

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09517

研究課題名(和文) MMP-2欠損マウスの硬組織デグラドームを利用した石灰化制御基質タンパクの探索

研究課題名(英文) Search for matrix proteins that regulate calcification by analyzing degradome for calcified tissues of MMP 2 - deficient mice

研究代表者

笹野 泰之 (Sasano, Yasuyuki)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30196191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：硬組織の石灰化に際しMMP-2で分解される石灰化制御基質タンパクの存在を想定し、探索することを当初の目的とした。MMP-2欠損における骨の石灰化低下の背景を理解するために、最初に、MMP-2欠損に伴う骨のミネラルを構成するカルシウム及びリンと有機質の構成元素である炭素の濃度変動を検討することとした。生後7週齢を中心に、MMP-2欠損マウスおよび野生型マウスの脛骨をマイクロX線CTおよび分析走査電子顕微鏡で解析し、また組織学的に検討した。脛骨の皮質骨の骨密度はMMP-2欠損マウスで野生型マウスより低かった。一方、野生型とMMP-2欠損の間で構成元素濃度や組織学的所見には違いが認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MMP-2等の細胞外基質タンパク分解酵素が骨の石灰化に役割を担うことは想定されてきたが、ミネラルにおける元素の構成にどのように影響するかは不明である。本研究ではMMP-2欠損で7週齢の段階のマウスでは骨密度が低下することを確認した一方で、カルシウムとリンの濃度が変化しないことを示した。本研究の結果はMMP-2による骨ミネラルの元素構成に対する制御に関する研究に繋がることが期待され、意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to search for regulatory matrix proteins in bone and tooth calcification that are degenerated by MMP-2 (Matrix Metalloproteinase-2). The concentration of elements of calcium, phosphorus and carbon was compared between MMP-2 deficient mice (MMP-2 KO) and wild type mice (WT) to understand how deficiency in MMP-2 affects composition of the elements and how the element composition is involved in calcification. Tibiae of MMP-2 KO and WT at 7 weeks were examined with micro-computed tomography, scanning electron microscope with energy dispersive X-ray spectroscopy and histology. The bone mineral density of the cortical bone in tibiae were lower in MMP-2 KO than WT. In contrast, no significant difference was recognized in composition of the elements or in histological observation.

研究分野：口腔組織発生学

キーワード：MMP-2欠損マウス 骨 石灰化 マイクロX線CT エネルギー分散型X線分析 基質タンパク

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

申請者等はラットを用いて骨と象牙質の発生過程を検討し、石灰化に基質タンパクの分解が伴うことを示してきた。骨については、類骨の石灰化に伴い、骨芽細胞と骨細胞が基質タンパクの分解酵素である MMP2 (マトリックス・メタロプロテアーゼ-2) の遺伝子を発現し、類骨にその酵素活性が認められることを報告した。石灰化に際し骨芽細胞と骨細胞が MMP-2 を分泌し類骨中の基質タンパクを積極的に分解する可能性を示した。象牙質についても、象牙芽細胞における MMP-2 の遺伝子発現と象牙前質における MMP-2 の酵素活性を報告し、石灰化に際して象牙芽細胞が象牙前質の基質タンパクを分解する可能性を示している。一方、MMP ファミリー分子の中で、特に MMP-2 の遺伝子欠損マウスでは、骨に石灰化の低下が報告されている。また、骨や象牙質と同様にリン酸カルシウムのミネラル結晶が沈着する動脈壁でも、石灰化が MMP-2 の欠損や酵素活性阻害で低下することが知られている。以上から、骨および象牙質の石灰化過程で、類骨と象牙前質には石灰化を制御する基質タンパクが含まれ、そのタンパクを骨芽細胞・骨細胞と象牙芽細胞が MMP-2 を利用して分解し石灰化を進行させることが考えられた。

2. 研究の目的

骨芽細胞と象牙芽細胞は石灰化に際し、核となる基質小胞を細胞外に放出し、リン酸カルシウムのミネラル結晶が核から成長して石灰化が進行すると考えられている。申請者等の研究から、石灰化が基質小胞の核から進行する過程を基質タンパクが制御すると考えられるが、そのタンパクの実体は不明である。骨と象牙質の石灰化に際し MMP-2 で切断 (分解) される「石灰化制御基質タンパク」を探索することを当初の目的とした。MMP-2 欠損における骨の石灰化低下の背景を理解するために、最初に、情報の乏しい MMP-2 欠損に伴う骨のミネラルを構成する元素 (カルシウム、リン) の濃度変動を検討することとした。合わせて、有機質分子の指標として、炭素元素についても同様に濃度変動を検討した。

