

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592319

研究課題名（和文） 硬骨魚類に着目した破骨細胞の分化制御因子の起源と進化の解明

研究課題名（英文） Study of evolution of osteoclasts regulating factors in teleost fish

研究代表者

土門 卓文（TAKANORI DOMON）

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：50217618

研究成果の概要（和文）：骨を吸収する破骨細胞の起源については不明である。骨組織は系統発生では硬骨魚類から出現するため、そこでは古い破骨細胞像が見られる可能性が考えられる。本研究では硬骨魚類メダカの破骨細胞を分離培養できる実験系を確立し、それら細胞の特徴を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、培養破骨細胞はクジラ象牙質上に吸収窩を形成せず、その表面を酸処理していた。これら結果は破骨細胞の分化制御因子の進化と深く関連していると推測された。

研究成果の概要（英文）：The origin of osteoclasts resorbing bone remains unknown. Bone tissue is seen on teleost fish in phylogeny, and there old osteoclasts would be seen. The present study established the culture system of isolated Japanese medaka and observed their structure by light- and electron microscopy. The cultured cells showed no resorptive lacuna but etched surfaces on sperm whale dentine. These results may be related to the evolution of regulating factors of osteoclasts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,117,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

（1）哺乳類における代表的な血清カルシウム濃度調節ホルモンとしてカルシトニン、副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone, PTH）、そして活性型ビタミン D₃ が知られている。哺乳類の生体内において、これら 3 つのホルモンは骨を吸収する多核細胞である破骨細胞の吸収活性と密接な関係をもつことが知ら

れている。脊椎動物におけるこれらホルモンの系統発生的出現を考えた場合、カルシトニンはすべての脊椎動物にみられるが、活性型ビタミン D₃ は硬骨魚類から、そして PTH は両生類からみられることが知られている。特に、リン酸カルシウムが膠原線維に沈着した骨組織は系統発生的に硬骨魚類から出現するため、硬骨魚類では古い破骨細胞像が

見られる可能性が推測される。本研究はメダカ咽頭骨より破骨細胞を分離・培養できる実験系を確立し、硬骨魚類の破骨細胞の特徴を明らかにすることによって、破骨細胞の分化制御機構の起源と進化を解明しようとするものである。

(2) 本研究の開始時点では、硬骨魚類の破骨細胞を分離し培養できる実験系の報告は皆無であり、この培養系の確立は現時点においても国内外を通じて本研究が最初である。

2. 研究の目的

本研究は、第一に、硬骨魚類のメダカ破骨細胞の培養系の確立を目指し、以下の項目について検討を行った。

(1) 破骨細胞を分離培養する骨組織としてのメダカ咽頭骨の形態学的解析

(2) 分離したメダカ破骨細胞の培養条件の決定

(3) 培養破骨細胞の形態学的解析

(4) 培養破骨細胞の吸収活性の検索

3. 研究の方法

(1) メダカ咽頭骨の形態と破骨細胞の分布を理解するために、咽頭骨と咽頭歯を光顕、酵素組織化学、透過型電顕で観察する。

(2) 咽頭骨より分離した破骨細胞の培養系の確立は本研究の根幹を成すものであり、培養に用いる咽頭骨の前処理としての滅菌条件、破骨細胞の分離方法、長期培養が可能な培地と培養条件の検討が重要である。

(3) 培養破骨細胞の形態学的解析として破骨細胞の特異酵素である TRAP 染色による同定を試み、微細構造は電顕で観察する。

(4) 培養破骨細胞の吸収活性の検索としては、吸収基質としてクジラ象牙質研磨切片、ならびにリン酸カルシウムで表面がコートされたプレートを用い、それらの上で破骨細胞を培養し、走査型電子顕微鏡 SEM で吸収窩を観察する。

4. 研究成果

(1) メダカ咽頭骨の形態と破骨細胞の分布：メダカの咽頭部には上下に咽頭骨が存在し、咽頭骨の表面には多数の咽頭歯（大きさ $100\mu\text{m}$ 程度）が規則正しく配列している。この咽頭骨を *in situ* において破骨細胞の特異酵素である酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性 (TRAP) をアゾ色素法にて検出すると、実顕微鏡下で咽頭歯直下に赤く TRAP

