

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2011～2014
課題番号：23370090
研究課題名(和文)メダカをモデル生物に用いた骨形成分子機構の解明

研究課題名(英文)Bone formation system in medaka

研究代表者

工藤 明(Kudo, Akira)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：70178002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円

研究成果の概要(和文)：私達はメダカを骨形成のモデル生物として開発しており、その一つとして、メダカの尾びれを用いて、血管損傷のない新たな骨折修復モデルを作成し、破骨細胞と骨芽細胞について解析した。生きたままの状態ですべての経時変化で骨折の修復過程を観察でき、破骨細胞と骨芽細胞の関連した動きが解析可能になった。さらにRANKLに依存しない破骨細胞の存在が明らかになり、この破骨細胞の分化に關与する新しい破骨細胞因子を明らかにする必要がある。以上のように、メダカの骨リモデリングシステムの確立とその解析から、これまで哺乳類では見つかっていない新しい細胞間相互作用と破骨細胞分化の存在が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The fracture healing research revealed that generally osteoblasts are induced to enter the fracture site before the induction of osteoclasts for bone remodeling. We developed a new fracture healing model by using medaka. We fractured one side of lepidotrichia in a caudal fin ray without injuring the other soft tissues including blood vessels. Using the transgenic medaka in which osteoclasts and osteoblasts were visualized by GFP and DsRed, respectively, we found that two different types of functional osteoclasts were induced before and after osteoblast callus formation. The early-induced osteoclasts resorbed the bone fragments and the late-induced osteoclasts remodeled the callus. Both types of osteoclasts were induced near the surface on the blood vessels, while osteoblasts migrated from adjacent fin ray. Our developed medaka fracture healing model brings a new insight into the molecular mechanism for controlling cellular behaviors during the fracture healing.

研究分野：骨生物学

キーワード：メダカ 骨形成 骨芽細胞 破骨細胞 骨リモデリング 骨折修復 咽頭歯骨 eda

1. 研究開始当初の背景

骨は体幹を作る最も重要な器官であるが、どのように骨が発生してくるのか、ほとんどわかっていない。これまでマウスを用いた実験で、細胞生物学的な解析からは *cbfa1*, *BMP-2* に代表される骨形成に必須な転写因子、分化因子が解明されてきたが、骨の基本的な形態がどのように形作られるかほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

メダカは透明で器官形成が見えること、トランスジェニックが作りやすくその蛍光の光で骨形成がトレースできること、さらに突然変異体が得られ、その原因遺伝子を発見しやすいことが挙げられる。我々はこのメダカを実験モデル生物として使い、骨発生・形成の基本的なシステムを解明する。特に、椎骨の発生システムは我々がメダカを用いることによって世界に先駆けて一部の解明を果たし、今後の研究発展が期待される。

3. 研究の方法

メダカを用いた新たな骨発生・形成、椎骨形成について以下の4項目について検討する。

- (1). 椎骨パターンニングの解明
- (2). 椎骨形成の細胞系譜
- (3). 神経棘・血管棘形成における破骨細胞の活性化と神経管・血管の役割
- (4). 骨形成突然変異体の解析

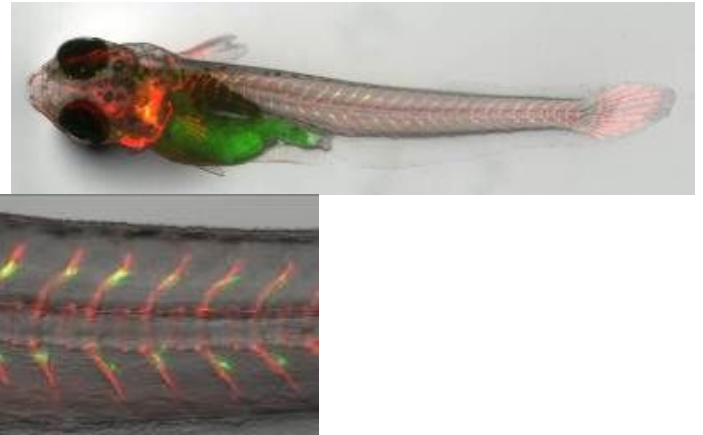
4. 研究成果

- (1). 骨特異的メダカトランスジェニックラインの作製とその観察

これまで作成した、造骨特異的メダカトランスジェニックライン、破骨特異的メダカトランスジェニックラインを駆使し、器官形成時の造骨と破骨の動きを同時に観察した。

下図が骨芽細胞を可視化した *Osterix* プロモーター-DsRed と破骨細胞を可視化した TRAP (酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ) プロモーター-GFP とのダブルトランスジェニックメダカであ