3. 研究の方法

(1) MMP-2 欠損マウスの導入と遺伝子型検出 (genotyping)

MMP-2 欠損マウス (GelA KO) を理研バイオリソース研究センター (理研 BRC) から導入し、本学の動物実験施設における検疫を経て、繁殖を開始した。理研 BRC の情報に基づき、遺伝子型検出のための PCR 条件の検討を行った。その結果、野生型配列の検出には GelA Forward (5' -GTGCTACTGCAGGATAAACTGATG-3') と GelA Reverse (5' -CCGGGACAGGAACGTACTGGGTTC-3') のプライマーを用い、94°C 2分の熱変成の後、98°C 10秒、55°C 30秒、68°C 60秒の3ステップを30サイクル繰り返し、さらに72°C 10分の伸長反応を行う反応条件を設定した。ノックアウト配列の検出には、GelA Forward および PGKF (5' -CCGGGACAGGAACGTACTGGGTTC-3') のプライマーを用い、94°C 2分の熱変成の後、98°C 10秒、58°C 30秒、68°C 60秒の3ステップを30サイクル繰り返し、さらに72°C 5分の伸長反応を行う条件とした。

(2) 試料作製

生後7週齢を中心に、以下に記載したように、2週齢、12週齢および24週齢の MMP-2 欠損 (-/-) および野生型 (+/+) のマウスを全身麻酔下に4%パラホルムアルデヒドまたは4%パラホルムアルデヒド-1%グルタルアルデヒドで灌流固定した。下肢を試料として採取した。

2週齢 雄 -/- 3個体 +/+ 2個体; 雌 -/- 1個体 +/+ 0個体
7週齢 雄 -/- 11個体 +/+ 10個体; 雌 -/- 9個体 +/+ 4個体
15週齢 雄 -/- 1個体 +/+ 1個体; 雌 -/- 1個体 +/+ 1個体
24週齢 雌 -/- 3個体 +/+ 1個体

(3) マイクロ X 線 CT

上記(2)で固定した一部の試料に対して、マイクロ CT (Scan Xmate-E090, Comscan, Kanagawa, Japan) を利用した解析を一定の条件下にて行った。脛骨を検討の対象とした。撮影条件は管電圧 89kv、管電流 100 μ A、管電力 8.8W、拡大率 2.86、解像度 17.483 μ m/pixel とした。撮影後、

3次元解析ソフト (TRI3D Bon64, Ratoc, Tokyo, Japan) にて撮影画像の解析を行った。3次元解析ソフトにて、骨体積 (BV, cm^3) と骨塩量 (BMC, mg) を直接的に計測し、骨密度 ($\text{BMD} = \text{BMC}/\text{BV}$, mg/cm^3) を算出した。

(4) SEM-EDX (エネルギー分散型 X 線分析機能を装備した分析走査電子顕微鏡)

上記 (2) で固定した一部の下肢の試料は、0.1M リン酸緩衝液により洗浄し、エタノールによる脱水を施した。脱水後、t-ブチルアルコールにて凍結包埋し、凍結乾燥した。エネルギー分散型 X 線分析機能を装備した分析走査電子顕微鏡 (JSM-6390LA, EX-2300; JEOL, Tokyo, Japan) を用いて、SEM-EDX 解析した。脛骨の横断面を対象に構成元素 (Ca, P, C) の分布と濃度を元素マッピングおよび点分析で検討した。さらに、点分析の結果から元素の濃度比 Ca/P、C/Ca および C/P を算出した。

(5) 組織学的検討

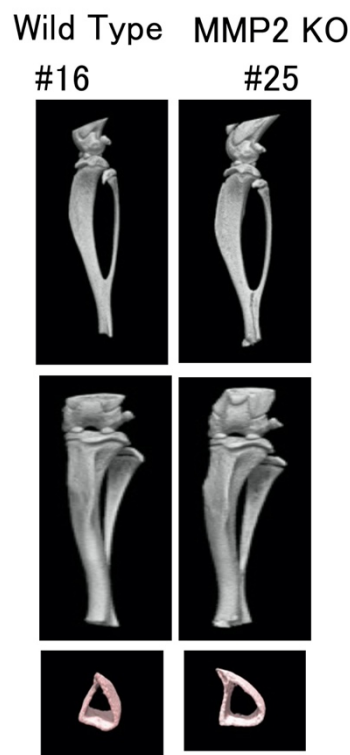
上記 (2) で固定した一部の下肢の試料は、10%EDTA で脱灰し、パラフィン包埋試料とした。パラフィン切片はヘマトキシリン-エオジンで染色した。