陽性を示す反応が多数観察される (図 1)。

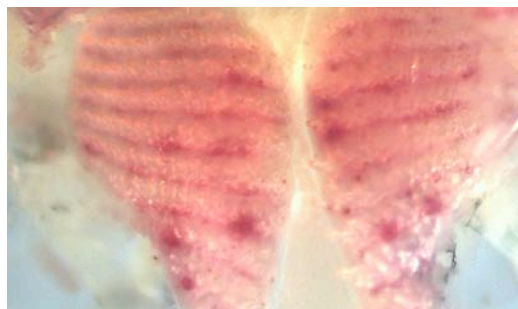


図 1：咽頭骨・歯の実顕微鏡像 (TRAP 染色)

咽頭骨を固定後、通法に従いパラフィン包埋し、TRAP 染色後、ヘマトキシリンで核染色した光学顕微鏡像を図 2 に示す。メダカ咽頭歯は多生歯性であるため、常に吸収脱落と新生を繰り返しており、咽頭歯、咽頭歯と顎骨を連続する歯足骨付近には多数の TRAP 陽性を示す破骨細胞 (矢印) が観察される。

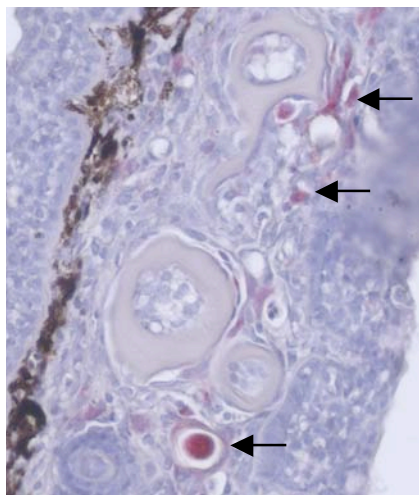


図 2：咽頭歯の光顕像 (TRAP 染色)

(2) 咽頭骨より分離した破骨細胞の培養系の確立：咽頭骨の表面部分は口腔への露出部分を含むため、前処理としての滅菌操作が必要となる。メダカを 0.1%MS-222 で麻酔後、鰓後方で断頭し、滅菌 PBS 中で頭部より咽頭骨を摘出後、0.4%次亜塩素酸ナトリウム溶液に 15 秒間浸漬し、その後 70%エタノールに 2~3 秒間浸漬した。その後、咽頭骨は滅菌 PBS 中に 30 秒間、3 回浸漬した。その後、培養液を入れた小カプセル中に咽頭骨を 30 秒間、3 回浸漬した。培養液は Leibovita's L-15 Medium とし、10%牛胎児血清添加、penicillin-streptomycin 添加 ($100\mu\text{g/ml}$) を用いた。小カプセル中に入れた咽頭骨は滅菌した眼科用ノエス剪刀で骨片が小さくなるまで細切した後、ピペットにより吸引・排出を十数回、機械的に繰り返した。その後、小骨片がカプセルの底に沈降後、上清培養液を採取し、これを分離した破骨細胞を含む溶

液とした。分離した破骨細胞は上述の培養液を入れた Lab-Tek Chamber Slide (4 well) に入れ、24℃、空気雰囲気です3日間培養した。培養液は24時間毎に交換した。

(3) 培養破骨細胞の形態学的解析：培養終了後、破骨細胞は2.5%グルタルアルデヒド(0.1M カコジル酸緩衝)で固定し、アゾ色素法を用いてTRAP染色後、ヘマトキシリンで核染色を行った(図3)。破骨細胞はTRAP陽性の細胞体中に複数の核を有し、円形や不規則形などの様々な細胞外形を示していた。これらの形態学的特徴は哺乳類の破骨細胞のそれと同じであった。

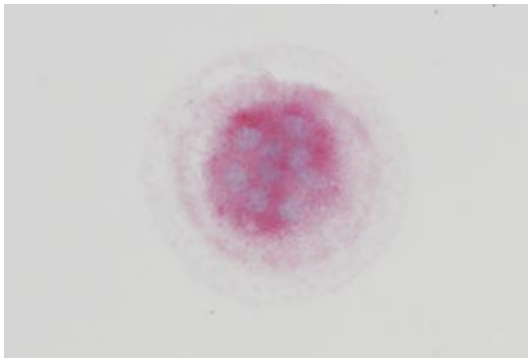


図3：培養破骨細胞の顕微鏡像 (TRAP 染色)

