

平成23年4月20日現在

機関番号： 11301

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2008 ~ 2010

課題番号： 20592134

研究課題名 (和文)

骨基質の ECM リモデリングと石灰化進行における MMP ファミリー分子の役割の解明

研究課題名 (英文)

A role of MMP family molecules in remodeling ECM and advancing calcification

研究代表者

笹野 泰之 (SASANO YASUYUKI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号： 30196191

研究成果の概要 (和文)：

胎生期ラット頭蓋冠を用いて、培養条件下における骨基質の石灰化過程について検討し生理的石灰化の進行を再現する実験系を確立することを目的とした。胎生18日齢のラット頭蓋冠を規格化して摘出し、1,3,5日間器官培養した。培養後、頭蓋冠に含まれるCaを定量した。また組織切片を作製し、von Kossa 染色およびHE染色で検討した。さらに隣接切片をSEM-EDXで分析し、骨組織局所の相対的なCa,P,O元素濃度を定量した。胎生18日齢頭蓋冠を用いて、骨基質の石灰化進行を培養条件下で再現できることが示された。

研究成果の概要 (英文)：

An organ culture system to model the physiological calcification process was designed using rat embryonic calvaria as a device for analyzing its mechanism. Standardized calvarial explants were dissected from rat embryos aged day 18 and cultured for 1, 3, and 5 days. The Ca content was examined with atomic absorption spectrophotometry and distribution of Ca and the concentration of Ca, P and C were examined with von Kossa stain and/or SEM-EDX. The result indicates that the organ culture system using E18 calvaria is useful for modeling of the physiological calcification process in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：骨、石灰化、器官培養、カルシウム、原子吸光分光光度計、エネルギー分散型 X線分析装置、MMP、ラット

1. 研究開始当初の背景

頭蓋骨や顎骨の発生は、膜内骨化の過程を経る。膜内骨化では間葉系細胞は軟骨に依存せずに骨芽細胞へ分化する。骨芽細胞が未石灰化基質である類骨を形成し、類骨を石灰化することで骨組織が造られる。四肢の長管骨等における軟骨内骨化過程では、骨は石灰化軟骨周囲に形成されるため、骨の石灰化を軟骨の石灰化と区別して検討することは困難であるが、膜内骨化過程では石灰化軟骨が関与しないため、純粋な骨の石灰化を検討することができる。類骨は、I型コラーゲンを主体とした多様なタンパクを含む有機基質から構成される。骨発生の過程において、骨芽細胞は細胞外に類骨の土台を造り、さらに類骨にリン酸カルシウムを蓄積し、硬い骨を形成する。このような骨形成に伴いミネラルの量と結晶成長をコントロールする分子機構は未だに解明されていない。骨芽細胞に由来する基質小胞が核となり類骨内の石灰化が開始し、有機基質の改造を伴いながら骨組織局所のカルシウム濃度が上昇して石灰化が進行すると想定されているが、不明な点が多い。また、有機基質の改造を担う MMP (マトリックソス・メタロプロテアーゼ) 等の細胞外基質 (ECM) 分解酵素が石灰化に重要な役割をもつことが示唆されているが、詳細は不明である。知見の乏しい一因として、多様な細胞組織系の関わる生理的な骨の石灰化を *in vitro* で進行させる実験系が確立されていないことが考えられた。

2. 研究の目的

我々は、骨の発生・成長の過程において、石灰化を抑制する未熟型の ECM タンパクを骨芽細胞と骨細胞が MMP を分泌して積極的に分解し、骨基質を構成する ECM タンパク全体を改造 (リモデリング) して石灰化、すなわちミネラルの増加と結晶成長を進行させ、骨を「硬く」成熟させるという仮説を立て、その仮説を立証することを本研究計画の目的とした。研究目的を達成するためには生体に近い環境を再現できる器官培養系の利用が不可欠であったが、従来の研究では骨の厚みの増加や縫合部の形成を検討する実験系は報告されていたが、石灰化の進行を検討する系は見られなかった。したがって、本研究計画では、石灰化進行を再現する器官培養系を確立すること自体が重要な目的と位置付けられ、胎生期ラット頭蓋骨を用いて器官培養し、カルシウムの総量の増加と骨組織局所のカルシウム濃度の上昇に注目し、骨基質の石灰化進行を再現する器官培養系を確立することとした。