る。



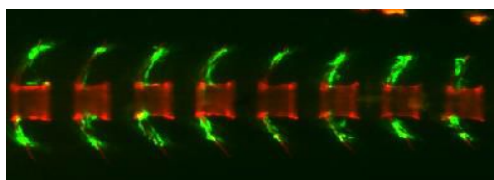
下の拡大図のように神経棘、血管棘の骨芽細胞、破骨細胞の様子が生きたまま観察できる。我々の仮説は、神経棘や血管棘の、内側の破骨と外側の造骨が同調して神経棘や血管棘の大きさをコントロールするという事、もう一つは神経管と神経棘、血管と血管棘がそれぞれ器官の成長において同調的に作用し、大きさの決定をするということである。後者については、ゼブラフィッシュの *c-fms* 変異体において、破骨細胞が少ないときに血管棘のすきまがなくなり、血管が通れなくなるのが観察されており (Chatani et al., *Developmental Biology* 2012)、骨と血管の成長は関わりがあるのが明らかになった。

- (2). 椎骨における骨発生・代謝システムの解明

これまでメダカ骨代謝研究において、マウスでの解析では見つからなかった新しい骨代謝制御が、トランスジェニックメダカを用いた椎体全体像の解析から見えてくる。以下 RANKL と OPG ノックアウトメダカについての最新成果を述べる。

下図は *osterix-DsRed/TRAP-GFP* のダブルトランスジェニックメダカを RANKL ノックアウトメダカと掛け合わせたものである。左の野生型では神経棘と血管棘の内側に特異的に破骨細胞が存在する。一方、RANKL ノックアウトメダカでは予想に反し、緑色の蛍光で示す破骨細胞がわずかではあるが検出

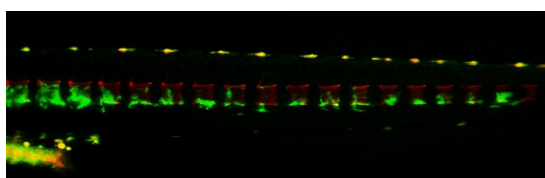
された。これはマウスでは見つかっていない RANKL 以外の新たな破骨細胞分化因子の存在を示唆している(茶谷ら、日本骨代謝学会発表、2014)。



上 : RANKL (+/+)

下 : RANKL (-/-)

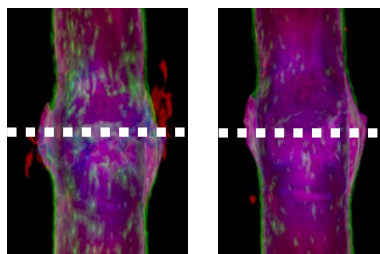
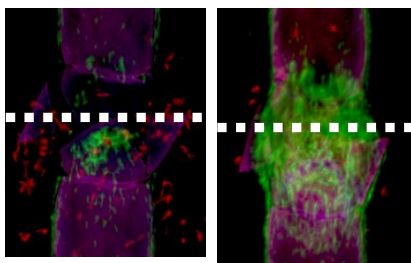
同様に osterix-DsRed/TRAP-GFP ダブルトランスジェニックと掛け合わせた以下の OPG ノックアウトメダカでは通常メダカの椎体にはいない緑の破骨細胞が多く見られ、



上図 : OPG (-/-)

OPG が、どの骨を破骨細胞が吸収するのか決めていられると思われる(茶谷ら、アメリカ骨代謝学会発表 2014)。これらの2つの結果は、全身性の骨代謝動態を観察することにより新しい骨代謝システムの発見が可能であることを示している。

(3). 骨折全体像の解析



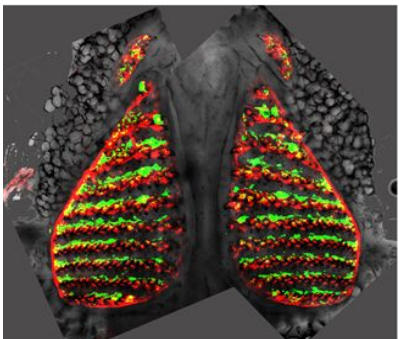
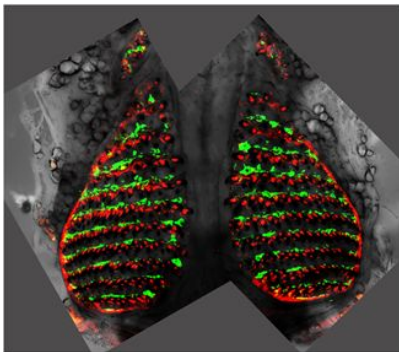
左下図と上図の説明； 左下図から上図にかけて順に、骨折後 3 日目、7 日目、15 日目、25 日目

