

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592694

研究課題名(和文) ミネラルとプロテオームの解析を用いた修復骨成熟過程における MMP の役割の検討

研究課題名(英文) Investigation of the role of MMP in bone healing with mineral and proteome analyses

研究代表者

笹野 泰之 (SASANO, YASUYUKI)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30196191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：ラット頭頂骨規格化骨欠損実験系を用いて、修復骨基質の石灰化を検討することを目的とした。全身麻酔下に、生後 12 週齢ラットの頭頂骨に規格化骨欠損を作製し、術後 1 週、2 週、4 週および 8 週の段階で形成された修復骨の骨密度と Ca, P, C の元素の分布と相対的な濃度を解析した。骨の修復過程において、修復骨基質の量的な増大に並行して、有機質が減少しミネラルが成熟して石灰化が進行することが示された。また、ラット頭蓋骨発生・成長過程も検討し、同様に石灰化が有機質の減少を伴いながら進行することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to investigate the process of calcification during bone healing in a standardized rat calvarial bone defect model. A standard defect with diameter 3.8 mm was made on the parietal bone of 12-week-old male Wistar rats under anesthesia. The healing bone was analyzed with micro-computed tomography and energy dispersive X-ray spectroscopy in weeks 1, 2, 4 and 8. The bone mineral density and the Ca/P ratio increased, whereas the C/Ca and C/P ratios decreased during bone healing. The present study demonstrated that the mineral components increase in density and mature in quality while organic components decrease. Our following study revealed the comparable calcification process during development of rat calvarial bone development.

研究分野：形態系基礎歯科学・口腔解剖学・組織学・発生学

キーワード：骨 修復 石灰化 マイクロCT 分析走査電子顕微鏡 頭蓋骨 ラット 発生・成長

1. 研究開始当初の背景

胎生期や生後の骨の発生成長過程では、細胞外マトリックス分子の集積、ミネラル結晶の増大と成熟および細胞外マトリックス分子の分解などの特徴的な現象が細胞外で複合して起こることが知られている。一方、骨の修復過程においても、同様な細胞外現象が重要な役割を担うと考えられるが、その知見は乏しい。成長因子、生体材料や物理学的刺激など、骨修復を促進する因子や手段については広範に研究されてきた。一方、骨修復それ自体の生物学的な理解は乏しい。骨修復に際して、骨基質を構成するミネラルがどのように集積され、石灰化がどのように進行するかは不明である。また、修復骨の石灰化が正常な骨の水準に達するか否かも知られていない。

2. 研究の目的

本研究はラット頭蓋骨規格化骨欠損実験系を利用し、修復骨における石灰化の進行を検討することを目的とした。石灰化状態は、マイクロCTで解析した骨密度および走査電子顕微鏡によるエネルギー分散型X線分析(SEM-EDX)で得られた骨基質の構成元素(Ca、P、C)の分布と濃度で評価した。

さらに、修復骨の形成過程を深く理解するため、ラット頭蓋骨発生・成長過程の試料を作製し同様に検討した。

3. 研究の方法

(1)実験動物

生後12週齢Wistar系雄性ラット(体重250-300g)を用いた。使用ラットはSLC(Kotoh, Shizuoka, Japan)より購入し、実験期間中はラット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)ラット頭蓋骨規格化骨欠損実験系

ラット頭頂骨に以下の操作で規格化骨欠損を作製した。イソフルランを吸入麻酔後、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た。両側側頭線に沿って約1.5cmの皮膚切開を加え、皮膚、骨膜の順に剥離・翻転し、頭頂骨を露出させた。右側頭頂骨に直径3.8mmのトレフィンバーを用いて、生理食塩水注水下に、骨を貫通する円形の規格化骨欠損を作製した。この際、脳硬膜を損傷しないように留意した。剥離・翻転した皮膚、骨膜を復位後縫合した。

(3)実験試料作製

術後一定期間飼育し、骨欠損作製後1週、2週、4週、8週の各時点において、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-0.1Mリン酸緩衝液、pH7.4で灌流固定した。固定後、頭蓋骨を摘出し、4°Cで固定液に一昼夜浸漬後マイクロCTにて観察した。生後12週齢Wistar系雄性ラットを同様の方法にて固定し、コントロールとした。