3. 研究の方法

(1) ラット頭蓋冠の摘出

動物の取り扱いについては、東北大学における動物実験に関する指針に則った。妊娠 18 日および 20 日の Wistar 系ラットを、ジエチルエーテルにより安楽死させ、胎児を摘出した。胎児を断頭後、前頭骨、頭頂骨及び後頭骨を一塊として摘出し、実験に供する頭蓋冠の大きさおよび形態を均一化した。

(2) 頭蓋冠器官培養

摘出した胎生 18 日齢および 20 日齢のラット頭蓋冠を器官培養するにあたり、培養頭蓋冠の支持フィルターとして、ミリポアフィルターおよびステンレス格子を用いた。摘出した頭蓋冠を皮膚側を上にして滅菌し 1cm 四方に成形したミリポアフィルター上に載せ、培養ディッシュ内のステンレス格子上に静置した。骨形成誘導培地を頭蓋冠上部が液面上にわずかに出るように加え、37°C、5%CO₂ を含む湿潤気相下にて 1 日、3 日および 5 日間培養した。骨形成誘導培地は毎日交換を行った。

(3) ヘマトキシリン・エオジン染色および von-Kossa 染色

摘出した胎生 18 日齢 (E18) および 20 日齢 (E20) ラット頭蓋冠を、摘出直後 (または培養 1 日、3 日および 5 日の時点で 4%パラホルムアルデヒド固定液を用いて 4°C で 24 時間浸漬固定を行った。試料の一部には固定後 10% EDTA を含む 0.01M リン酸緩衝液を用いて 4°C にて 4~5 日間脱灰を施した。エタノール系列による脱水およびレモゾールによる浸漬後、頭蓋骨を前頭面で半切り、前頭骨側と後頭骨側に分割してパラフィンに包埋した。前頭骨側のパラフィンブロックから厚さ 5 μ m で前頭断切片を作製し、レモゾールによる脱パラフィン後、非脱灰切片に対しては von-Kossa 染色を単独またはヘマトキシリン・エオジン染色と併用して施した。また、脱灰切片に対してはヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

(4) カルシウム総量定量

胎生 18 日齢および 20 日齢ラット頭蓋冠に対して培養 0 日、1 日、3 日および 5 日の時点における、各々 7 試料を、高周波分解装置を用いて精密分析用濃硝酸液中で湿式分解した。湿式分解後、蒸留水を加えて硝酸の終濃度が 1/250 mol/l になるように希釈し、カルシウム (Ca) 測定試料とした。Ca は、原子吸光分光光度計を用いて測定を行った。なお、Ca 検量線は原子吸光分析用 Ca 標準液を Ca 測定試料と同濃度の硝酸液で希釈し求めた。

(5) 元素濃度定量

von-Kossa 染色に利用した胎生 18 日齢および 20 日齢ラット頭蓋冠の培養 0 日、1 日、3 日および 5 日非脱灰試料パラフィンブロックについて、各々 5 試料から厚さ 30 μm の切片を作成し、カルシウム (Ca)、リン (P) および炭素 (C) を含有しないカバーガラス上に載せた。レモゾールによる脱パラフィン後、エタノール系列による脱水を行った。エネルギー分散型 X 線分析装置 (SEM-EDX) を用いて、切片上の骨組織中央部を測定視野とし、低真空下で常に同じ条件 (加速電圧、真空度、作動距離、スポットサイズ) にて、Ca、P、C 及び O (酸素) の全元素濃度に対する Ca、P、C それぞれの元素濃度の割合を分析した。さらに同一の視野における Ca、P、C のそれぞれの元素濃度に関して任意に設定した閾値 (Ca 5% および 20%、P 5% および 15%、C 25% および 60%) でマッピングを行い、それぞれの元素における各々の閾値以上の領域の面積を Image J (NIH, Bethesda, Maryland, USA) を用いて算出し、Ca では 5% 以上および 20% 以上の面積値、P では 5% 以上および 15% 以上の面積値、及び C では 25% 以上および 60% 以上の面積値をそれぞれ算出し、それぞれの元素の濃度の指標とした。