4. 研究成果

図1

(1) マイクロ X 線 CT による検討結果

マイクロ CT により得られた画像情報から構築した生後 7 週齢の野生型マウスおよび MMP-2 欠損マウスの脛骨の三次元像および中央の断面像を図 1 に示す。形態的には大きな違いが認められなかった。一方、脛骨中央部の皮質骨の骨密度は、平均値で野生型マウス $982.7\text{mg}/\text{cm}^3$ に対して、MMP-2 欠損マウス $878.9\text{mg}/\text{cm}^3$ であり、MMP-2 欠損での骨密度の低下が確認できた。



(2) SEM-EDX による検討結果

生後 7 週齢の野生型 (7w WT) マウスおよび MMP-2 欠損 (7w MMP2 KO) マウスの脛骨の骨幹中央部横断面に対して SEM-EDX 解析した。7w WT および 7w MMP2 KO のいずれとも、図 2 の横断面における A, B, C の部位のカルシウム、リンおよび炭素の濃度を点分析し、全体を纏めて試料における濃度とした。結果を表 1 に示す。Ca, P, C のいずれの元素濃度も野生型マウスおよび MMP-2 欠損マウスの間で有為な差は認められなかった。また、脛骨の骨幹中央部横断面における Ca, P, C の元素分布を面分析 (マッピング) で検討した結果を図 3 に示す。いずれの元素も、7w WT および 7w MMP2 KO の間で分布における定性的な違いは認められなかった。

図2

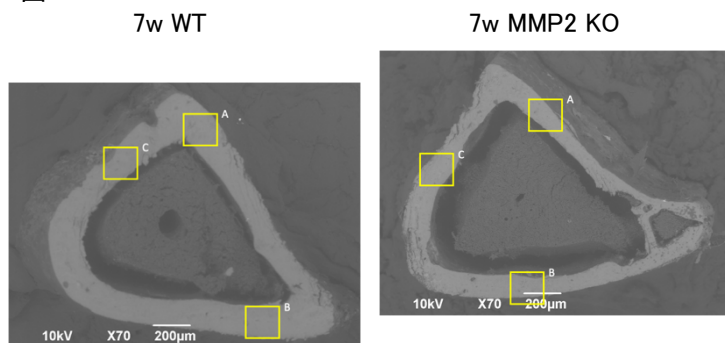
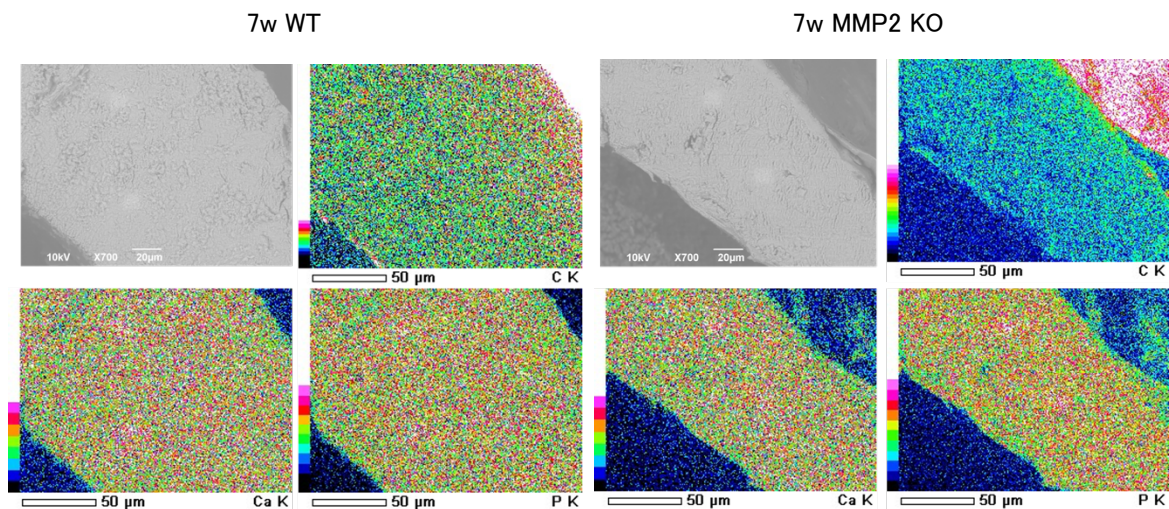