(4) 培養破骨細胞の吸収活性の検索：培養破骨細胞の *in vitro* での吸収能力を観察するために、吸収基質としてクジラ象牙質研磨切片、ならびにリン酸カルシウムで表面がコートされたプレートをを用い、それらの上で破骨細胞を培養し、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。図4にクジラ象牙質研磨切片上で培養した破骨細胞の SEM 像を示す。破骨細胞周囲には明瞭な吸収窩の形成は見られなかったが、象牙質表面が酸処理されたような構造が観察された(図5)。これら培養破骨細胞を透過型電子顕微鏡 TEM で観察したが、微細構造的には細胞表面に微絨毛を有し、細胞体内には複数の核と多数のミトコンドリアが特徴的に観察され、それら微細構造は哺乳類の破骨細胞と同一であった(図6)。

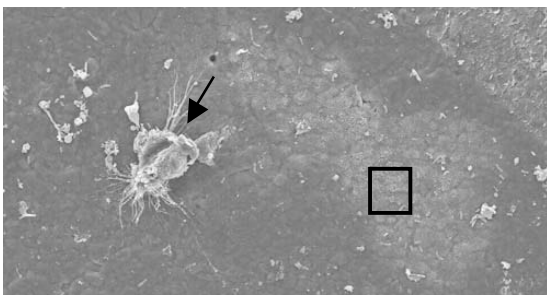


図4：培養破骨細胞の SEM 像 (矢印は破骨細胞、枠は図5で拡大)

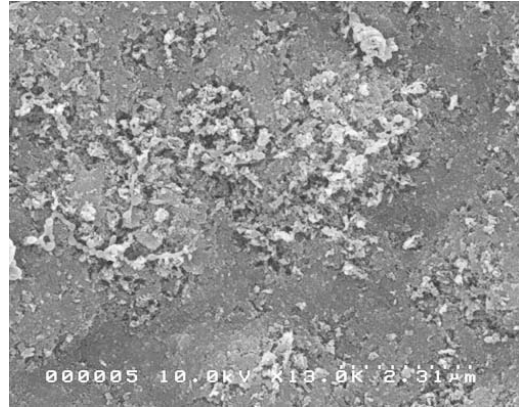


図5：図4中の枠の拡大像

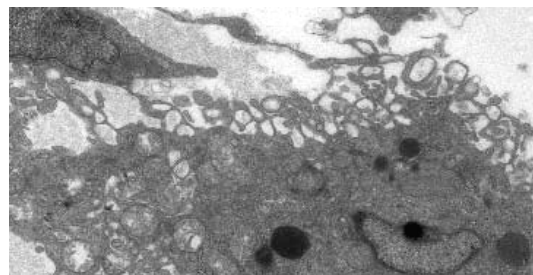


図6：培養破骨細胞の TEM 像

以上の結果から、これまで確立されていなかった硬骨魚類の破骨細胞を分離培養が可能となり、破骨細胞の分化制御因子の進化と起源の解明のための実験系が確立した。メダカ破骨細胞が培養下で明瞭な吸収窩を形成せず象牙質表面を酸処理することの意義については、細胞の分化制御因子の進化と起源に関係していると推測され、今後の研究展開に期待する。

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10件)

- ① Matsushita K, Wang W, Itoh S, Domon T, Funahashi M, Totsuka Y. Dental pulp can be a good candidate for nerve grafting in a xeno-graft model. J Neurosci Method、査読有、205、2012、246-251、DOI : 10.1016/j.jneumeth.2011.12.026
- ② Nomura M, Yoshimura Y, Kikuri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Koshiro K, Sano H, Suzuki K, Inoue N. Platinum nanoparticles suppress osteoclastogenesis through scavenging