(6) 統計学的検討

得られたデータの統計学的検討は、Kruskal-Wallis 検定を行い、その後 Steel-Dwass 法にて多重比較を行った。グラフは平均値 \pm S. D. で表した。

4. 研究成果

(1) 骨基質の石灰化進行を再現する器官培養系を確立

von-Kossa 染色の染色強度から、ラット胎生 18 日齢頭蓋冠では培養 5 日間で石灰化が進行すること及びラット胎生 20 日齢頭蓋冠では胎生 18 日齢頭蓋冠に比較して石灰化程度が高いことが示唆された。von-Kossa 染色とヘマトキシリン-エオジン染色を併用したことで、胎生 18 日齢頭蓋冠および 20 日齢頭蓋冠の両方で、培養 0~5 日間において観察される石灰化が骨基質に限られ、また、軟骨等の組織は石灰化しないことが明らかとなった。一方、骨芽細胞と骨基質との間に骨基質産生の指標となる類骨が認められた。胎生 18 日齢培養頭蓋冠全てと、胎生 20 日齢培養頭蓋冠培養 0 日および 1 日において類骨が認められた。一方で、胎生 20 日齢培養頭蓋冠の培養 3 日以降では類骨は認められなかった。このことは胎生 20 日齢培養頭蓋冠の培養では、骨芽細胞の骨基質産生能が低下する可能性を示している。

脱灰組織のヘマトキシリン-エオジン染色では、骨芽細胞の形態が正確に把握できる。胎生 18 日齢培養頭蓋冠では、いずれの培養段階でも骨芽細胞が骨表面に観察されたが、胎生 20 日齢培養頭蓋冠では、培養 3 日以降、骨芽細胞の細胞層が粗になり、細胞数は減少する傾向を示した。このことから、胎生 20 日齢培養頭蓋冠では、胎生 18 日齢培養頭蓋冠に比較して培養期間中に生理的な活性の低下を示す骨芽細胞の割合が高いことが考えられる。

カルシウム総量の定量から、胎生 18 日齢培養頭蓋冠では培養 5 日間でカルシウムの蓄積が進むことが示された。これに対して胎生 20 日齢培養頭蓋冠では培養 1 日までカルシウムは蓄積されるが、その後の培養ではカルシウムの蓄積は認められなかった。上述の組織学的な所見でも示されたように、胎生 20 日齢培養頭蓋冠における骨芽細胞の生理的な活性が培養中に低下することが起因している可能性がある。なお、上述のように von-Kossa 染色とヘマトキシリン-エオジン染色を併用して観察した結果、頭蓋冠で石灰化を示す組織は骨に限られることが示されたので、定量されたカルシウム総量は全て骨に蓄積されたものと考えられる。

元素濃度の定量により、カルシウムおよびリン濃度が 5% 以上の領域は von-Kossa 染色陽性領域に一致し、すなわち骨に一致することが示された。頭蓋冠の発生において、カルシウムおよびリンの集積する場が骨に限局することが初めて元素濃度値として示された。さらに胎生 18 日齢培養頭蓋冠では、培養 5 日間で局所のカルシウム濃度が上昇した。このカルシウム濃度は胎生 20 日齢培養頭蓋冠における値とほぼ同等であり、前述したカルシウム総量の増加に加えて、培養条件下で骨組織の局所においてカルシウム濃度が上昇し生理的な石灰化が進行したことを示している。但し、この過程でリン濃度は変化しないことから、リン濃度に対するカルシウム濃度の割合が変化する可能性がある。胎生 18 日齢培養頭蓋骨では培養 5 日間で相対的に Ca/P 比が上昇していることから、骨基質が成熟骨に近づいたことが考えられる。

