

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11626

研究課題名(和文) 鰓弓軟骨の発生、成長、消失、骨化における低酸素環境と脂肪酸による調節機構の解明

研究課題名(英文) Regurational mechanisms by hypoxia and fatty acids in development, growth, regression and ossification of the branchial cartilage

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎児の第1鰓弓軟骨であるMeckel軟骨では、初期では軟骨中心部に低酸素誘導因子であるHIF-1の発現が認められる一方、軟骨膜に近い部位には認められなかった。低酸素環境下での培養胎仔下顎は対照群と比較して小さく、軟骨細胞の分化と肥大化が抑制された。また、肥大軟骨細胞の出現と同時に、骨膜下に表皮型脂肪酸結合タンパク質(E-FABP)を発現するセプトクラストが出現して未石灰化軟骨基質を吸収することが明らかになった。セプトクラストは骨芽細胞様の破軟骨細胞と局在と役割を分担し、Meckel軟骨の出生前の消失に寄与することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児下顎のメッケル軟骨はもともとは下顎骨の原基であったが、哺乳類以降は新たな下顎骨の出現により一部を除いて不要となり、大部分は出生前に消失する。しかしその遺残は生後の下顎骨や顎顔面の異常を来すことから、出生前までの急速な消失が正常な顎顔面形態形成には必要である。今課題の実施により、長管骨の軟骨内骨化に見られるセプトクラストがメッケル軟骨の吸収面に出現して、破骨細胞と役割分担をしながら急速な軟骨吸収を行うことを明らかにした。また、吸収開始に必要な軟骨細胞の肥大化には、低酸素環境で誘導される因子の発現が関与しており、無血管組織である軟骨特有の細胞分化、吸収開始機構をもつことが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In mouse embryos, 1st branchial arch cartilage (Meckel's cartilage) expresses hypoxia-inducible factor, HIF- α , in early stage. Organ-cultured mouse embryonic mandible under hypoxic condition showed microgenia with abnormal Meckel's cartilage. Before beginning of Meckel's cartilage resorption, epidermal-type fatty acid binding protein (E-FABP)-positive septoclasts appeared and involved in resorption of uncalcified matrix of Meckel's cartilage. Septoclasts are shown to play important roles with osteoclast-like chondroclast in rapid regression of Meckel's cartilage before birth.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：鰓弓軟骨 低酸素 脂肪酸結合タンパク質 セプトクラスト 破軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔を形成する第1鰓弓に発生するメッケル軟骨は、後端部が骨化して耳小骨(ツチ骨とキヌタ骨)を形成するが、それ以外の殆どの部位は出生前に消失してしまう。消失部のうち、前半部は全く消失して下顎骨が膜性骨化により発生し、後半部は蝶下顎靭帯に転化すると考えられている。メッケル軟骨消失の生物学的意義は、主に系統発生的と進化により説明されてきた。しかし、個体発生的な意義は出生前に消失してしまうために不明である。顎顔面に形態形成異常を呈する遺伝子改変動物を用いた研究により、下顎骨の形態不全にメッケル軟骨の形態異常が伴っていることが次第に分かってきた(Amano et al. 2010で総説)。これらの情報から、メッケル軟骨の正常な発生・消失は、下顎骨の発生と顎顔面の形態形成に必須な条件であり、メッケル軟骨は石灰化を経て消失したことが示唆される。

申請者は前科研費課題(天野 23592710)において、マウス胎仔メッケル軟骨の消失過程では、一般的な組織消失で見られる細胞死のアポトーシスは生じず、むしろアポトーシスは軟骨細胞の分化過程で認められ、メッケル軟骨の正常な形態形成に必須であることを実験発生的に明らかにした(Doi, Amano et al. 2013)。