- of ROS productions in RAW 264.7 cells. J Pharmacological Sci、査読有、117、2011、243-252、
DOI : 10.1254/jphs.11099FP
- ③ Shibata K, Yoshimura Y, Kikuri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Suzuki K, Iida J. Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. Int J Molecular Medicine、査読有、28:2011、73-79、
DOI : 10.3892/ijmm.2011.675
- ④ Hanaizumi Y, Yokota R, Domon T, Wakita M, Kozawa Y. Initial process of enamel prism arrangement and its relation to the Hunter-Schreger bands in dog teeth. Arch Histol Cytol、査読有、73、2010、23-36、
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/aohc>
- ⑤ Takahashi S, Inoue K, Funahashi M, Domon T. Educational effects in the general education course of Hokkaido University "Science of saliva" using the audience response system, clicker. Hokkaido J Dent Sci、査読有、31、2010、75-31、
<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/journals/index.php?jname=318>
- ⑥ EL-Beillard N, Galal N, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Tei K, Totsuka Y. Effect of estrogen on PMCA 2 and 4 in human fibroblast-like synovial cells and mouse macrophage-like cells. Endocrine J 査読有、57:、2010、93-97、
<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/select?jo=cq6endoc>
- ⑦ Asaka T, Akiyama M, Domon T, Nishie M, Natsuga K, Fujita Y, Abe R, Kitagawa Y, Shimizu H. Type XVII collagen is a key player in tooth enamel formation. Am J Pathol、査読有、171、2009、91-100、
DOI : 10.2353/ajpath.2009.080573
- ⑧ Nakai T, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Iida J. Mechanical stress up-regulates RANKL expression via the VEGF autocrine pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Molecular Medicine Reports、査読有、2、2009、229-234、
DOI : 10.3892/mmr_00000088
- ⑨ Minamikawa H, Deyama Y, Nakamura K, Yoshimura Y, Kaga M, Suzuki K, Yawaka Y. Effect of mineral trioxide aggregate on rat clonal dental pulp cells: expression of cyclooxygenase-2 mRNA and

- inflammation-released protein via nuclear factor Kappa B signaling system. J Endodontics、査読有、35、2009、834-846、
DOI : 10.1016/j.joen.2009.03.008
- ⑩ Galal N, El-Beialy W, Deyama Y, Yoshimura Y, Tei K, Suzuki K, Totsuka Y. Up-regulation of the G3PDH housekeeping gene by estrogen. Molecular Medicine reports、査読有、2、2009、111-114、
DOI : 10.3892/mmr_00000226.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 土門卓文、マウス中足骨に見られる前破骨細胞の三次元的特徴、日本解剖学会第 57 回東北・北海道連合支部学術集会、2011 年 9 月 10 日、岩手大学教育学部講堂 (盛岡)。
- ② Domon T、The reason of multinucleation of osteoclast -A Personal Perspective -、平成 20 年度日本大学松戸歯学部への私立大学戦略的研究基盤支援事業 (2008-2012) 歯の形態形成研究班発表会、2011 年 2 月 25 日、日大会館 (東京)。
- ③ 土門卓文、生理的歯根吸収時における破骨細胞の細胞死の微細構造、日本解剖学会 第 56 回東北・北海道連合支部学術集会、9 月 25 日、旭川医科大学看護学部講堂 (旭川)。
- ④ 土門卓文、脊椎動物の顎・顎関節の進化とヒト耳小骨との関わり、滝川市三師会学術講演会、2010 年 9 月 17 日、ホテル末広 (滝川)。
- ⑤ 土門卓文、解剖学の教育と研究から学んだこと、北海道大学歯学部同窓会 平成 22 年度第 2 回札幌支部学術講演会、2010 年 5 月 8 日、ホテルサンルート札幌 (札幌)。
- ⑥ 土門卓文、脊椎動物の顎の進化 ~ヤツメウナギからヒトまで~、北海道大学大学院歯学研究科・歯学部市民公開講座、2009 年 9 月 27 日、北海道大学学術交流会館 (札幌)。
- ⑦ 土門卓文、破骨細胞の多核の理由は何か、平成 21 年度北海道歯学会秋期学術大会、2009 年 9 月 24 日、北海道大学歯学部講堂 (札幌)。
- ⑧ Domon T、Apoptosis of odontoclasts and osteoclasts under physiological conditions、平成 20 年度私立大学戦略的研究基盤支援事業研究集会、2009 年 2 月 20 日、日大会館 (東京)。

[図書] (計 2 件)

- ① 土門卓文訳、Chapter 4 頸部、ネッター頭頸部・口腔顎顔面の臨床解剖学アトラス、Neil S. Norton 著、前田健康監訳、医歯薬出版、2012、622 頁。
- ② 土門卓文、骨格系・生殖器、歯科衛生士教本 人体の構造と機能、全国歯科衛生士教育協議会監修、医歯薬出版、2010、251 頁。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.den.hokudai.ac.jp/anatomy/ana1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土門 卓文 (DOMON TAKANORI)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：50217618

(2) 研究分担者

吉村 善隆 (YOSHIMURA YOSHITAKA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30230816

(3) 連携研究者

()

研究者番号：