胎生 18 日齢培養頭蓋冠の培養 5 日のカルシウム濃度は上述のように胎生 20 日齢培養頭蓋冠とほぼ同等であり、培養環境下 5 日間で、生体の場合 2 日間で起こる石灰化進行に対応する現象が再現されたと考えられる。一方、胎生 20 日齢培養頭蓋冠では、培養 5 日間でカルシウムおよびリン濃度に変化はなかった。上述のように、培養 1 日でカルシウム総量が増えるものの、骨組織の局所におけるカルシウム濃度の上昇がないため、石灰化の生理的な進行は起きていないと考えられる。

本研究では、胎生 18 日齢培養頭蓋冠の培養 5 日では、骨芽細胞は類骨に沿うように配列し、

類骨内に von-Kossa 陽性の石灰化球が認められた。この観点からも本研究の器官培養は骨発生の生理的な石灰化を再現していることが示唆された。

炭素は骨領域では検出されなかったが、骨以外の領域では、胎生 18 日齢培養頭蓋冠で炭素濃度が上昇した。培養条件下での軟組織におけるタンパク等の有機基質が産生され蓄積されたと考えられる。一方、胎生 20 日齢頭蓋冠培養では炭素濃度の変化がなく、この培養条件では、軟組織の細胞の基質産生能を持続させることができなかつたと考えられる。

胎生 18 日齢頭蓋冠の培養では、カルシウム総量の増加と骨組織局所でのカルシウム濃度の上昇が認められた。この過程で骨芽細胞は生理的な形態を維持して類骨を形成し、また有機基質の細胞外での蓄積も増加したことから、細胞組織が培養環境下で活性を保ち石灰化が生理的に進行したものと考えられる。一方、胎生 20 日齢頭蓋冠の培養では石灰化は進行しなかった。胎生 20 日齢頭蓋冠は胎生 18 日齢頭蓋冠に比較して、細胞外基質が豊富で石灰化程度も高いため酸素や栄養の浸透が悪くなり、骨芽細胞の基質産生能やカルシウム蓄積能等の細胞機能が維持できなくなることが原因として考えられる。

本研究は石灰化の生理的な進行を *in vitro* で再現する培養系を初めて検討したものである。本研究で報告する胎生 18 日齢ラット頭蓋冠器官培養系は、5 日間という短期間で生理的石灰化を進行させる特徴を有し、石灰化現象を研究する *in vitro* の実験系として有用なものとする。

(2) 石灰化進行における MMP ファミリー分子の役割の検討

上記 (1) で確立した生理的石灰化進行を再現する胎生期ラット頭蓋冠器官培養系を利用して、MMP の役割を検討することを目的として、阻害剤 (GM6001) を添加し MMP ファミリー分子の酵素活性を一括して阻害する実験系を検討した。

妊娠 Wistar 系ラットを深麻酔下に安楽死させ、胎生 18 日齢胎児を摘出した。ラット胎児から頭蓋冠を規格化して摘出し、骨形成誘導培地を用いて MMP 活性阻害剤 (GM6001) を添加し、5 日間培養した。GM6001 の濃度と GM6001 溶液に含まれる DMSO の濃度を基準とし、実験条件を以下の 7 群に分けた：①コントロール (GM6001 及び DMSO 無添加) ② GM6001-40 μ M、DMSO-0.4% ③ DMSO-0.4% ④ GM6001-80 μ M、DMSO-0.8% ⑤ DMSO-0.8% ⑥ GM6001-120 μ M、DMSO-1.2% ⑦ DMSO-1.2%。各実験条件で培養したラット胎児頭蓋冠を 4%

パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液溶液で固定し、パラフィンに包埋して薄切した。切片を von Kossa 染色および HE 染色にて組織学的に検討し、また、隣接切片を SEM-EDX (エネルギー分散型 X 線分析装置) で分析して骨組織局所に含まれるカルシウム、リン、炭素の相対的な元素濃度を解析した。

von Kossa - HE 染色では、いずれの実験群の頭蓋冠においても培養前に認められた骨基質の von Kossa 陽性染色が 5 日間の培養期間で増強することを認めた。