軟骨は無血管組織であり、生理的に低酸素環境に陥りやすいと考えられるが、予備実験において、低酸素環境下でマウス胎仔第1鰓弓を器官培養すると、小下顎症が誘導され、メッケル軟骨でHIF-1の発現が増強した。骨端板では石灰化に先立つ肥大軟骨細胞にHIF-1が発現することから、メッケル軟骨の細胞死、石灰化、成長抑制が低酸素環境により誘導される可能性がある。メッケル軟骨の吸収に先立って、基質の石灰化が生じるか、石灰化により軟骨細胞はより低酸素環境に置かれると考えられる。

骨端板などの軟骨内骨骨化の過程では、軟骨基質は骨芽細胞と類似した破軟骨細胞に吸収され、さらに石灰化軟骨帯から伸びた骨梁には多数の破骨細胞が認められる。現科研費課題において、骨端板軟骨では他核の破骨細胞/破軟骨細胞の他に、単核のセプトクラストが関与し、軟骨基質の吸収に関与すること、これらの細胞に特異的に表皮型(E-)または脳型(B-)の脂肪酸結合タンパク質(FABP)が発現していることを見出した(Bando et al. 2014)。FABPは骨芽細胞系には発現しないので、軟骨・骨吸収過程にはFABPと結合する脂肪酸等による調節機構が存在すると考えられる。

低酸素・低栄養下では細胞は効率的なエネルギー代謝(糖代謝と脂質代謝)を必要とする。器官培養したマウス下顎メッケル軟骨の軟骨細胞には大量のグリコーゲン顆粒が貯蔵されて、必要となる糖代謝に準備しており、脂肪酸をエネルギー源とする脂質代謝については不明である。既に申請者らは骨端板セプトクラストで、E-FABPと結合したレチノイン酸によって、PPAR / またはRARを介して細胞死や顕著な形態変化を引き起こすことを示した(坂東、天野 学会発表 2015)。

2. 研究の目的

以上に述べた背景から、胎生期に大部分が消失するとともに、靭帯への転化や骨化などの異なる運命をたどる哺乳類のメッケル軟骨において、「発生成長、肥大軟骨細胞を伴う肥大化、細胞死、基質吸収、および骨化の各過程とその移行・切替という局面において、低酸素環境下で脂肪酸とFABPを介する調節機構が存在する」との仮説を検証する。

3. 研究の方法

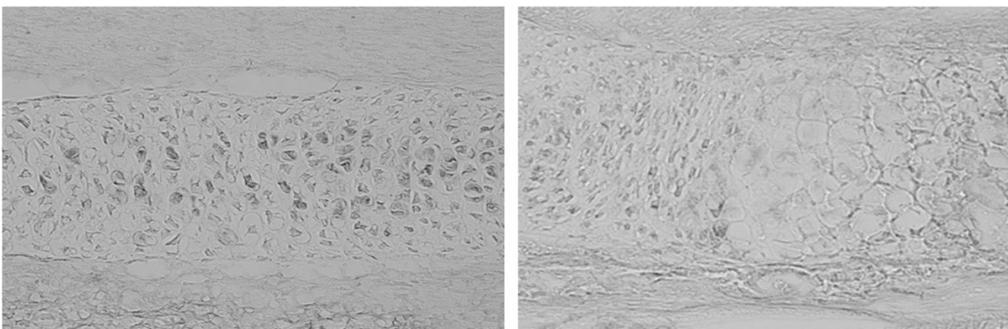
- ◆ 実験系には ddY 正常マウスと FABP ノックアウトマウスを使用した。
抗 FABP 抗体と固定されたノックアウトマウス組織は作製した東北大学大学院大和田教授より供与を受けた（抗体には検証の上、市販品も使用した）。
- ◆ 各種 FABP の分布に関する免疫組織化学的解析。
- ◆ レーザー走査型顕微鏡を用いた三次元的微細形態の解析とその変動の解析。
特に、セプトクラストの位置、突起の数と長さ、突起の先端部位についての詳細な観察と比較。
- ◆ 電子顕微鏡を用いた、軟骨基質部位の超微構造の解析。

