

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09825

研究課題名(和文) プロテオームとミネラルームのイメージングを用いたMMP-2による再生骨成熟の解析

研究課題名(英文) Investigation for involvement of MMP-2 in bone healing with imaging of proteome and mineralome

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生後7及び25週齢のMMP-2遺伝子欠損マウス(KO)と野生型マウス(WT)との間で脛骨の石灰化と組織構造を比較検討した。石灰化については、骨幹部皮質骨の骨密度をマイクロX線CTで、またリン酸カルシウムを構成する元素を走査電子顕微鏡によるエネルギー分散型X線分析で解析した。組織構造については、ヘマトキシリン・エオジンまたはアルシアン・ブルーで染色して検討した。脛骨骨幹部の骨密度はKOでWTより低い傾向が認められたが、カルシウムやリンの元素の分布や濃度にKOとWTの間で違いは見られなかった。組織学的検討では、KOで皮質骨が薄く、また、骨髓腔に面する骨面の凹凸が顕著であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MMP-2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や組織構造への影響は不明である。本研究ではMMP-2遺伝子欠損マウスで生後7週齢及び25週齢の段階の骨密度が低下する傾向を確認した一方で、カルシウムとリンの濃度には野生型マウスと違いは見られなかった。組織学的検討では、MMP-2遺伝子欠損マウスで皮質骨が薄く、また、骨髓腔に面する骨面の凹凸が顕著で、破骨細胞の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to compare calcification and histological characteristics of tibiae between the mice devoid of matrix metalloproteinase (MMP)-2 (KO) and the wild-type mice (WT). Calcification was examined using the micro-computed tomography (micro-CT) for the bone mineral density (BMD) and the scanning electron microscope equipped with an energy dispersive X-ray spectroscope (SEM-EDX) for analysis of elements that constitute the calcium phosphate mineral. Histological sections were cut and stained with hematoxylin and eosin or alcian blue. The BMD of the cortical bone was lower in KO whereas element concentrations and distributions were not different between KO and WT. Histology showed that the cortical bone is thinner and its surface facing the bone marrow is more irregular in KO. The present study suggested that MMP-2 has some role in bone calcification and histological organization.

研究分野：口腔組織発生学 口腔解剖学

キーワード：MMP-2欠損マウス 脛骨 骨密度 マイクロX線CT エネルギー分散型X線分析 破骨細胞 下顎頭 骨髓腔

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。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨の基質はコラーゲンや組織特徴的な細胞外基質タンパクで骨組みが構成され、ハイドロキシアパタイトを基本型とするリン酸カルシウム結晶が沈着して石灰化する。骨の発生・成長に伴い石灰化は進行するが、そのメカニズムについては知見が乏しい。研究代表者の研究では、骨の石灰化進行の過程で、結晶の密度が上昇しリン酸カルシウムの組成が成熟する一方で、タンパク質等の有機質が減少することを示している。有機質の減少が結晶密度の上昇とリン酸カルシウムの組成の成熟に関連すると考えられる。これまでに研究代表者等は骨の発生・成長の過程で、骨芽細胞および骨細胞が MMP (マトリックス・メタロプロテアーゼ) -2, MMP-8, MMP-13 等の細胞外基質分解酵素を発現し、その酵素活性が骨に認められることを報告した。骨芽細胞と骨細胞から分泌された MMP が未熟な骨に含まれる基質タンパク質を積極的に分解し石灰化を進行させる可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

過去の研究では、MMP-2 遺伝子欠損マウスでは、骨の明らかな骨密度の低下、すなわちリン酸カルシウム結晶の密度の低下が報告されている。しかし MMP-2 遺伝子欠損マウスにおけるリン酸カルシウム結晶密度の低下が、リン酸カルシウム結晶の化学組成にどのように影響するかは不明である。そこで本研究では、MMP-2 遺伝子欠損マウスの脛骨を対象として、骨幹部皮質骨の骨密度をマイクロ X 線 CT で、またリン酸カルシウムを構成する元素を走査電子顕微鏡によるエネルギー分散型 X 線分析 (SEM-EDX) で解析し、野生型マウスと比較検討することとした。さらに組織学的検討も加え、MMP-2 遺伝子の骨成熟における役割を考察することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