表1

	Average	
	WT (n=3)	MMP KO (n=3)
Ca	8.68	8.41
P	6.25	6.28
C	45.66	42.93
Ca/P	1.39	1.34
C/Ca	5.26	5.11
C/P	7.31	6.84

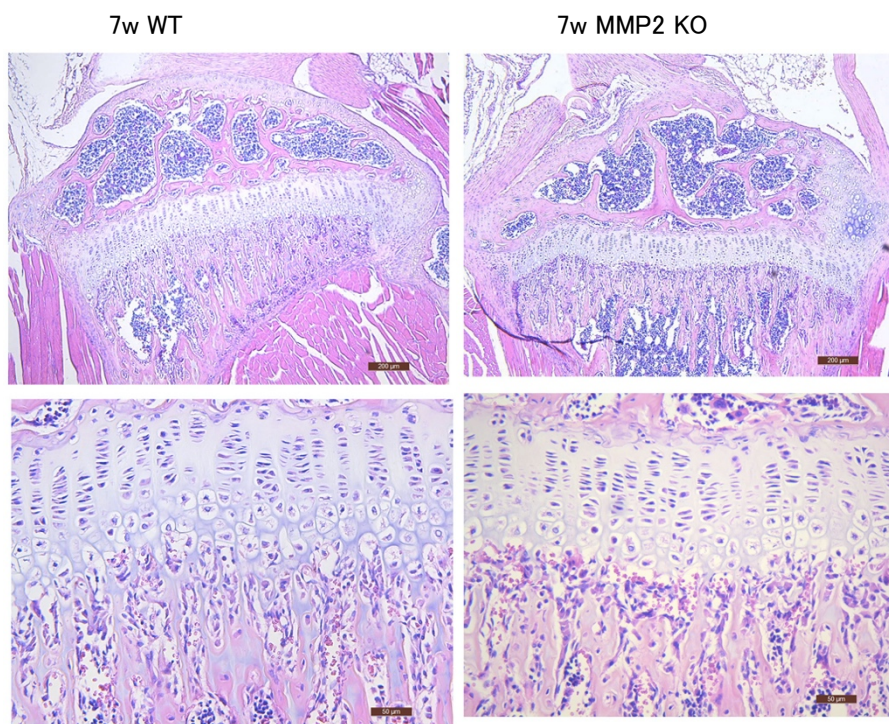
図3



(3) 組織学的検討結果 (図4)

生後7週齢の野生型マウスおよびMMP-2欠損マウスの脛骨のヘマトキシリン-エオジン染色で、骨組織に大きな違いは認められなかった。一方、成長板軟骨においては、MMP-2欠損マウスでは、野生型マウスに比較して細胞密度が低い傾向が見られた。