1. 正常マウスの胎仔メッケル軟骨における FABP、HIF-1 の時間的空間的局在と変動
 - 1) 各発生段階とメッケル軟骨の部位（消失する前方部、消失し靭帯となる中間部、骨化して耳小骨となる後部）ごとに、FABP、HIF-1 陽性細胞の形態、数、細胞増殖関連因子、細胞死関連因子の発現。
2. E-FABP 陽性細胞の発現とセプトクラストの関係の解明
 - 1) マウスメッケル軟骨における E-、B-FABP 陽性細胞の時間的・位置的变化の推移の探索
 - 2) E-、B-FABP 陽性細胞の局在、数、微細形態の詳細な観察とその変化の探索
 - 3) E-FABP 陽性細胞を各種マーカーとの多重染色によりセプトクラストと同一セプトクラストのマーカーである抗 cathepsin B 抗体、dolichos biflorus agglutinin(DBA レクチン)による E-FABP との共存性の検索。
3. メッケル軟骨のセプトクラストの軟骨基質吸収機構の解明
 - 1) セプトクラストで in situ hybridization 法により E-FABP 遺伝子発現を確認
 - 2) セプトクラストが局在する吸収部の軟骨基質の石灰化の検索(未石灰化基質に接しているか否か)を石灰化関連因子と von Kossa 染色。
4. マウス胎仔第 1 鰓弓の器官培養実験：低酸素の影響
 - 1) 低酸素環境下での培養第 1 鰓弓の成長と形態の肉眼的解析
 - 2) 上記の試料に対して、HIF-1 と細胞死関連因子の発現を検索

4. 研究成果

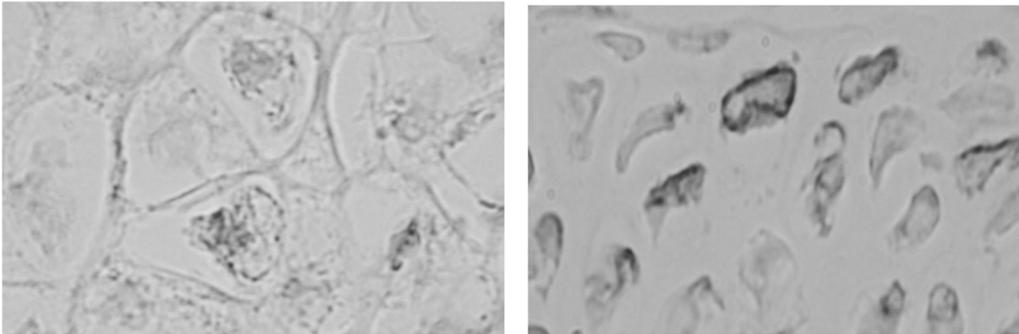
低酸素誘導因子の発現と局在

E13~14 では Meckel 軟骨中心部の軟骨細胞に HIF-1 α に対するやや弱い免疫活性が認められたが、軟骨膜に近い周辺部には認められなかった。E15~18 では小型（静止）軟骨細胞と前肥大軟骨細胞に免疫活性が認められた。



左図) E15、右図) E17

肥大軟骨細胞では、HIF-1 α 免疫活性は細胞質に弱くびまん性に認められるのに対し、小型の静止軟骨細胞では、細胞膜直下の細胞質に強く局在した。



左図) E16 肥大軟骨細胞、右図) E16 小型 (静止) 軟骨細胞

低酸素群の培養胎仔下顎は対照群と比較して小さく、Meckel 軟骨は静止期に相当する小型の軟骨細胞が多数を占めたが、対照群では前肥大軟骨細胞も認められた。低酸素群は対照群よりも強い HIF-1 α 免疫活性もつ軟骨細胞が多数認められた。

この局在の違いについては、小型軟骨細胞においては HIF-1 α が細胞膜上にグルコーストランスポーターである GLUT1 を発現させ嫌氣的環境下での効率よく ATP を産生することによって細胞維持として働くことを、肥大軟骨細胞ではミトコンドリアのオートファゴソームの形成にしてオートファジーを促進させるのではないかと考えた。肥大軟骨細胞はアポトーシスにより死すと考えられてきたが、実際にはアポトーシスはメッケル軟骨にはほとんど生じないことから、会うとファジーによる細胞死が今結果から強く示唆される。これに関しては、他のオートファジー関連因子の発現を確認した。