野生型 C57BL/6J マウスは、SLC Corporation (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) から購入した。*Mmp2*<sup>-/-</sup> C57BL/6J マウスは、RIKEN BioResource Research Center (Tsukuba, Japan) から入手した。マウスは、東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設にて繁殖した。マウスの後肢の指の先端から組織を採取して DNA を抽出し、PCR により遺伝子型を決定した。実験期間中はマウス用固形飼料および水にて飼育した。また実験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。

#### (2) 試料作製

生後 7 週齢の雄性マウスおよび 2 5 週齢の雄性マウスをイソフルラン吸入麻酔後、ペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内に注射し全身麻酔を施し、4%パラホルムアルデヒド - 1%グルタルアルデヒド 0.1M リン酸緩衝溶液、pH7.4 または 4%パラホルムアルデヒド - 0.1M リン酸緩衝溶液、pH7.4 で灌流固定した。下肢を摘出し、4°C で同様の固定液で一晩、浸漬固定した。一部のマウスについては、イソフルランの深麻酔で安楽死させ、下肢を摘出して 4%パラホルムアルデヒド - 0.1M リン酸緩衝溶液、pH7.4、4°C で浸漬固定した。7 週齢の試料については、固定後、一方の下肢はマイクロ CT で解析し、他方の下肢は SEM-EDX で解析した。さらに、生後 10、22 および 50 週齢において、MMP-2 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスの下顎頭の組織構造を免疫組織化学的に検討した。

#### (3) マイクロ CT 解析

野生型 C57BL/6J マウスおよび *Mmp2*<sup>-/-</sup> C57BL/6J マウスの下肢をマイクロ CT (Scan Xmate - E090, Comscan, Kanagawa, Japan) を利用して撮影した。撮影条件は管電圧 89kv、管電流 99  $\mu$ A、管電力 8.8W、倍率 2.86、分解能 17.483  $\mu$ 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。骨体積 (BV,  $\text{cm}^3$ ) と骨塩量 (MBC, mg) を直接的に計測し、骨密度 (BMD=BMC/BV,  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) を算出した。

#### (4) 組織学的検討

試料をマイクロ CT で検討後、10% EDTA で脱灰してエタノール脱水しパラフィンに包埋した。切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H-E) またはアルシアン・ブルー (pH 2.5) で染色して組織学的に検討した。

#### (5) SEM-EDX

生後7週齢の野生型 C57BL/6J マウスおよび *Mmp2*<sup>-/-</sup> C57BL/6J マウスの下肢の試料は、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た。凍結包埋試料は脛骨の骨幹中央部を横断し、凍結乾燥してエネルギー分散型 X 線分析機能を装備した走査電子顕微鏡 (JSM-6390LA, EX-2300; JEOL, Tokyo, Japan) を用いて、SEM-EDX 解析した。横断面を対象にミネラルを構成する元素であるカルシウム、リン (Ca, P) と有機質を構成する元素である炭素 (C) の分布と濃度 (原子数%) を点 (領域) 分析で検討した。

