を比較する。

解析項目

(1) 胎生期発生過程の解析

脛骨の骨髓腔および顎骨の膜性骨化が観察できる胎齢 13 日以降の胎仔の組織を解析する。FABP 陽性細胞の出現する部位、数、形態的な特徴（成獣での所見との比較）を解析する。

(2) 生後発生・加齢過程の解析

骨成長期間と成長終了後の結果の比較を行う。E-FABP 陽性 septoclast の配列の変化と、軟骨吸収部位での配置の関係に注目して解析する。また、マイクロダイセクション法により、組織レベルでの遺伝子発現の変動を RT-PCR 法で解析する。

(3) FABP ノックアウトマウスの解析

特に、膜性骨化と軟骨内骨化組織の形態異常の有無、破骨細胞と septoclast の分布について詳細に検索する。ノックアウトマウスの組織試料は共同研究を行っている山口大学医学研究科徳田信子教授より固定済み組織の供与を受ける。

(4) レチノイン酸・ビタミン A 異常食を与えたマウスの解析

仮説：食 E-FABP は、脂肪酸だけではなくレチノイン酸 (RA) とも結合性があり、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ を介するレチノイン酸シグナル伝達に関与し、細胞増殖を誘導すると考えられている。食された軟骨基質中の RA は、E-FABP と結合し、septoclast の生存や増殖活性を調整する

最初に PPAR (RA 核内受容体) の各サブタイプ (PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ) の局在を調べる。E-FABP と結合する PPAR β/δ が septoclast に局在した場合、本仮説が正しい可能性があるため、さらに

①4 週齢マウスにレチノイン酸 300mg/Kg を soybean oil 200 μ l に希釈して経口強制投与し、48 時間後固定する。対照群には soybean oil 200 μ l を同様に投与する。

②ビタミン A 欠乏粉末餌を離乳後から摂取させ、6 週間飼育する。対照群には実験群に摂取させた餌にビタミン A 成分を添加したものを摂取させる。

(5) n-3 系脂肪酸欠乏食を与えたマウスの解析

n-3 系脂肪酸欠乏マウスは、離乳後に同脂肪酸欠乏食 (原馬 2013) を与えて作製し、次世代の雄マウスを解析する。

(6) 粉末食・流動食を与えたマウスの顎骨の解

析

咀嚼圧を除いた状態で飼育すると、顎骨の劣成長が生じるので、下顎頭軟骨における B-FABP および E-FABP 陽性細胞の分布と、下顎頭軟骨異常との関連を解析する。

(7) 組織計測

*細胞数・サイズ、突起の数・長さに変化が認められた場合は、組織計測を行い、統計学的解析を行う。

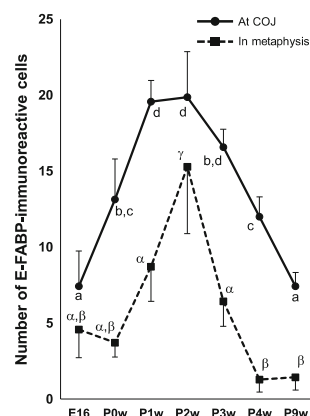
4. 研究成果

(1) 骨端板 septoclast の生後発生と形態変化

個体発生過程では、E-FABP 免疫陽性 septoclast は一次骨化中心の形成直後から、骨軟骨境界部 (COJ) の他に、COJ 近傍の骨化帯にも散在するのが観察された。単位領域当たりの細胞数は、生後 1~2 週齢まで増加し、その後徐々に減少した。E-FABP 免疫陽性 septoclast は、生後 3~4 週齢より後、最終的に COJ に収束した (下グラフ)。

この結果は、septoclast が骨髓腔から骨端板に移動・収束すること、また軟骨内骨化の活動と septoclast の数の変化が関連することが強く示唆された。

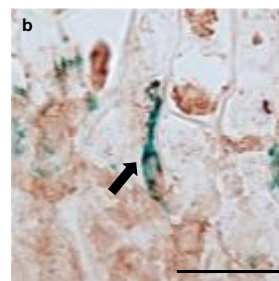
その結果から、さらに胎生期に遡って詳細に E-FABP 陽性細胞の起源とその変化を調べる必要性が示唆された。



(2) septoclast における E-FABP のシグナル伝達系の解析

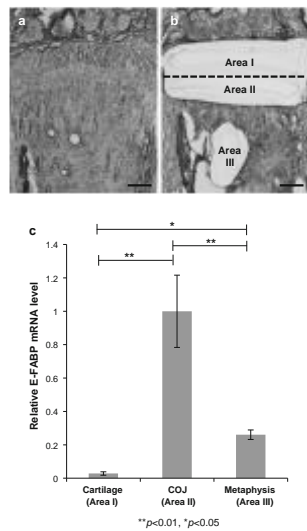
FABP の転写シグナルに関わる peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ の免疫活性が E-FABP 免疫陽性 septoclast に検出された (右図)。