メダカ骨折システムを確立し、その全体像の観察が可能になった結果、新しい破骨細胞分化機構を解明できるようになった。左下図と上図はメダカ尾びれ骨折修復の時間経過を示したものである(武山ら、日本骨代謝学会発表 2014、Developmental Biology 2014)。赤の蛍光は破骨細胞(TRAP-DsRed)、緑の蛍光は骨芽細胞(Osterix-GFP)を示し、骨折後生きたままで骨折修復全体像を観察できる。以上の骨折 3 日目に出現する破骨細胞は、RANKL ノックアウトメダカには見られないことから RANKL 以外の破骨細胞分化因子によって分化誘導されており、その前駆細胞は壊れていない正常な血管から遊走してくる(武山ら Developmental Biology 2014)。

以上のようにこれまでマウスの解析では見つかっていない新しい骨代謝現象について、メダカを用いて in-vivo における細胞と遺伝子レベルの解析を行うことにより、新しい骨代謝研究を創生できる。その結果、新しい破骨分化因子の同定と、破骨細胞プロジェニターが何を認識して血管から遊走してきて骨吸収サイトへの移動するのか、血管から骨への移行と、その間に起きる破骨細胞プロジェニターから成熟破骨細胞への破骨細胞分化機構が明らかになる。その解明は破骨細胞がどのように新しい骨と古い骨を見分けるのか、究極の骨代謝学の課題の解明につながる。

(4). 無重力下における骨量の減少

骨形成におけるメカニカルストレスの関与は未解明のまま残されている。この問題解明の難しさはその実験モデルにある。骨と筋肉の動物モデルはいずれも炎症を伴い、種々のサイトカイン、細胞外マトリックス、酵素が関与するために、メカニカルストレスに目標を絞るのが難しく、またin-vivoモデルが必要なため、解析系が複雑になっていた。従って、これまでメカニカルストレスが重要な作用をすることがよく知られていたのは、宇宙空間において、無重力下で宇宙飛行士が骨量減少と筋萎縮を起こすことであり、現在でもこの2つは宇宙の長期滞在での大きな不安要因である。私達は宇宙開発事業団との共同研究で、2012年10月から2か月間にわたりメダカの稚魚を宇宙ステーションで飼育し、そのサンプルを用い、無重力が骨形成に与える影響について解析を行った(論文投稿中)。用いたメダカは下図のように、骨芽細胞が赤の蛍光で光り、破骨細胞が緑の蛍光で光るダブルトランスジェニックメダカであり、



Osterix-DrRed/TRAP-GFP double transgenic medaka
(上図は1Gコントロール、下図は無重力下の咽

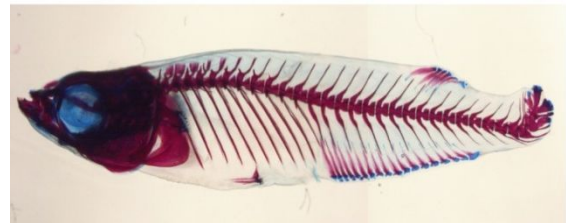
頭歯骨)

このメダカを無重力下で56日間飼育すると左下図のように、咽頭歯の緑の蛍光が増加し、この結果、破骨細胞の活性が強くなり、骨吸収活性が大きくなり、骨量の減少が見られる。このようにメダカは無重力の影響が咽頭歯骨全体にどのように影響するのか、メダカ咽頭歯骨は解析しやすい優れた骨モデリングのモデル器官である。

(5). 骨形成突然変異体の解析

メダカを骨形成のモデルとして用いるもう一つの優位点として、骨の変異体を作成し、その遺伝子をクローニングすることで骨形成を制御する新たな遺伝子を明らかにすることができる。

