

令和 4 年 5 月 26 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：18K09760

研究課題名(和文)骨修復に破骨細胞は必要か：破骨細胞分化抑制モデルマウスを用いた実験的検討

研究課題名(英文) Experimental investigation of bone repair using a mouse model lacking osteoclast differentiation: are osteoclasts necessary for bone repair?

研究代表者

中村 恵 (Nakamura, Megumi)

東北大学・歯学研究科・講師

研究者番号：20431512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：c-fosヘテロ欠損(+/-)マウス同士の交配により得られた胎児から抽出したDNAを用いてPCR法による遺伝子型解析を行い、c-fos欠損(-/-)マウスの出現率を調べた結果、ヘテロ欠損(+/-)マウスが61.2%と半数以上を占める一方で、c-fos欠損(-/-)マウスの出現率が14.3%と低いことがわかった。野生型マウスの頭頂骨に規格化骨欠損を作製し、術後4週・8週・12週でマイクロCT撮影解析を行った結果、修復骨は骨欠損辺縁部からだけではなく、欠損内にも散在性に認められ、経時的に修復骨量が増加した。さらに、組織学的解析においても同様の所見が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨修復に関する研究は、骨形成を促進する人工材料の開発や、骨形成系細胞の骨形成能を促進する因子の投与実験など、効率的に骨形成を促進させることに着目した研究報告がほとんどで、骨吸収を行う破骨細胞の役割に注目した研究は国内外で報告がない。また、破骨細胞が機能しないマウスに骨欠損を作製し、その修復過程を検討する研究は過去に例がない。従って本研究により得られる結果は、骨修復における破骨細胞の新しい機能を明らかにし、骨修復の生理的メカニズムの一端を解明する可能性があることから、今後の骨修復・再生治療に有用な情報を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The incidence of c-fos deficient (-/-) mice was examined by genotyping with PCR using DNA extracted from embryos obtained from mating between c-fos heterozygous (+/-) mice. The results showed that heterozygous (+/-) mice accounted for more than half of the total number of mice (61.2%), while the incidence of c-fos deficient (-/-) mice was low at 14.3%.

Micro-CT analysis was performed at 4, 8, and 12 weeks after creation of a standardized defect in the parietal bone of wild-type mice to examine the process of bone defect repair. The results showed that the amount of repaired bone increased over time, and that repaired bone was not only formed from the margins of the defect, but also sporadically formed within the defect. Furthermore, our histological analysis with hematoxylin and eosin staining showed consistent findings with the results of micro-CT analysis.

研究分野：外科系歯学

キーワード：骨修復 規格化骨欠損 破骨細胞 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨が損傷を受けると、骨形成系の細胞である骨芽細胞・骨細胞が骨基質タンパク質を活発に産生し、骨修復が進行する。一方、骨吸収を担う破骨細胞は骨形成完了後の骨改造(リモデリング)時に機能する細胞であり、骨修復における新生骨の形成に直接的に関与しないと考えられている。従って過去の骨修復関連の研究報告は、骨形成系細胞に関する知見がほとんどであり、修復骨形成における破骨細胞の役割はわかっていない。

(2) 転写因子 AP-1 (activating protein-1) の構成要素である c-Fos は破骨細胞分化に必須の分子として知られており、c-fos 欠損マウスは破骨細胞分化が障害されるために骨吸収が起らず、全身性に大理石骨病様を呈する (Grigoriadis et al. (1994) Science 21;266(5184):443-8)。c-fos 欠損マウスを含めて破骨細胞が機能しないマウスにおける骨損傷時の新生骨形成を検討した研究報告は過去に無く、骨修復に破骨細胞が必要であるか否かについては不明である。

2. 研究の目的

破骨細胞が機能しないマウス(全身的に破骨細胞分化が抑制された c-fos 欠損マウス)と破骨細胞が正常に機能するマウス(野生型マウス)とを用いて、我々が従来の研究で確立した頭頂骨規格化骨欠損を作製して (Henmi et al. (2001) J Electron Microsc (Tokyo) 60(6):393-400)、骨欠損修復の過程を比較検討することにより、骨損傷時における新生骨形成における破骨細胞の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

c-fos 欠損マウス : 破骨細胞分化が起こらない実験群
野生型マウス (C57BL/6 系): 破骨細胞分化が正常である対照群

(2) 規格化骨欠損の作製

全身麻酔下にてマウス頭頂骨部の皮膚を切開し、皮膚・骨膜弁を剥離し、トレフィンバーを用いて直径 2.4mm の骨欠損を作製する。骨片を除去後、皮膚・骨膜弁を復位し、5-0 ナイロン糸を用いて縫合する。