(3) 骨発生と骨修復における石灰化過程の比較検討

骨発生と骨修復における石灰化過程を比較し修復骨の特性を明らかとするとともに、骨基質の石灰化進行を検討する骨修復実験系の確立を目指した。

胎生 15、16、18 日齢ラット下顎骨および頭蓋骨の骨発生における骨密度を、マイクロ X 線 CT を用いて検討した。また、非脱灰切片を SEM-EDX (エネルギー分散型 X 線分析装置) で分析して組織局所に含まれる Ca, P, C, N, S, O の相対的な元素濃度を解析した。さらに胎生 18 日齢ラット試料の隣接切片を用いて、骨発生領域における MMP の活性を *in situ* zymography で検討した。その結果、骨発生領域における X 線不透過性 (骨密度) の増強に伴い、Ca, P の高い集積が認められた。一方、C は Ca と P が集積する領域で減少し、Ca, P と C の濃度分布は相補的な関係を示した。また、骨発生領域には高い MMP 活性が認められた。

ラット頭頂骨に直径 3.3mm の企画化骨欠損を作製し、修復骨を術後 1 週、2 週、4 週で検討した。マイクロ X 線 CT を用いて骨修復の骨密度を検討した。また、非脱灰切片を SEM-EDX で分析して修復骨組織局所に含まれる Ca, P, C, N, S, O の相対的な元素濃度を解析した。さらに隣接切片を用いて修復骨組織における MMP の活性を *in situ* zymography を用いて検討した。その結果、骨修復領域で骨密度の増加に伴い、Ca, P の高い集積が認められた。一方、Ca, P と C の濃度分布は相補的な関係を示した。また、修復骨組織に高い MMP 活性が認められた。

石灰化と MMP 活性の観点から骨修復が骨発生と対応する過程を辿ることが明らかとなった。上記実験系は骨修復における骨基質の石灰化進行を検討する上で、有用な実験系と考えられた。

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7件)

(1) Andou K, Nakamura M, Ina Y, Sasaki K, Sasano Y (2011) Root and periodontal tissue development after allogenic tooth transplantation between rat littermates. Oral Diseases, in press (査読有り)

(2) Terao F, Takahashi I, Mitani H, Haruyama N, Sasano Y, Suzuki O, Takano-Yamamoto T (2011) Fibroblast growth factor 10 regulates Meckel's cartilage formation during early mandibular morphogenesis in rats. Dev Biol, in press (査読有り)

(3) Hagiwara Y, Ando A, Chimoto E, Tsuchiya M, Takahashi I, Sasano Y, Onoda Y, Suda H, Itoi E (2010) Expression of collagen types I and II on articular cartilage in a rat knee contracture model. Connective Tissue Research 51:22-30. (査読有り)

(4) Kaneko R, Akita H, Shimauchi H, Sasano Y (2009) Immunohistochemical localization of the STRO-1 antigen in developing rat teeth by light microscopy and electron microscopy. J Electron Microsc 58(6):363-373. (査読有り)

(5) Ebina H, Hatakeyama J, Onodera M, Honma T, Kamakura S, Shimauchi H, Sasano Y (2009) Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. Oral Diseases 15:273-280. (査読有り)

(6) Sato S, Tsuchiya M, Komaki K, Kusunoki S, Tsuchiya S, Haruyama N, Takahashi I, Sasano Y, Watanabe M (2009) Synthesis and intracellular transportation of type I procollagen during functional differentiation of odontoblasts. Histochemistry Cell Biol 131: 583-591. (査読有り)

(7) Takahashi I, Masuda T, Kohsaka K, Terao F, Anada T, Sasano Y, Takano-Yamamoto T, Suzuki O (2009) Molecular mechanisms of mechanical stress response during chondrogenesis. Journal of Biomechanical Science and Engineering 4:307-317. (査読有り)