#### 4. 研究成果

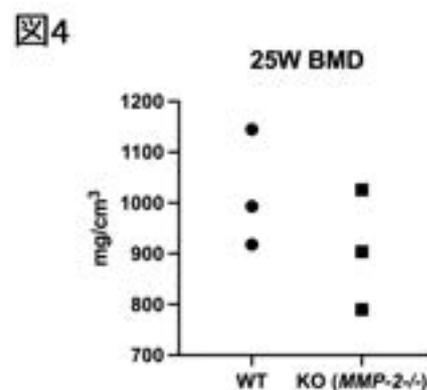
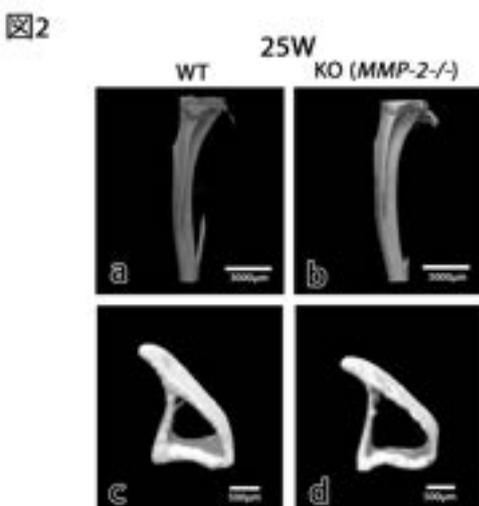
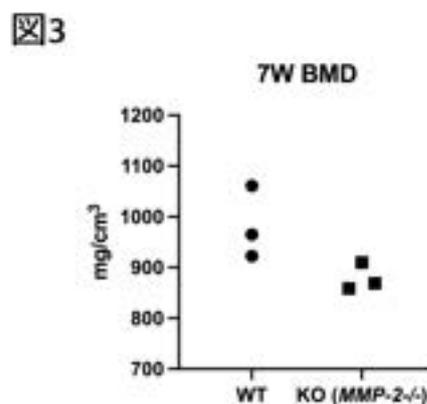
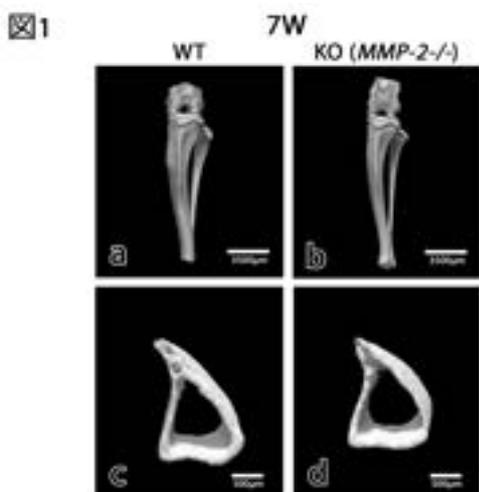
野生型マウスおよび MMP-2 遺伝子欠損マウスのそれぞれで、マイクロ X 線 CT の画像検討、および組織学的検討には同一個体の脛骨試料を用いた。また、マイクロ X 線 CT による骨密度解析および SEM-EDX の点 (領域) 分析による元素濃度解析には合計 3 個体の脛骨試料を利用した。

##### (1) マイクロ CT による三次元画像

野生型マウスおよび MMP-2 遺伝子欠損マウスの下腿を X 線マイクロ CT で撮影して三次元画像を構築し、下腿骨を可視化し検討した (図 1, 2)。生後7週齢および25週齢のそれぞれで、脛骨の外形と骨幹部中央の横断像の形状を野生型マウスと MMP-2 遺伝子欠損マウスの間で比較検討した。脛骨の外径は野生型マウスと MMP-2 遺伝子欠損マウスとの間で差異は明確ではなかった。一方、横断像の観察では、MMP-2 遺伝子欠損マウスで脛骨の皮質骨が薄い傾向が見られた。