(3) マイクロ CT による修復骨量と骨密度の定量解析

骨欠損作製後 4 週・8 週・12 週で頭頂骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒドによる固定を行う。
マイクロ CT を用いて固定後の試料を撮影し、修復骨の骨量と骨密度を測定して、c-fos 欠損マウスと野生型マウスとで統計学的に比較検討を行う。
三次元画像を構築し、修復骨の三次元的構造を c-fos 欠損マウスと野生型マウスとで比較検討する。

(4) ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的検討

マイクロ CT 撮影後の試料を脱灰し、パラフィン包埋する。

- ② 5 μ m 厚の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡にて骨欠損修復部を観察し、骨修復の過程を c-fos 欠損マウスと野生型マウスとで組織学的に比較検討する。

(5) 破骨細胞の分布と破骨細胞数の検討

ヘマトキシリン・エオジン染色に用いた切片の隣接切片に破骨細胞のマーカである酒石酸耐性ホスファターゼ (TRAP) 染色を施し、破骨細胞の分布を調べる。
切片上の多核の TRAP 陽性細胞の数を計測する。

(6) 骨形成関連分子の mRNA 発現の検討

骨欠損作製後 8 週で修復骨を採取し、トータル RNA を抽出する。

型コラーゲンやオステオカルシン等の骨形成関連分子のmRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて定量的に解析し、c-fos 欠損マウスと野生型マウスとで統計学的に比較検討する。

4. 研究成果

(1) c-fos 欠損 (-/-) マウスの出現率

本研究計画では破骨細胞が機能しないマウスとして全身的に破骨細胞分化が抑制された c-fos 欠損マウスを使用する予定であったが、c-fos 欠損マウスはホモ欠損 (-/-) 同士の交配ができないため、ヘテロ欠損 (+/-) 雌雄の交配により繁殖・維持を行った。しかし、ホモ欠損 (-/-) マウスを得ることが困難であったことから、胎児における各遺伝子型の率を調べることにした。

c-fos ヘテロ欠損 (+/-) マウスの雌雄の交配により得られた胎仔 49 匹を対象に、尾の一部をサンプルとして採取し、DNA を抽出した。PCR 法を用いて遺伝子型の解析を行い、各遺伝子型の出現率を算出して表 1 にまとめた。その結果、野生型 (+/+) マウスの出現率は約 25% でメンデルの法則に従っているが、ホモ欠損 (-/-) マウスの出現率は 14.3% と低く、ヘテロ欠損 (+/-) マウスの出現率は 61.2% と高くなっていった。胎仔ではなく産仔で同じ解析を行った場合、おそらく死産等によりホモ欠損 (-/-) マウスの出現率はさらに低くなることが予想される。

遺伝子型	マウスの数(匹)	出現率 (%)
野生型 (+/+)	12	24.5
ヘテロ欠損 (+/-)	30	61.2
ホモ欠損 (-/-)	7	14.3

表 1 : c-fos 欠損マウスにおける各遺伝子型の出生率

(2) マイクロ CT 解析による骨修復の検討

野生型マウスの頭頂骨に規格化骨欠損を作製し、術後 4 週・8 週・12 週でマイクロ CT 撮影を行い、欠損が修復される過程を解析した結果、修復骨は骨欠損辺縁部からだけではなく、欠損内からも散在性に形成されることがわかった (図 1)。

骨欠損作製後 4 週では、骨欠損辺縁部に修復骨が見られたが、欠損内にはほとんど新生骨が見られなかった (図 1a)。8 週ではさらに修復骨の分布が増え、12 週になると、骨欠損辺縁部の骨修復が進み、欠損内に形成された修復骨量も増加した (図 1b)。