下図はすべてのヒレの骨が欠損している突然変異体 *afl* の骨(赤)と軟骨(青)の組織像である。



原因遺伝子を解析した結果、*afl* 遺伝子座は *eda* 遺伝子 (Iida et al. Developmental Dynamics 2014) をコードしている。変異体 *afl* は主に頭部骨、うろこ、すべてのヒレ骨の形成異常を示し、その原因遺伝子 *eda* (ectodysplasin A) は TNF family の1つであり、そのレセプター EDA-R と結合して、そのシグナルを細胞に伝える。我々はヒレの骨形成においてどのように *eda* が機能しているのか、そのレセプターからのシグナルについて検討したところ、*eda* シグナルはヒレの骨である軌条の先端部分の細胞の移動を制御することにより、続けて起こる骨形成に機能することが明らかになった。

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 6 件)以下すべて査読有

(1). Taimatsu, K., Takubo, K., Maruyama, K., Suda, T. and Kudo, A. Proliferation following tetraploidization regulates the size and number of erythrocytes in the blood flow during medaka development, as revealed by the abnormal karyotype of erythrocytes in the medaka *TFDPI* mutant. *Dev. Dyn.* 244: 651-668 (2015) doi: 10.1002/dvdy.24259

(2) . Takeyama, K., Chatani, M., Takano, Y. and Kudo, A. In-vivo imaging of the fracture healing in medaka revealed two types of osteoclasts before and after the callus formation by osteoblasts. *Dev. Biol.* 394: 292-304 (2014) doi: 10.1016/j.ydbio.2014.08.007

(3) . Ito, K., Morioka, M., Kimura, S., Tasaki, M., Inohaya, K. and Kudo, A. Differential reparative phenotypes between zebrafish and medaka after cardiac injury. *Dev. Dyn.* 243: 1106-1115 (2014) doi: 10.1002/dvdy.24154

(4) . Iida, Y., Hibiya, K., Inohaya, K. and Kudo, A. Eda/Edar signaling guides fin ray formation with preceding osteoblast differentiation, as revealed by analyses of the medaka all-fin less mutant *afl*. *Dev. Dyn.* 243: 765-777 (2014) doi: 10.1002/dvdy.24120

(5) .Fujita, M., Mitsunashi, H., Isogai, S., Nakata, T., Kawakami, A., Nonaka, I., Noguchi, S., Hayashi, Y. K., Nishino, I. and Kudo, A. Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant *zacro*. *Dev. Biol.* 361: 79-89 (2012) doi: 10.1016/j.ydbio.2011.10.008

(6). Chatani, M., Takano, Y. and Kudo, A. Osteoclasts in bone modeling, as revealed by *in vivo* imaging, are essential for organogenesis in fish. *Dev. Biol.* 360: 96-109 (2011) doi: 10.1016/j.ydbio.2011.09.013

〔学会発表〕(計 5 件)

(1). Masahiro Chatani, Yoshiro Takano, Takeshi Todo, Akira Kudo. The whole-body analysis employing RANKL *-/-* and OPG *-/-* medaka fish reveals the *in vivo* bone resorption system. Annual Meeting of ASBMR (The American Society for Bone and Mineral Research) 2014 Sep. 12-15, 2014, Houston, Texas, USA

(2). Akiko Mantoku, Masahiro, Chatani, Keiji Inohaya, Akira Kudo. Tooth regeneration with

the cooperative action of osteoclasts and osteoblasts. 47 th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. May 27-30, 2014 WINC AICHI (愛知県・名古屋市)

(3). Masahiro Chatani, Tomoko Ishikawa, Takeshi Todo, Akira Kudo. The rankl knock-out medaka exhibits a defective phenotype of bone resorption following abnormal organogenesis together with a small number of osteoclasts regulated by RANKL-independent osteoclastogenesis. Annual Meeting of ASBMR 2013, Oct. 4-7, 2013, Baltimore, Maryland, USA

(4). Kazuhiko Takeyama, Masahiro Chatani, Yoshiro Takano, Akira Kudo. Cyclooxygenase-2 signaling regulates osteoclast differentiation during fracture healing in medaka. 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. May 28-31, 2013, Kunibiki Messe (島根県・松江市)

(5). Kohei Ito, Masanobu Nishidate, Taku Akiyama, Mai Morioka, Shun Kimura, Akira Kudo. Differential expression patterns of two types of medaka periostin during development and adulthood. 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. May 28-31, 2013, Kunibiki Messe (島根県・松江市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kudo.bio.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

工藤 明 (KUDO Akira)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
教授

研究者番号：70178002

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号：