##### (2) 骨密度

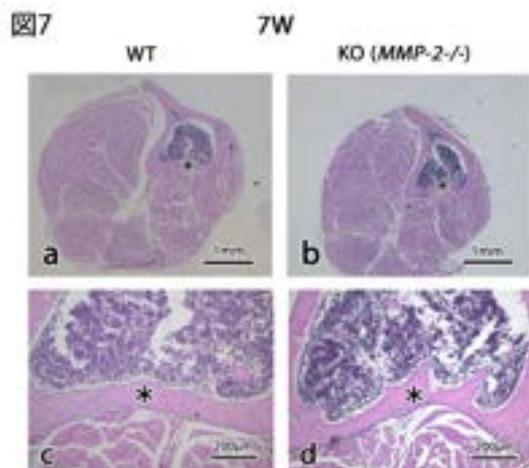
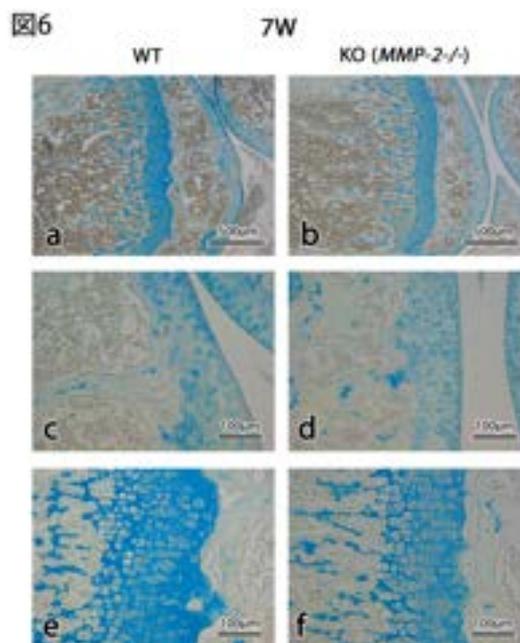
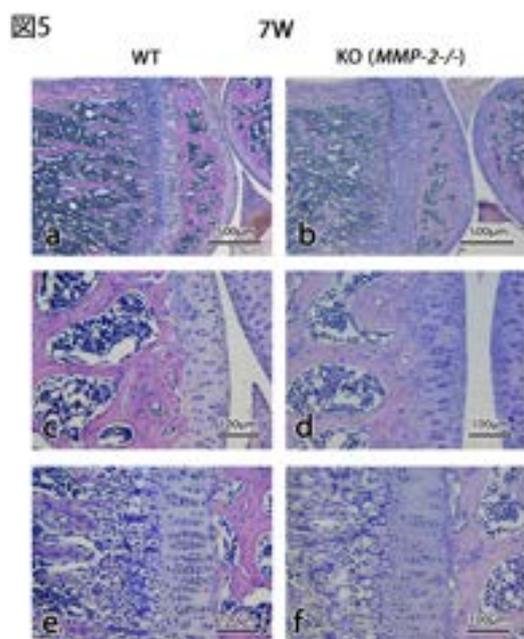
骨幹中央 1/3 の部位の脛骨皮質骨の骨密度を解析した。野生型マウス同士および MMP-2 遺伝子欠損マウス同士のそれぞれで、個体間の骨密度にばらつきは見られたが、生後7週齢と25週齢の双方において、MMP-2 遺伝子欠損マウスの骨密度は野生型マウスに比較して低い傾向が認められた (図 3, 4)。