この結果は、n-3 系脂肪酸が septoclast に摂取され、E-FABP を介して、ミトコンドリアや、PPAR β/δ が転写調節に機能的役割を果たす核を含む標的に細胞内輸送されることを強く示唆した。



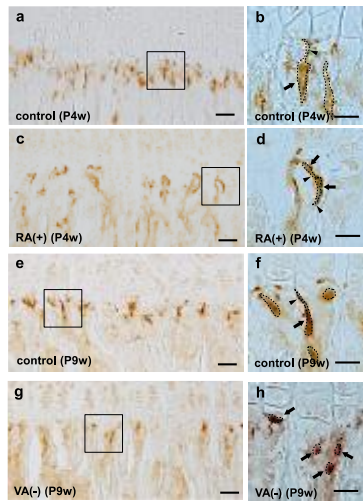
(3) 骨端板における E-FABP の遺伝子発現

マイクロディセクション法と RT-PCR の組合せにより、同部に顕著な E-FABP の mRNA の増幅が認められた (右図とグラフ)。骨髄や軟骨部では、同遺伝子の発現は非常に低いことから、E-FABP は骨軟骨境界部に局限して強く発現し、これが同部に局在する septoclast に由来することが強く示唆された。

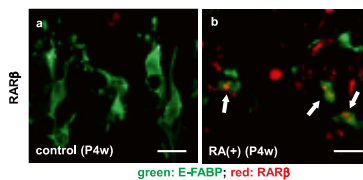


(4) レチノイン酸による septoclast の調節機構

RA 欠乏 (ビタミン A 欠乏) で septoclast に細胞増殖抑制と形態変化 (右図) の誘導因子である cartilage-derived retinoic acid sensitive protein (CD-RAP) が特異的に発現した。RA 過剰で septoclast に細胞増殖の誘導因子である PPAR β の発現抑制と、アポトーシスマーカーの TUNEL 陽性反応, RA によるアポトーシス誘導を介する RAR β の局在が認められた (下図)。



本研究結果から、RA 欠乏・過剰における septoclast の細胞増殖抑制と形態変化は、PPAR β , CD-RAP, RAR β を介して引き起こされることが示唆された。



(5) E-FABP ノックアウトマウスにおける septoclast の解析

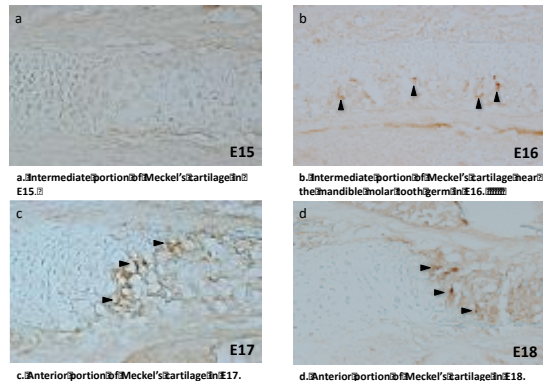
正常 (WT), ノックアウト (KO) とともに脛骨骨端板 COJ において、cathepsin B 免疫陽性 septoclast が観察された。共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元再構築画像の結果から、WT の septoclast は細胞体が紡錘形で突起が骨端板に伸びていたが、KO の septoclast は

細胞体が丸みを帯び、突起が短小化していた。これらの形態変化から septoclast の軟骨吸収能の低下が示唆された。cathepsin B 免疫陽性 septoclast における 3 つの PPAR のサブタイプの免疫活性を調べたところ、PPAR α は KO のみに検出された。PPAR α は遊離脂肪酸により活性化され、 β 酸化に関与する遺伝子が調節される。PPAR β/δ は WT, KO とともに検出されたが、PPAR γ は WT, KO とともに検出されなかった。これらの結果から、FABP5 ノックアウトマウスの septoclast には、E-FABP の代替となる長鎖脂肪酸またはレチノイン酸輸送タンパクが発現し PPAR α , PPAR β/δ を介した作用により機能維持に関与することが示唆された。

本研究の結果により、septoclast に E-FABP が欠乏すると septoclast の機能低下が示唆されることから、E-FABP が septoclast の形態および機能維持に必須であることが分かった。