低酸素環境下器官培養

低酸素下で E10 下顎突起を培養すると、対照群と比較して明らかな小下顎症と軟骨の形態異常を呈した。

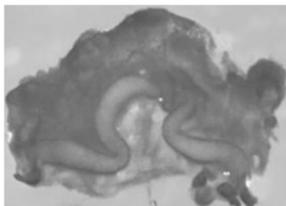
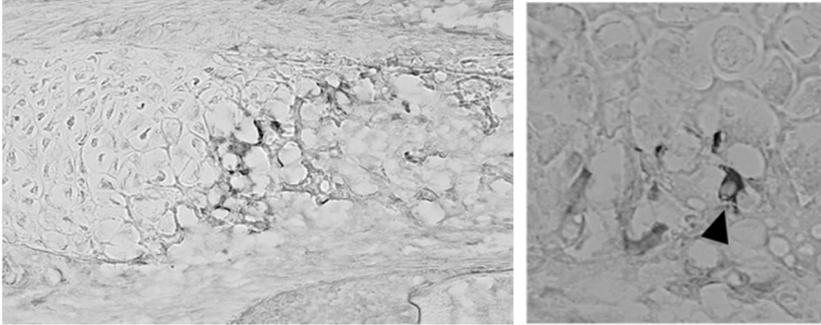


図) 低酸素培養群

組織学的な解析では、低酸素群では肥大軟骨細胞はほとんど見られず、小型の静止軟骨細胞で構成されていた。HIF- も、正常では見られない軟骨膜直下の軟骨細胞にも発現していた。この結果から、低酸素下では軟骨細胞の分化 (肥大化) は抑制され、結果として吸収も阻害または遅延することが示唆された。軟骨吸収は表層 (軟骨膜側) から起こるが、これは低酸素の影響を受けにくいことと関連してのではないかとと思われる。さらには、軟骨としての維持にはある程度の低酸素環境が必須であると考えられる。

脂肪酸結合蛋白を発現するセプトクラスト

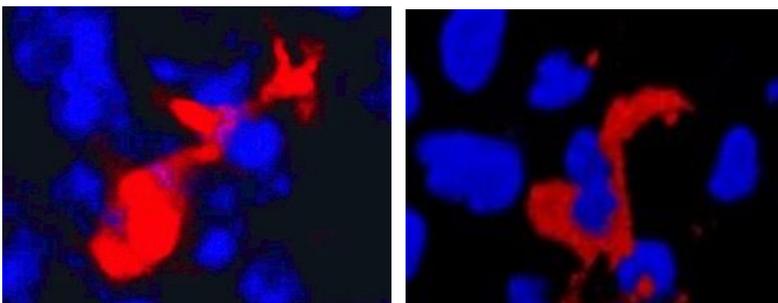
E-FABP 免疫陽性セプトクラストはメッケル軟骨吸収の初期に初めて見出され、吸収面に沿って局在していた（下図）。



左図) 吸収部のセプトクラスト、右図) 拡大像

マウス胎仔のメッケル軟骨は未石灰化軟骨基質に達する数本の突起、カテプシン B の発現および、毛細血管周囲への局在という特徴を有していた。セプトクラストの突起の先端部は、von Kossa 陰性の非石灰化軟骨基質に接しており（上右図）、更に、セプトクラストの起源であることを骨端板軟骨で見出したペリサイト（血管周皮細胞）のマーカ―も発現することから、メッケル軟骨の吸収部において進入する毛細血管のペリサイトからセプトクラストが分化すると考えられる。

また、吸収面においてセプトクラストは肥大軟骨組織と破軟骨細胞との間に局在した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により、メッケル軟骨の消失過程の進行に伴って、セプトクラストとその突起の数は減少することがわかった。セプトクラストの突起は、軟骨吸収の活動状態を反映していると考えられる。