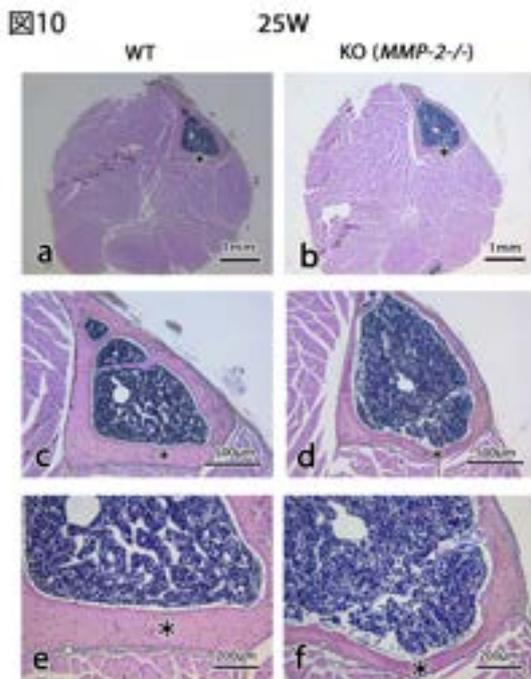
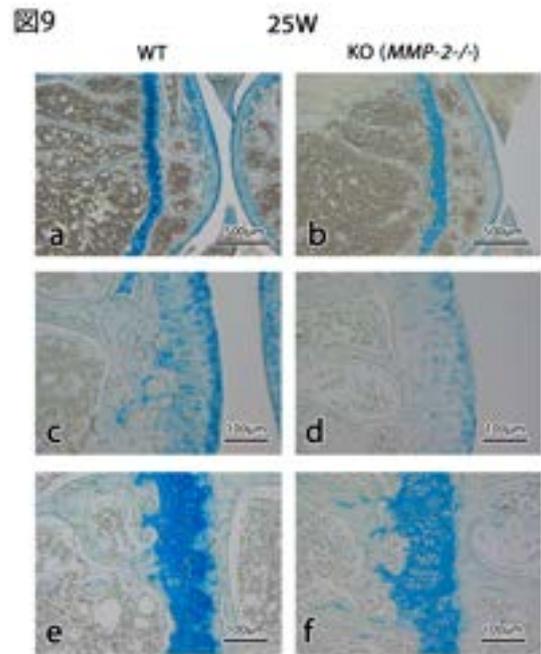
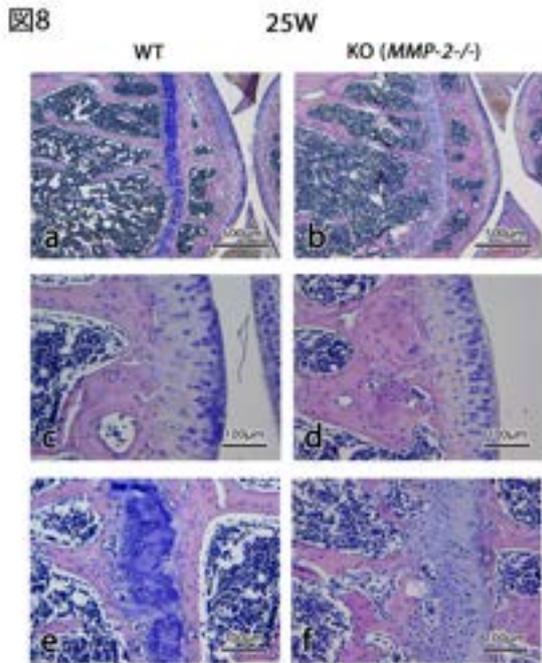


### (3) 組織学的検討

ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色の組織像 (図 5, 8) では、野生型マウスと MMP-2 遺伝子欠損マウスとの間で骨組織には大きな違いは認めなかった。一方、生後 7 週の試料 (図 5) では、成長板の軟骨細胞の密度は野生型マウスで高く、MMP-2 遺伝子欠損マウスで低い傾向が見られた。アルシアン・ブルー染色 (図 6, 9) では、骨組織、軟骨組織とも、野生型マウスと MMP-2 遺伝子欠損マウスで違いは認められなかった。

脛骨骨幹部中央の横断像 (図 7, 10) の検討では、MMP-2 遺伝子欠損マウスで皮質骨が薄い傾向が見られた。さらに野生型マウスでは骨髄腔に面する骨面が滑らかだったのに対して、MMP-2 遺伝子欠損マウスでは凹凸が顕著であった。また、下顎頭の試料では骨組織における骨髄腔の拡大は特に生後 50 週齢の KO で特に顕著で、MMP-9 およびカタレプシン K 陽性の破骨細胞が特徴的に認められた。





#### (4) SEM-EDX

生後7週齢及び12週齢の試料について、野生型マウスとMMP-2遺伝子欠損マウスとそれぞれ3個体の脛骨骨幹中央部の横断像で、皮質骨に計測領域を設定し分析した。カルシウム (Ca)、リン (P)、炭素 (C) のそれぞれの濃度において、野生型マウスとMMP-2遺伝子欠損マウスの違いは認められなかった。また、元素濃度比Ca/Pにも両者の違いは見られなかった。