図4



(4) まとめ

生後7週齢の野生型マウスおよびMMP-2欠損マウスの脛骨では、緻密骨の骨密度においては、MMP-2欠損マウスで明らかに低かった。一方、野生型およびMMP-2欠損の間でCa, P, Cのいずれの元素濃度にも違いが見られず、また脱灰した骨の組織像にも大きな違いは認められなかった。野生型およびMMP-2欠損の間で、マイクロX線CT解析で得られた骨密度の違いにSEM-EDX解析から得られた構成元素の濃度がどのように反映されるかは不明である。本研究では、コロナ禍での研究活動の制限が影響し研究の進捗が遅れ、当初目的としていた「石灰化制御基質タンパク」の検討には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura Megumi、Yang Mu-Chen、Ashida Keijyu、Mayanagi Miyuki、Sasano Yasuyuki	4. 巻 97
2. 論文標題 Calcification and resorption of mouse Meckel 's cartilage analyzed by von Kossa and tartrate-resistant acid phosphatase histochemistry and scanning electron microscopy/energy-dispersive X-ray spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 213 ~ 220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12565-021-00643-6	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 Caiyu Liao、Nakamura Megumi、Mayanagi Miyuki、Kayaba Atsuko、Sasano Yasuyuki	4. 巻 63
2. 論文標題 Three-dimensional visualization of osteoclasts in embryonic mouse mandibles using SEM array tomography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 401 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.10.003	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 該当する
1. 著者名 Li Xinghan、Nakamura Megumi、Tian Weidong、Sasano Yasuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Application of cryopreservation to tooth germ transplantation for root development and tooth eruption	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88975-1	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 該当する
1. 著者名 NAKAMURA Megumi、AOYAMA Naoki、YAMAGUCHI Satoshi、SASANO Yasuyuki	4. 巻 42
2. 論文標題 Expression of tartrate-resistant acid phosphatase and cathepsin K during osteoclast differentiation in developing mouse mandibles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 13 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.42.13	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 Sasano Y, Nakamura M, Henmi A, Okata H, Suzuki O, Kayaba A, Mayanagi M	4. 巻 61
2. 論文標題 Degradation of extracellular matrices propagates calcification during development and healing in bones and teeth.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 149-156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2019.07.004	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 笹野泰之、中村 恵、逸見晶子、大方 浩、真柳みゆき	4. 巻 54(3)
2. 論文標題 分析走査電子顕微鏡を用いた硬組織の石灰化の進行と成熟過程の検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 144-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 猪狩洋平、影山曜子、萱場敦子、真柳みゆき、中村恵、 服部佳功、笹野泰之	4. 巻 36・37
2. 論文標題 加齢マウス脛骨における成長板軟骨の組織構造と皮質骨の石灰化に関する検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 東北大歯誌	6. 最初と最後の頁 32-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Otake Y, Nakamura M, Henmi A, Takahashi T, Sasano Y	4. 巻 Nov 21; 8(1)
2. 論文標題 Comparison of the Performance of Cutting Bone and Soft Tissue between Piezosurgery and Conventional Rotary Instruments	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 171548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-35295-6	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 -

1. 著者名 Kageyama Yoko, Nakamura Megumi, Igari Yohei, Yamaguchi Satoshi, Oguchi Akiko, Murakawa Yasuhiro, Hattori Yoshinori, Sasano Yasuyuki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Expression of matrix metalloproteinase 3 and 10 is up regulated in the periodontal tissues of aged mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12996	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 笹野泰之、中村恵、逸見晶子、大方広志、鈴木治、真柳みゆき
2. 発表標題 硬組織石灰化進行過程の分析走査電子顕微鏡による元素イメージング解析
3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学会総会・学術集会 シンポジウム「分子組織細胞化学の最前線と未来への展望」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 恵、笹野泰之
2. 発表標題 マウス歯周組織における老化関連細胞外マトリックス分解酵素の探索 - トランスクリプトーム解析を用いたアプローチ -
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム「オーラル・バイオロジーの老化研究への新たな挑戦」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 影山曜子、中村 恵、猪狩洋平、山口哲史、服部佳功、笹野泰之
2. 発表標題 マウス下顎のトランスクリプトーム解析による老化関連細胞外マトリックス分解酵素の同定
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 2020年

1. 発表者名 中村 恵、笹野泰之
2. 発表標題 凍結保存歯胚の移植における歯の萌出と歯根形成
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会 ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 影山曜子, 中村恵, 猪狩洋平, 山口哲史, 服部佳功, 笹野泰之
2. 発表標題 網羅的遺伝子解析を用いた高齢マウスの下顎における細胞外マトリックス分解酵素の発現
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 中村恵、笹野泰之
2. 発表標題 凍結歯胚移植に伴う硬組織形成の形態学的解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹野泰之、逸見晶子、大方広志、中村恵、鈴木治
2. 発表標題 発生・修復に伴う硬組織石灰化の元素イメージング
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会 ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹野泰之、逸見晶子、真柳みゆき
2. 発表標題 質量分析イメージングにおける硬組織試料作製法の検討と歯胚に局在する脂質分子の探索
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 笹野泰之
2. 発表標題 硬組織の発生と修復におけるバイオミネラリゼーションのイメージング解析
3. 学会等名 大学院歯学研究セミナー・第420/421回北海道歯学会例会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Caiyu L, Kayaba A, Mayanagi M, Nakamura M, Sasano Y
2. 発表標題 Three-dimensional visualization of embryonic bone development with serial-semithin-section SEM
3. 学会等名 二国間共同研究セミナー Supported by Japan Society for the Promotion of Science and National Natural Science Foundation of China (NSFC)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasano Y
2. 発表標題 Biom mineralization imaging of bone development and healing by analytical electron microscopy
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Morphological Sciences (ISMS2018)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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 分担者	矢尾 育子 (Yao Ikuko) (60399681)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・准教授 (13802)	
研究 分担者	鈴木 治 (Suzuki Osamu) (60374948)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------