左図) E16 の数本の突起をもつセプトクラスト、右図) E18（吸収末期）では突起が減少

結論

胎児下顎のメッケル軟骨はもともとは下顎骨の原基であったが、哺乳類以降は新たな下顎骨の出現により一部を除いて不要となり、大部分は出生前に消失する。しかしその遺残は生後の下顎骨や顎顔面の異常を来すことから、出生前までの急速な消失が正常な顎顔面形態形成には必要である。今課題の実施により、長管骨の軟骨内骨化に見られるセプトクラストがメッケル軟骨の吸収面に出現して、破骨細胞と役割分担をしながら急速な軟骨吸収を行うことを明らかにした。また、吸収開始に必要な軟骨細胞の肥大化には、低酸素環境で誘導される因子の発現が関与しており、無血管組織である軟骨特有の細胞分化、吸収開始機構をもつことが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakagami H, Sugimoto M, Kanda Y, Murakami Y, Amano O, Saitoh J, Kochi A.	4. 巻 5
2. 論文標題 Changes in Metabolic Profiles of Human Oral Cells by Benzylidene Ascorbates and Eugenol.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicines (Basel)	6. 最初と最後の頁 pii: E116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3390/medicines5040116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bando Y, Sakashita H, Taira F, Miyake G, Ogasawara Y, Sakiyama K, Owada Y, Amano O.	4. 巻 149
2. 論文標題 Origin and development of septoclasts in endochondral ossification of mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 645-654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00418-018-1653-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bando Yasuhiko, Sakashita Hide, Taira Fuyoko, Miyake Genki, Ogasawara Yudai, Sakiyama Koji, Owada Yuji, Amano Osamu	4. 巻 Epub
2. 論文標題 Origin and development of septoclasts in endochondral ossification of mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00418-018-1653-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bando Yasuhiko, Yamamoto Miyuki, Sakiyama Koji, Sakashita Hide, Taira Fuyoko, Miyake Genki, Iseki Shoichi, Owada Yuji, Amano Osamu	4. 巻 148
2. 論文標題 Retinoic acid regulates cell-shape and -death of E-FABP (FABP5)-immunoreactive septoclasts in the growth plate cartilage of mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 229 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00418-017-1578-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂東 康彦、坂下 英、崎山 浩司、徳田 信子、天野 修
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂東 康彦，崎山 浩司，天野 修
2. 発表標題 A-FABP を発現する E-FABP 陽性 septoclast と E-FABP 欠損の影響
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂下 英，坂東康彦，崎山浩司，天野 修
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂東康彦，坂下 英，崎山浩司，天野 修
2. 発表標題 マウス脛骨の発生におけるseptoclastの由来と分化
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 崎山浩司, 瀧澤将太, 小峰雄介, 小笠原悠大, 坂東康彦, 天野 修
2. 発表標題 High mobility group box1 (HMGB1) が舌癌周囲筋組織に与える影響とその意義
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 天野 修, 坂下 英, 坂東 康彦, 崎山浩司
2. 発表標題 メッケル軟骨の発生・消失から考える顔面発生
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂下 英, 坂東康彦, 崎山浩司, 大和田祐二, 天野 修
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長坂 新, 崎山浩司, 坂東康彦, 小笠原悠大, 小野澤 豪, 天野 修
2. 発表標題 胎生期マウスの二次口蓋におけるライブ観察法の確立
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長坂 新, 崎山浩司, 坂東康彦, 小笠原悠大, 小野澤 豪, 天野 修
2. 発表標題 胎生期マウスの二次口蓋におけるライブ観察法の確立
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂東康彦, 長坂 新, 崎山浩司, 天野 修
2. 発表標題 軟骨内骨化における septoclast の由来と役割
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 前田健康, 天野 修, 阿部伸一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 291
3. 書名 口腔解剖学 第2版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	坂東 康彦 (Bando Yasuhiko)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	崎山 浩司 (Sakiyama Koji)		
研究協力者	坂下 英 (Sakashita Hide)		