#### 【まとめ】

成長過程でMMP-2が骨における石灰化と組織構築に役割を担うことが示唆された。なお、本研究では、当初の目的は骨欠損に形成される再生骨の解析であったが、研究の途上、再生過程の対照として検討していた成長過程でさえ、MMP-2欠損における骨のリン酸カルシウム結晶の化学組成と組織構築に関して情報が乏しいことが認識され、成長過程の解析に注力することとなり、再生過程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 4件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Yang Mu-Chen, Nakamura Megumi, Kageyama Yoko, Igari Yohei, Sasano Yasuyuki  | 4. 巻<br>69                |
| 2. 論文標題<br>Age-Related Gene and Protein Expression in Mouse Mandibular Condyle Analyzed by Cap Analysis of Gene Expression and Immunohistochemistry             | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Gerontology   | 6. 最初と最後の頁<br>1295 ~ 1306 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1159/000533921  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Sasano Y, Konno A, Nakamura M, Henmi A, Mayanagi M, Yang MC, Yao I  | 4. 巻<br>44(4)             |
| 2. 論文標題<br>Visualization of the localization of phospholipids in developing rat teeth by matrix-assisted laser desorption-ionization imaging mass spectrometry. | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Biomedical Research   | 6. 最初と最後の頁<br>173-179     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2220/biomedres.44.173.  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Yang MC, Nakamura M, Mayanagi M, Sasano Y   | 4. 巻<br>44(2)             |
| 2. 論文標題<br>Immunohistochemical characterization of the mandibular condyle for type I and II collagen, aggrecan, MMP-9, and MMP-13 in MMP-2-deficient mice.      | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Biomedical Research   | 6. 最初と最後の頁<br>65-72       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2220/biomedres.44.65.   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |
| 1. 著者名<br>庄子昌利, Mu Chen Yang, 真柳みゆき, 萱場敦子, 笹野泰之   | 4. 巻<br>41・42             |
| 2. 論文標題<br>MMP-2遺伝子欠損マウスの脛骨における組織構造と石灰化に関する検討   | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>東北大学歯学雑誌  | 6. 最初と最後の頁<br>21-26       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Mayanagi Miyuki, Nakamura Megumi, Henmi Akiko, Sasano Yasuyuki   | 4. 巻<br>64              |
| 2. 論文標題<br>The visualization of the mineral and protein distribution in the same histological sections of rat calcified growth plate cartilage | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Oral Biosciences  | 6. 最初と最後の頁<br>461 ~ 464 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.job.2022.08.005  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kageyama Yoko, Nakamura Megumi, Igari Yohei, Yamaguchi Satoshi, Oguchi Akiko, Murakawa Yasuhiro, Hattori Yoshinori, Sasano Yasuyuki | 4. 巻<br>57              |
| 2. 論文標題<br>Expression of matrix metalloproteinase 3 and 10 is up regulated in the periodontal tissues of aged mice                            | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Periodontal Research   | 6. 最初と最後の頁<br>733 ~ 741 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/jre.12996   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakamura Megumi, Yang Mu-Chen, Ashida Keijyu, Mayanagi Miyuki, Sasano Yasuyuki  | 4. 巻<br>97              |
| 2. 論文標題<br>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<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Anatomical Science International  | 6. 最初と最後の頁<br>213 ~ 220 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s12565-021-00643-6  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Caiyu Liao, Nakamura Megumi, Mayanagi Miyuki, Kayaba Atsuko, Sasano Yasuyuki                            | 4. 巻<br>63              |
| 2. 論文標題<br>Three-dimensional visualization of osteoclasts in embryonic mouse mandibles using SEM array tomography | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Oral Biosciences   | 6. 最初と最後の頁<br>401 ~ 407 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.job.2021.10.003   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|   |                        |
|---|------------------------|
| 1. 著者名<br>Li Xinghan, Nakamura Megumi, Tian Weidong, Sasano Yasuyuki  | 4. 巻<br>11             |
| 2. 論文標題<br>Application of cryopreservation to tooth germ transplanted for root development and tooth eruption | 5. 発行年<br>2021年        |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>(1):9522 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-021-88975-1  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する           |