〔学会発表〕 (計13件)

(1) Root elongation and periodontal tissue formation in tooth germs allogeneically transplanted between rat littermates. (Andou K,

Nakamura M, Ina Y, Sasaki K, Sasano Y) The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science. March 7-8, 2011, Sendai, Japan

(2) Effects of capsaicin treatment on nociception and structure of trigeminal nerve fibers in adult rats. (Kato A, Nakamura M, Echigo S, Sasano Y). The 4th International Symposium for Interface Oral Health Science. March 7-8, 2011, Sendai, Japan

(3) カプサイシンを利用した骨修復における感覚神経の役割の検討。(加藤晶子、中村 恵、越後成志、笹野泰之)第115回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010年3月28日、29日、30日、盛岡市

(4) 硬組織の発生と修復における細胞外基質のリモデリング。(笹野泰之)第52回歯科基礎医学会学術大会 サテライトシンポジウム 2010年9月20日、21日、22日、東京都江戸川区船堀

(5) The physiological calcification process is replicated in a rat embryonic calvarial culture. (Kimura Y, Kikunaga S, Takahashi I, Hatakeyama Y, Fukumoto S, Sasano Y) The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, January 15-16, 2009, Sendai, Japan

(6) Immunohistological study on STRO-1 in developing rat dental tissues with light and electron microscopy. (Kaneko R, Akita H, Shimauchi H, Sasano Y) The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, January 15-16, 2009, Sendai, Japan

(7) Bone formation and ECM remodeling cease within a limited period regardless of completion of bone healing in the rat calvarial defect. (Sasano Y) Workshop, 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium. June 4,5,6,7, 2009, Shonan Village Center, Kanagawa, Japan

(8) カプサイシンの全身投与が知覚および三叉神経線維の形態に及ぼす影響。(加藤晶子、中村 恵、越後成志、笹野泰之)第51回歯科基礎医学会学術大会 2009年9月9日、10日、11日、新潟市

(9) 同腹他個体ラット間の根未完成歯移植における歯根伸長と歯周組織形成に関する検討。(安藤浩二、中村 恵、伊奈慶典、佐々木啓一、笹野泰之)第51回歯科基礎医学会学術大会 2009年9月9日、10日、11日、新潟市

(10) マイクロ CT を利用した同腹他個体ラット間移植における歯根伸長の検討。(安藤浩二、中村恵、笹野泰之) 第55回東北・北海道連合支部学術集会、2009年9月26日、27日、仙台市

(11) 胎生期ラット頭蓋骨器官培養系における骨基質石灰化進行過程の検討。(木村泰子、笹野泰之) 第54回東北・北海道連合支部学術集会、2008年9月6日、7日、郡山市

(12) 骨基質の石灰化進行を再現する器官培養系の検討。(木村泰子、菊永茂司、高橋一郎、畠山雄次、福本敏、笹野泰之) 第50回歯科基礎医学会学術大会 2008年9月23日、24日、25日、東京都

(13) I型コラーゲン発現を指標とした硬組織形成細胞の in vivo での活性の検討。(笹野泰之) ワークショップ「組織細胞化学からみた硬組織研究の新展開」第49回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2008年10月5日、6日、長崎市

[図書等] (計1件)

(1) Kimura Y, Kikunaga S, Takahashi I, Hatakeyama Y, Fukumoto S, Sasano Y (2009) The physiological calcification process is replicated in a rat embryonic calvarial culture. In: Sasano T, Suzuki O (eds) Interface Oral Health Science 2009, Springer, Tokyo, pp.179-180

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹野 泰之 (SASANO YASUYUKI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：30196191

(2) 研究分担者 (NAKAMURA MEGUMI)

中村 恵
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：20431512

(3) 研究分担者

秋田 博敏 (AKITA HIROTOSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：10108540

(4) 連携研究者 (SUZUKI OSAMU)

鈴木 治 (東北大学・歯学研究科・教授)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：60374948