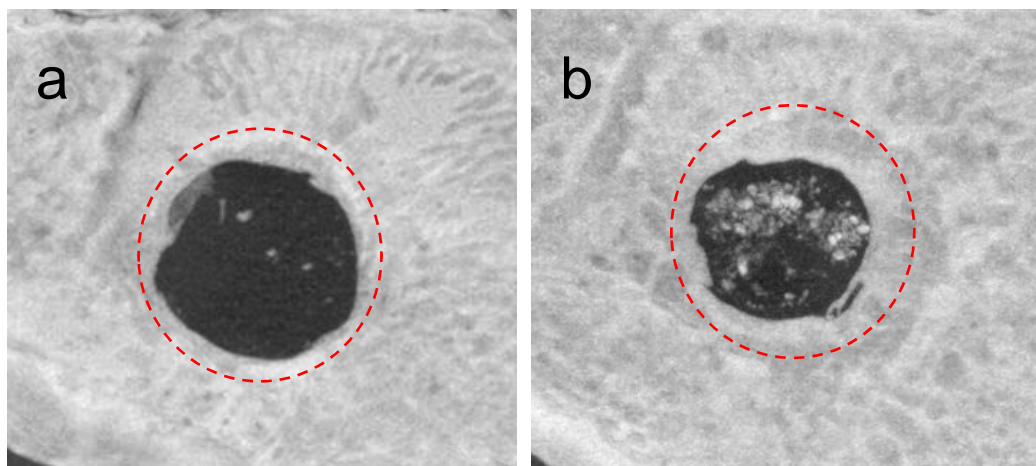


図 1 : 骨欠損修復部のマイクロ CT 画像。骨欠損作製後 4 週後(a)と 12 週後(b)。

(赤点線は骨欠損作製時の欠損辺縁を示す。)

(3) 組織学的解析による骨修復部

野生型マウスの頭頂骨に規格化骨欠損を作製後、4 週・8 週・12 週で骨欠損を含めた頭頂骨を摘出し、骨欠損の修復過程を組織学的に検討した。マイクロ CT 解析で得られた結果と一致して、修復骨は骨欠損辺縁部だけではなく、欠損内にも散在性に形成された。既存骨と比べると修復骨はエオジンの染色性が弱く、骨細胞が密集して見られる部位が散見された (図 2)。

同じサンプルを用いているのにも関わらず、マイクロ CT 解析では修復骨が見られなかった部位において、組織学的解析では修復骨が認められるケースが多々あった。マイクロ CT 解析においては、ある程度石灰化が進行して十分なミネラル量を持つ骨が修復骨として検知されるのに

対し、組織学的検討においては、十分にミネラルが沈着していない部位でもタンパク質の集積があれば骨基質として検知されることが、その一因であると考えられる。

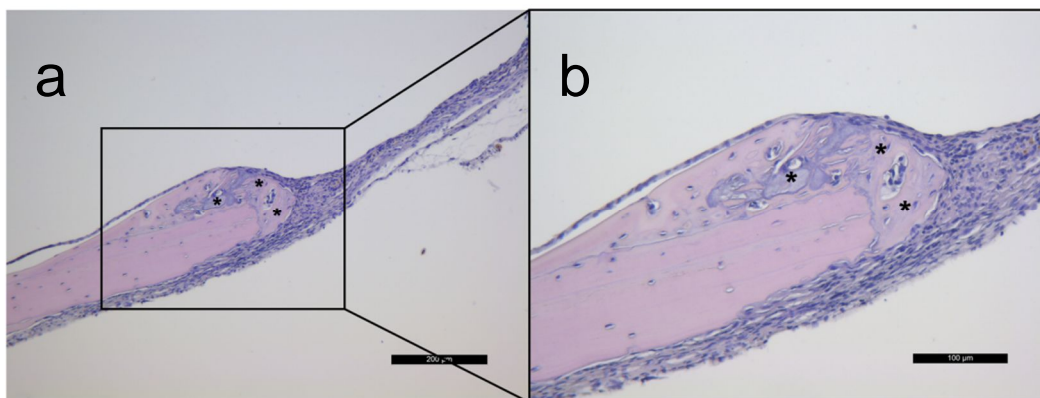


図2：骨欠損作製後4週における骨欠損辺縁部のヘマトキシリン・エオジン染色組織画像。*は骨欠損作製後にできた新生骨。スケールバーは(a)200 μ mと(b)100 μ m。

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 2件/うちオープンアクセス 1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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村恵, 笹野泰之
2. 発表標題 CAGE解析を用いた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
3. 学会等名 日本解剖学会 第67回 東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2022年

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「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 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 (招待講演)
4. 発表年 2019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	笹野 泰之 (Sasano Yasuyuki) (30196191)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	山口 哲史 (Yamaguchi Satoshi) (50400263)	東北大学・大学病院・講師 (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
---------	---------