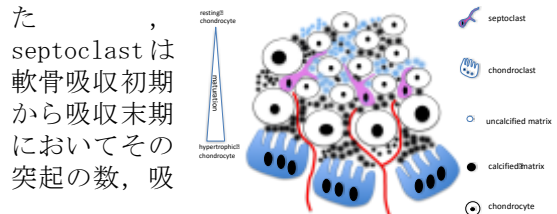
(6) メッケル軟骨の septoclast

E-FABP 免疫陽性 septoclast は E16 の切歯歯胚に面するメッケル軟骨中間部の吸収面に初めて認められ、さらに E17 で吸収が進行するとその数が増加した。また E18 で吸収がより進行すると、ほとんど認められなくなった (下図)。



また von Kossa 陽性の石灰化部位に septoclast は存在しなかった。また、隣接切片において F4/80 陽性マクロファージは認められず、TRAP 陽性破骨細胞は septoclast よりやや後方に存在していた。三次元的形態解析では、septoclast は紡錘形の細胞体から伸びた数本の突起をもっていたが、突起をもたないタイプや扁平な細胞体のタイプ等も認められた。

septoclast は破骨細胞に先行しメッケル軟骨の未石灰化軟骨基質を吸収し、その後方で破骨細胞が石灰化軟骨基質を吸収することで軟骨組織の吸収に関与していると考えられた (下図)。また



収面に沿った細胞数の変化が認められることから septoclast の数や形態は軟骨吸収活性と関連することが示唆された。

(7) 流動食・粉末食による影響

本研究課題と直接関係する結果は現在解析途中で、今後発表の予定であるが、咽頭喉頭筋における骨格筋に発現する心筋型 FABP (H-FABP) の発現について興味深い知見が得られ、論文発表を行った (横塚他 2016)。

(8) 脂肪酸欠乏食摂取動物・加齢動物における変化

試料作製に時間を要した結果、試料自体は作成できたが、結論に到る十分な例数の結果を得ておらず、実験継続中である。

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, Sakashita H, Taira F, Miyake G, Iseki S, Owada Y, Amano O. : Retinoic acid regulates cell-shape and -death of E-FABP (FABP5)-immunoreactive septoclasts in the growth plate cartilage of mice. *Histochem Cell Biol*. 2017. doi:10.1007/s00418-017-1578-0. PMID: 28500502
- ② Sakagami H, Okudaira N, Masuda Y, Amano O, Yokose S, Kanda Y, Suguro M, Natori T, Oizumi H, Oizumi T. : Induction of Apoptosis in Human Oral Keratinocyte by Doxorubicin. *Anticancer Res*. 37(3):1023-1029, 2017. PMID: 28314260
- ③ Kawabe Y, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K, Taira F, Tomomura A, Araki H, Amano O. : Morphological Changes of Myoepithelial Cells in the Rat Submandibular Gland Following the Application of Surgical Stimuli. *Acta Histochem Cytochem*. 49(6):159-169, 2016. doi: 10.1267/ahc.16017. PMID: 28127104
- ④ 天野 修 : 第三の手・舌. *小児保健研究* 75(6): 706-710, 2016. <https://www.jschild.med-all.net/resource/private/cx3child/2016/007506/009/0706-0710.pdf>
- ⑤ 天野 修, 坂東康彦, 崎山浩司 : 舌の不思議 *小児歯科臨床* 21(12):18-26, 2016. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjFscqayr_UAhUHF5QKHVt-By8QFghDMAY&url=http%3A%2F%2Fwww.jspp.net%2Fpdf%2F2016-12.pdf&usg=AFQjCNGsGg3g-kyQU_IVvnXLkBWaU5oMcw&sig2=vRL4bH3n9R0n581CPI-tJQ
- ⑥ Rodríguez-Vázquez JF, Sakiyama K, Abe H, Amano O, Murakami G. : Fetal Tendinous Connection Between the Tensor Tympani and Tensor Veli Palatini Muscles: A Single Digastric Muscle Acting for Morphogenesis of the Cranial Base. *Anat Rec (Hoboken)*. 2016 Apr;299(4):474-83. doi: 10.1002/ar.23310. PMID: 26744237
- ⑦ Inoue K, Bando Y, Sakiyama K, Takizawa S, Sakashita H, Kondo H, Amano O. : Development and regression of the thyroglossal duct in mice. *Ann Anat*. 2015 Jul;200:54-65. doi: 10.1016/j.aanat.2015.01.005.
- ⑧ 横塚裕二, 重松久夫, 坂東康彦, 崎山浩司, 天野 修, 坂下英明 : マウス咽頭・喉頭筋における心筋型脂肪酸結合タンパクの局在. *小児口腔外科* 25:126-139, 2015. <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cb2syone/2015/002503/002&name=0126-0139j&UserID=210.151.68.8>
- ⑨ Tokunaga H, Bando Y, Sakiyama K, Amano O. : Localization and roles of hepatocyte growth factor (HGF) in development and disappearance of mouse Meckel's cartilage. *J Meikai Dent Med*. 2015;44(1): 74-86. <http://www.dent.meikai.ac.jp/media/index.html>
- ⑩ 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*. 45(5):507-518, 2014. doi: 10.1007/s10735-014-9576-1.
- ⑪ Mizobe K, Kawabe Y, Bando Y, Sakiyama K, Araki H, Amano O. : Localization of hsp27 in the rat submandibular gland following the application of various surgical treatments. *Acta*

Histochem Cytochem. 47(6):255-64, 2014. doi: 10.1267/ahc.14037.

- ⑫ Yamada T, Sasaki A, Band Y, Sakiyama K, Suda N, Kanegae H, Amano O. : Immunolocalization of heat shock protein 25 (Hsp25) in developing secondary plate of mouse embryos. Ped Oral Maxillofac Surg. 24(1): 27-37, 2014.
https://www.js-age.jst.go.jp/browse/poms/-char/ja/

[学会発表] (計 14 件)

- ① 坂下 英, 坂東康彦, 崎山浩司, 坂下英明, 天野 修: マウスメッセル軟骨における低酸素誘導因子 HIF-1 α の発現と低酸素器官培養の影響. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 29 年 3 月 29 日, 長崎県長崎市
- ② 坂東康彦, 坂下 英, 崎山浩司, 大和田祐二, 天野 修: マウス骨端板における septoclast の発生と由来. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 29 年 3 月 30 日, 長崎県長崎市
- ③ 坂下 英, 坂東康彦, 崎山浩司, 坂下英明, 天野 修: マウス胎仔メッセル軟骨における低酸素誘導因子 (HIF-1 α) の局在と低酸素器官培養の影響. 第 53 回 日本口腔組織培養学会学術大会, 平成 28 年 11 月 18 日, 石川県金沢市
- ④ 天野 修: 解剖学者メッセル一族とメッセル軟骨. 第 44 回日本歯科医史学会学術大会, 平成 28 年 10 月 30 日, 東京都文京区
- ⑤ 坂東康彦, 坂下 英, 崎山浩司, 天野 修: レチノイン酸過剰・欠乏における septoclast の形態変化と増殖抑制のメカニズム. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 28 年 8 月 26 日, 北海道札幌市
- ⑥ 坂下 英, 坂東康彦, 崎山浩司, 天野 修: マウスメッセル軟骨におけるセプトクラストの局在. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 28 年 8 月 25 日, 北海道札幌市
- ⑦ 坂東康彦, 坂下 英, 崎山浩司, 山本美由紀, 井関尚一, 大和田祐二, 天野 修: マウス骨端板の septoclast におけるレチノイン酸欠乏・過剰による増殖抑制と形態変化. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 28 年 3 月 29 日,

福島県郡山市

- ⑧ 坂下 英, 坂東康彦, 崎山浩司, 大和田祐二, 天野 修: マウスメッセル軟骨におけるセプトクラストの分布と形態変化. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 平成 28 年 3 月 29 日, 福島県郡山市
- ⑨ 坂下 英, 坂東康彦, 平良芙蓉子, 崎山浩司, 天野 修: マウスメッセル軟骨におけるセプトクラストの局在と三次元的形態. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 平成 27 年 9 月 12 日, 新潟県新潟市
- ⑩ 坂東康彦, 坂下 英, 崎山浩司, 天野 修: レチノイン酸欠乏・過剰による septoclast の増殖抑制と形態変化の誘導. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 平成 27 年 9 月 12 日, 新潟県新潟市
- ⑪ 坂東康彦, 川邊好弘, 坂下 英, 崎山浩司, 山本美由紀, 井関尚一, 大和田祐二, 天野 修: マウス骨端板の septoclast におけるレチノイン酸過剰・欠乏の影響. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 27 年 3 月 22 日, 兵庫県神戸市
- ⑫ 坂下 英, 坂東康彦, 崎山浩司, 川邊好弘, 大和田祐二, 坂下英明, 天野 修: マウスメッセル軟骨における E-FABP の免疫組織学的局在. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 27 年 3 月 22 日, 兵庫県神戸市
- ⑬ Bando Y, Sakiyama K, Amano O. : Localization of epidermal-type fatty acid-binding protein (E-FABP) in the growth plate cartilage of mice. International Anatomical Sciences and Cell Biology Conference 2014, 平成 26 年 12 月 11 日, 花蓮, 台湾
- ⑭ 坂東康彦, 坂下 英, 崎山浩司, 天野 修: ビタミン A・レチノイン酸の過剰・欠乏がマウス成長板軟骨の septoclast に及ぼす影響. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 平成 26 年 9 月 27 日, 福岡県福岡市

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: 60193025