[学会発表] 計10件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Mu Chen Yang, Megumi Nakamura, Yasuyuki Sasano  |
| 2. 発表標題<br>Immunohistochemical localization of MMP-9, MMP-13, and extracellular matrix proteins in the mandibular condyle of MMP-2-deficient mice. |
| 3. 学会等名<br>第65回歯科基礎医学会学術大会   |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>菅野千春, 中村恵, 大方広志, 山本寿則, 笹野泰之      |
| 2. 発表標題<br>マウス実験的歯周炎におけるMMP9とMMP13の発現に関する検討 |
| 3. 学会等名<br>第66回秋季日本歯周病学会学術大会                |
| 4. 発表年<br>2023年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中村 恵、Yang Mu-Chen、笹野 泰之        |
| 2. 発表標題<br>マウス実験的歯周炎における歯槽骨吸収に対する加齢と炎症の影響 |
| 3. 学会等名<br>第65回歯科基礎医学会学術大会                |
| 4. 発表年<br>2023年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中村恵, Mu-Chen Yang, 山口哲史, 大方広志, 笹野泰之 |
| 2. 発表標題<br>マウス実験的歯周炎モデルを用いた加齢と炎症が及ぼす歯槽骨吸収への影響  |
| 3. 学会等名<br>第66回秋季日本歯周病学会学術大会                   |
| 4. 発表年<br>2023年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中村恵, Mu-Chen Yang, 笹野泰之                                       |
| 2. 発表標題<br>下顎骨発生における破骨細胞・破軟骨細胞の役割と意義                                     |
| 3. 学会等名<br>第128回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「骨発生・成長における破骨細胞と周囲の細胞群の連携機構」(招待講演) |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Mu-Chen Yang, Megumi Nakamura, Yasuyuki Sasano   |
| 2. 発表標題<br>Whole transcriptome analysis with CAGE revealed that MMPs-3, -9, and -13 were differentially expressed in the mandibular condyle of aged mice. |
| 3. 学会等名<br>第128回日本解剖学会総会・全国学術集会   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>北構-原口真衣, 長谷川智香, 網塚憲生, 笹野泰之            |
| 2. 発表標題<br>副甲状腺ホルモン投与による骨芽細胞の基質石灰化と骨細胞分化の組織化学的解析 |
| 3. 学会等名<br>第128回日本解剖学会総会・全国学術集会                  |
| 4. 発表年<br>2023年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>笹野泰之  |
| 2. 発表標題<br>硬組織の発生と修復の過程における石灰化進行機構                       |
| 3. 学会等名<br>明海大学 歯学部 第412回研修会・第282回大学院FD研修会（総合セミナー）（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中村恵、Mu-Chen Yang、笹野 泰之                                 |
| 2. 発表標題<br>下顎の発生課程において石灰化組織吸収に寄与する細胞                              |
| 3. 学会等名<br>第64回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム 「骨形成の場を整える吸収系細胞の検討」（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中村恵、笹野泰之                                  |
| 2. 発表標題<br>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<br>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<br>2021年                                      |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-----------|--|--------------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | Yang MuChen<br><br>(Yang MuChen)<br><br>(50886447) | 東北大学・歯学研究科・助教<br><br><br><br>(11301) |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 鈴木 治<br><br>(Suzuki Osamu)<br><br>(60374948) | 東北大学・歯学研究科・教授<br><br><br><br>(11301)    |    |
| 研究分担者 | 矢尾 育子<br><br>(Yao Ikuko)<br><br>(60399681)   | 関西学院大学・生命環境学部・教授<br><br><br><br>(34504) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |