

令和元年5月23日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11457

研究課題名(和文)単核軟骨吸収細胞septoclastにおける脂肪酸・レチノイン酸代謝の意義

研究課題名(英文)Significance of fatty acid- and retinoic acid- metabolism in septoclasts - mononuclear cartilage phagocytes

研究代表者

坂東 康彦 (Bando, Yasuhiko)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：80735548

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)：septoclastは骨端板軟骨境界において表皮型脂肪酸結合タンパク(E-FABP)を発現し軟骨吸収に関与する。本研究において、レチノイン酸の過剰・欠乏マウスのseptoclastに軟骨吸収能の低下を示唆するアポトーシスや形態変化が生じることを見出した。レチノイン酸過剰における変化にはPPARbeta/delta、CRABP2、RARbetaが、欠乏ではCD-RAPが介することが分かった。この結果から、骨端板軟骨吸収に伴いseptoclastに吸収された骨端板内在性のレチノイン酸は、親和性のあるE-FABPを介してseptoclastの軟骨吸収の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果はBando et al. Histochem. Cell Biol. (2017) 148:229-238で公表された。本研究では、これまでほとんど報告されていない、軟骨内骨化における骨端板軟骨吸収細胞のseptoclastの解析を行った。レチノイン酸の摂取とseptoclastの軟骨吸収能の関係が明らかになることによって、ビタミンA栄養異常と長管骨劣成長の原因解明の一助になることが期待できる。また、主に骨芽細胞と破骨細胞の相互作用という観点から研究されてきた軟骨内骨化の過程を、septoclastの関与という新たな細胞を含めた視点から解析することが今後期待できる。

研究成果の概要(英文)：Epidermal-type fatty acid binding protein (E-FABP) is expressed in septoclasts which are involved in uncalcified cartilage matrices in the chondro-osseous junction of the growth plate.

In this study we revealed that apoptoses or morphological changes representing reduction in cartilage resorption are induced in septoclasts of mice under excessive or deficient retinoic acid condition. Changes under retinoic acid-excess were mediated by PPARbeta/delta, CRABP-II and RARbeta, and morphological changes under retinoic acid-deficiency were mediated by CD-RAP. These results suggest that abundant endogenous retinoic acids in growth plate plays important role in the maintenance of cartilage resorption of septoclasts mediated by E-FABP which has high affinity to retinoic acid.

研究分野：口腔解剖学・口腔組織発生学

キーワード：septoclast 表皮型脂肪酸結合タンパク 脂肪酸代謝 レチノイン酸代謝 軟骨内骨化 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1). 疫学的調査および動物実験を用いた研究により、DHA(ドコサヘキサエン酸)などの n-3 系長鎖不飽和脂肪酸の適量の摂取は、骨のミネラル成分の維持に必須であり、骨粗鬆症の予防となる。またビタミン A およびその誘導体であるレチノイン酸の過剰や欠乏状態ではともに長管骨の劣成長が起こる。骨端板軟骨には様々なタイプの長鎖脂肪酸が豊富に蓄えられているが(Havivi and Bernstein 1969)、蓄積された長鎖脂肪酸の軟骨内骨化における意義については未解明である。
- (2). 疎水性の長鎖脂肪酸は細胞内にとり込まれると脂肪酸結合タンパク(fatty acid-binding protein, FABP)と結合し可溶化され輸送される。長鎖不飽和脂肪酸はミトコンドリアに輸送され代謝によるエネルギー産生が行われたり、核内に輸送され核内レセプター(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) のリガンドとなり遺伝子発現の調節に關与する (Owada et al. 2006)。
- (3). 骨組織における FABP の局在は不明であったが、申請者らは、成獣マウス骨端板直下の骨軟骨境界において、軟骨吸収細胞である septoclast に、(i) 長鎖不飽和脂肪酸とレチノイン酸に共通して親和性を持つ表皮型 FABP(E-FABP)を特異的に発現していること、(ii) E-FABP に親和性が高く細胞分化増殖を誘導する作用のある PPAR / (Schug et al. 2007) を発現することを見出した(Bando Y et al. 2014)。

2. 研究の目的

本研究では、これらの栄養状態の変化が septoclast に与える影響を詳細に検索することで、脂肪酸・レチノイン酸摂取と軟骨基質、特に未石灰化基質の吸収との関係を、septoclast の構造・機能変化の観点から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

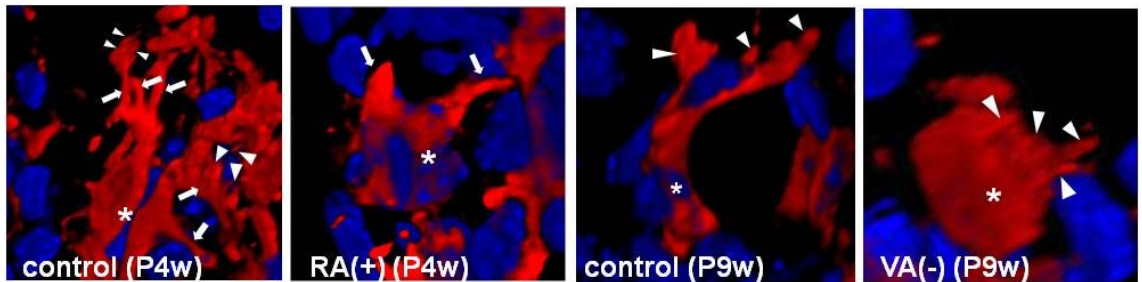
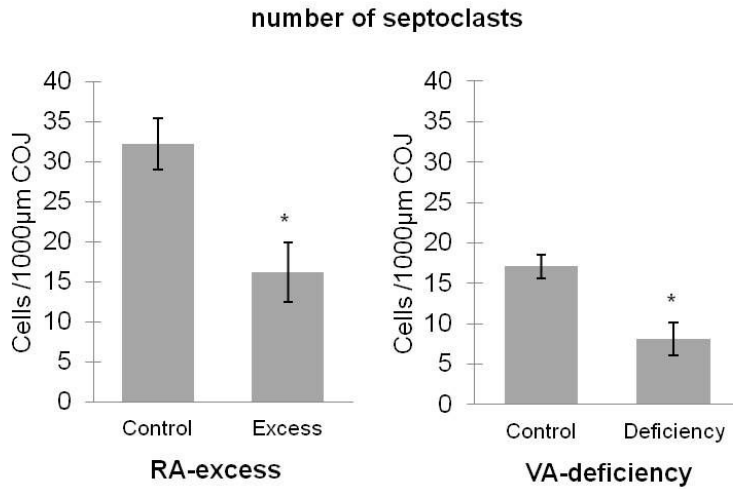
- (1). n-3 系不飽和脂肪酸過剰投与・欠損餌摂食、レチノイン酸過剰投与・欠損餌摂食の栄養条件下にあるマウスおよびそのコントロールマウスを作成する。
- (2). 脛骨近位骨端板凍結組織切片を作製し、細胞の局在および形態学的解析 核内レセプターの発現の解析 分化増殖機構、アポトーシス誘導の解析を E-FABP を septoclast の指標にして、免疫組織化学的手法、三次元画像構築法、免疫電顕法、生化学的(タンパク、遺伝子レベル)手法により行い、コントロールの結果と比較検討する。

4. 研究成果

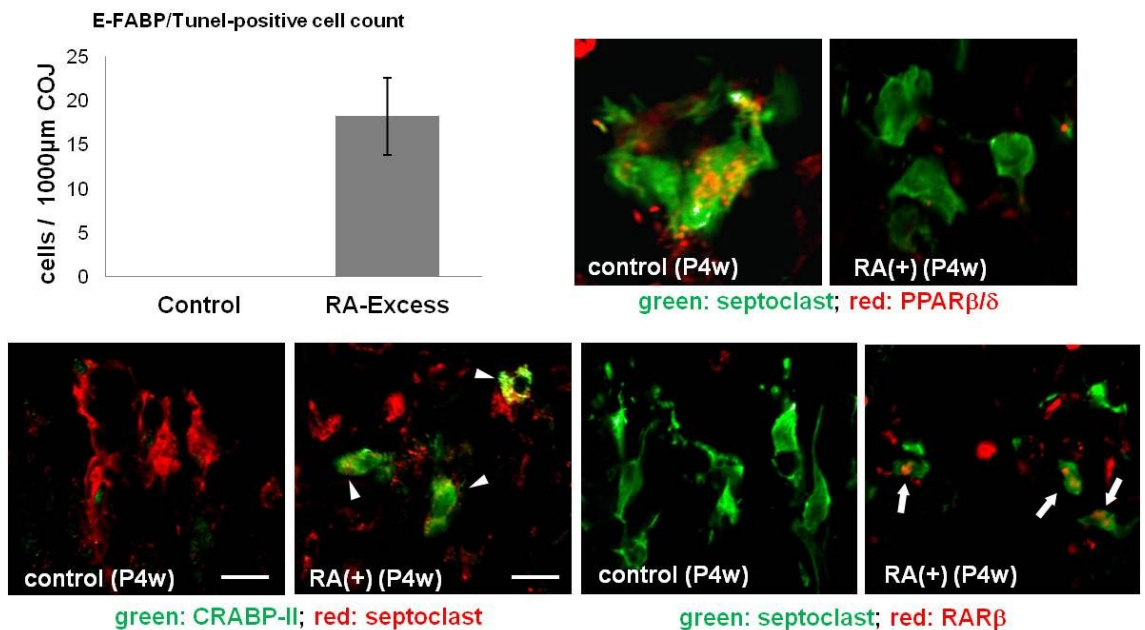
- (1). septoclast における脂肪酸・レチノイン酸摂取が軟骨吸収に及ぼす影響

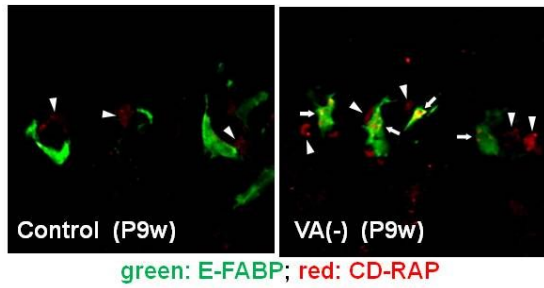
レチノイン酸過剰投与マウス(4週齢でレチノイン酸 300mg/kgW を soybean oil に希釈後麻酔下で経口強制投与し、2日後固定処置を行ったもの)とビタミン A 欠乏餌摂食マウス(ビタミン A 欠損粉末餌(コントロール食からビタミン A 成分を抜いたもの)を離乳直後から 9 週齢になるまで摂食させたもの)を作製し、脛骨骨端板領域の septoclast の解析を行った。その結果、レチノイン酸過剰投与マウス、ビタミン A 欠乏餌摂食マウスともに骨端板の菲薄がみられた。ビタミン A 欠乏餌摂食マウスともに septoclast の数の減少がみられた。septoclast は細長い突起を骨端板非石灰化軟骨基質に接触させ、有機質分解酵素で融解してこれを吸収すると考えられているが、レチノイン酸過剰投与マウス、ビタミン A 欠乏餌摂食マウスともに septoclast の突起の短小化・消失などの形態変化がみられ、軟骨

吸収機能の低下が示唆された。



レチノイン酸過剰投与マウスでは septoclast に PPAR / の消失と TUNEL 陽性反応、CRABP-II と RAR の発現がみられ、septoclast 数の減少と形態変化が、PPAR / の消失による影響と、CRABP-II と RAR を介するアポトーシス誘導によることが示唆された。ビタミン A 欠乏餌摂取マウスでは、septoclast にレチノイン酸低濃度条件下で細胞の増殖抑制と丸みを帯びる形態変化を誘導する cartilage derived retinoic acid sensitive protein (CD-RAP) の発現がみられ、septoclast 数の減少と形態変化が CD-RAP の発現により誘導されたことが示唆された。

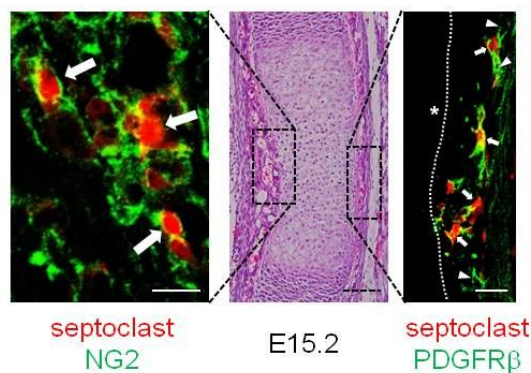
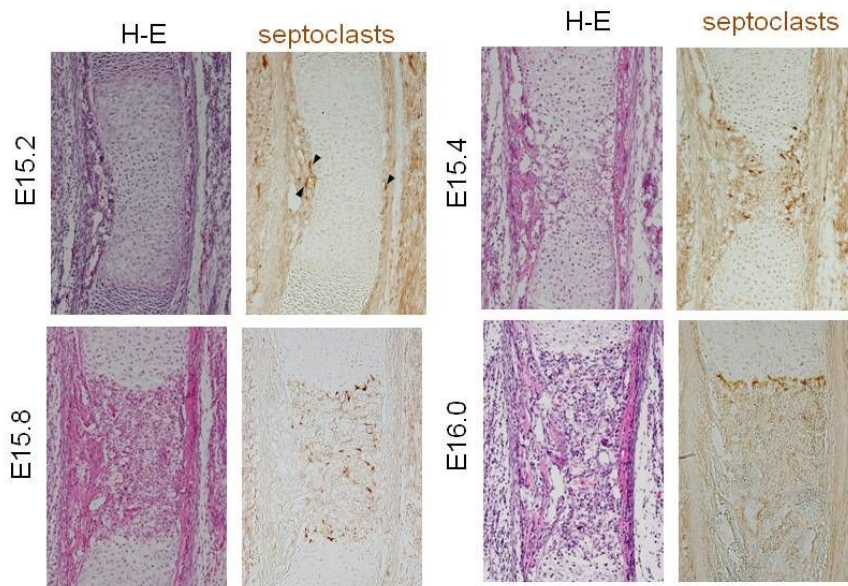




以上の結果から、septoclast に骨端板軟骨に豊富に含まれるレチノイン酸が septoclast の骨端板軟骨吸収に伴って取り込まれると E-FABP と PPAR / を介するレチノイン酸シグナル伝達系が誘導され、septoclast の軟骨吸収機能のための形態維持に役立っていることが示唆された。以上の成果を Bando et al. *Histochem. Cell Biol.* (2017) 148:229-238 に公表した。

(2). septoclast の由来と発生

septoclast における E-FABP の脂肪酸・レチノイン酸摂取の影響を発生過程において解析する一環として、正常マウス脛骨近位骨端板における septoclast の発生を解析した。その結果、E-FABP 陽性 septoclast は胎生 15 日 (E15) に脛骨軟骨原基中央部軟骨膜付近に出現した。原基軟骨内へ侵入する血管とともに軟骨表面に移動し、一次骨化中心完成時には、骨端板直下の骨軟骨境界に局在した。septoclast の形態は、発生初期は丸みを帯び、一次骨化中心が完成する E16 には成獣マウスでみられる紡錘形の細胞体に細長い突起を骨端板軟骨に伸ばす形態に成長した。septoclast には発生最初から生後に至るまで、常に PDGFR β または NG2 の免疫活性が共存した。



以上の結果から、septoclast は pericyte から分化して E-FABP を発現することが分かった。septoclast は一次骨化中心の形成の際、血管の侵入に関与していることが示唆された。以上の成果を Bando et al. Histochem. Cell Biol. (2018) 149:645-654 に公表した。

(3). septoclast における脂肪細胞型 FABP (A-FABP, FABP4) の発現

E-FABP 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析を行った結果、E-FABP を発現する septoclast の一部が A-FABP も発現し、E-FABP-KO マウスで A-FABP 陽性 septoclast が増加し、E-FABP の欠損による septoclast の軟骨吸収機能の低下が代償された。この結果について歯科基礎医学会学術大会(福岡, 2018)で発表を行った。この結果をふまえ、引き続き科学研究費課題「septoclast の軟骨吸収における異なる脂肪酸結合タンパク発現の意義」(19K18949)を遂行していく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Bando Y, Sakashita H, Taira F, Miyake G, Ogasawara Y, Sakiyama K, Owada Y, Amano O: Origin and development of septoclasts in endochondral ossification of mice. Histochem. Cell Biol. (2018) 149:645-654, DOI: 10.1007/s00418-018-1653-1 査読有

Takizawa S, Sakiyama K, Bando Y, Inoue K, Sakashita H, Ogasawara Y, Amano O, Sakashita H: Influence of high mobility group box 1 (HMGB1) derived from SCC7 cells on mouse normal tongue muscle fibers. J. Oral Maxillofac. Surg. Med. Pathol. (2018) 30: 466-474, DOI: org/10.1016/j.ajoms.2018.03.001 査読有

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) 148:229-238, DOI: 10.1007/s00418-017-1578-0 査読有

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. (2016) 49: 159-169, DOI: 10.1267/ahc.16017 査読有

天野修, 坂東康彦, 崎山浩司: 舌の不思議. 小児歯科臨床 (2016) 21(12): 18-26, <https://torin.co.jp/archives/989> 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

坂東康彦, 坂下英, 崎山浩司, 徳田信子, 天野修: 軟骨吸収細胞 septoclast における脂肪酸結合タンパクの発現と役割, 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 31 年 3 月, 新潟県新潟市

坂東康彦, 崎山浩司, 天野修: A-FABP を発現する E-FABP 陽性 septoclast と E-FABP 欠損の影響, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 30 年 9 月, 福岡県福岡市

坂東康彦, 坂下英, 崎山浩司, 徳田信子, 大和田祐二, 天野修: FABP5-KO マウスにおける septoclast の形態変化と PPAR サブタイプの局在, 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 30 年 3 月, 東京都武蔵野市

坂下英, 坂東康彦, 崎山浩司, 大和田祐二, 天野修: メッケル軟骨消失過程におけるセプトクラストの分布と形態の時間的变化, 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 30 年 3 月, 東京都武蔵野市

天野修, 坂下英, 坂東康彦, 崎山浩司: メッケル軟骨の発生・消失から考える顔面発生, 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 30 年 3 月, 東京都武蔵野市

徳田信子, 山本由似, 児玉孝憲, 徳田和央, 木村和博, 坂東康彦, 天野修, 宮崎啓史, 大和田祐二: Fibroblastic Reticular Cells(FRC)における FABP7 の局在と機能, 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 平成 30 年 3 月, 東京都武蔵野市

坂東康彦: 骨端板軟骨吸収細胞 septoclast における表皮型脂肪酸結合タンパク(E-FABP)の機能的役割の解析, 第 32 回明海歯科医学会, 平成 29 年 9 月, 埼玉県坂戸市

坂東康彦, 坂下英, 崎山浩司, 天野修: マウス脛骨の発生における septoclast の由来と分化, 平成 29 年 9 月, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 長野県塩尻市

坂下英, 坂東康彦, 崎山浩司, 天野修: マウス Meckel 軟骨における低酸素・オートファジー関連因子の局在と低酸素培養の影響, 平成 29 年 9 月, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 長野県塩尻市

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, 長崎県長崎市

坂下英, 坂東康彦, 崎山浩司, 坂下英明, 天野修: マウスメッケ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, 長崎県長崎市

坂下英, 坂東康彦, 崎山浩司, 坂下英明, 天野修: マウス胎仔 Meckel 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・総会, 平成 28 年 11 月, 石川県金沢市

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, 平成 28 年 9 月, 第 58 歯科基礎医学会学術大会, 北海道札幌市

坂下英, 坂東康彦, 崎山浩司, 天野修: マウスメッケル軟骨におけるセプトクラストの局在, 平成 28 年 9 月, 第 58 歯科基礎医学会学術大会, 北海道札幌市

〔その他〕

ホームページ等

明海大学歯学部中央研究部 <http://www.meikai.ac.jp/dent/kenkyubu.html>