(4)マイクロCT解析

術後1週、2週、4週、8週の各時点とコントロール各7匹、計35匹のラット頭蓋骨を用い、マイクロCT(ScanXmate-E090, Comscan, Kanagawa, Japan)を利用した解析を一定の条件下にて行った。撮影条件は管電圧80kv、管電流120μA、管電力10W、倍率1.8、分解能27.3μm/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。閾値は、胎生18日ラットの軟組織と骨組織を分離する値を視覚的に検討し、決定した。欠損部に相当する部位をコントロール頭蓋骨において同様に測定し、石灰化の指標として用いた。3次元解析ソフトにて、骨欠損領域に認められた修復骨の骨体積(BV, cm³)と骨塩量(BMC, mg)を直接的に計測し、骨密度(BMD=BMC/BV, mg/cm³)を算出した。

(5)組織学的検討

頭蓋骨を、ヘキサソールとドライアイスを用い4%CMC(Carboxymethyl cellulose sodium salt)(Leica Microsystems, Japan)で凍結包埋し、切片を作製した。非脱灰でCryo transfer kitを利用し、欠損中央部まで連続凍結切片(20μm厚)を作製した。得られた組織切片にトルイジンブルー染色を施し検討した。

(6)走査電子顕微鏡によるエネルギー分散型X線分析(SEM-EDX)

非脱灰連続切片を作製し残った試料は、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、凍結乾燥した。得られた試料を走査電子顕微鏡(JSM-6390 LA, EX-2300, JEOL, TOKYO, Japan)の試料台に切片作製断面を上として炭素テープで直立させ、保持した。測定部位は欠損中央部の断面とした。断面を対象にミネラルを構成する元素(Ca, P, C)の分布と濃度を元素マッピング、線分析および点分析で検討した。さらに、点分析の結果から元素の濃度比Ca/P、C/CaおよびC/Pを算出した。解析対象は各時点において7個体とした。

(7)統計処理

頭蓋骨規格化骨欠損作製後1週、2週、4週、8週の各時点、及びコントロールの各7個体(n=7)を解析した。統計解析にはSPSS 16.0 J for Windows (SPSS Japan inc, Tokyo,

Japan)を用いた。マイクロ CT 解析で得られた骨密度 (BMD) については、一元配置分散分析を施行後 Bonferroni 法を用い、また SEM-EDX から得られた元素の濃度比 Ca/P、C/Ca および C/P については、一元配置分散分析を施行後 Games-Howell 法を用いて多重比較検定を行った。有意水準は 5% 未満 ($p < 0.05$) で検討した。

(8) 頭蓋骨発生・成長過程の検討

胎生 16、18、20 日齢、生後 1、6 週齢のラットを固定し、頭部を試料とした。その後、試料を非脱灰で上記(6)と同様に凍結包埋して頭蓋骨前方部まで前頭方向に切片を作製し、組織学的に検討した。また、切片を得た凍結包埋試料を凍結乾燥し、断面を対象に分析走査電子顕微鏡 (SEM-EDX) を用いて構成元素 (Ca, P, C) の分布と相対的な濃度を解析した。さらに、X 線回折 (XRD) および赤外分光法 (FT-IR) により、各発生・成長段階のラット頭蓋骨基質の結晶を解析した。

4. 研究成果

(結果)

頭蓋骨規格化骨欠損作製後 1 週、2 週、4 週、8 週の各時点、及びコントロールの各 7 個体、計 35 個体を分析検討した。

(1) マイクロ CT 画像

術後 1 週の段階で、骨欠損部に形成された修復骨が確認された。修復骨は、周囲の既存骨より伸長していたが、ときに欠損部内に島状に孤立して観察された。術後 8 週の段階では、欠損部は修復骨によりほぼ覆われた状態であった。修復骨は既存骨と接する周辺部において厚みがあり、欠損中央部で薄い形状であった。

(2) 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

術後 1 週の段階で、骨欠損部に形成された修復骨が認められた。術後 1 週、2 週、4 週、8 週と術後週齢が増すに伴い、修復骨は伸長し厚みを増した。また、術後 1 週で粗造であった骨基質は術後 8 週で密な構造となり、コントロールの構造に近づいた。

(3) 組織学的検討

術後 1 週の段階で既存骨から伸長した修復骨が観察された。骨表面には骨芽細胞が見られ、骨基質内に骨細胞が認められた。術後 1 週、2 週、4 週、8 週と術後週齢が増すに伴い、修復骨は伸長し厚みを増した。また、術後週齢とともに、骨基質は密な構造となった。

(4) 骨密度

修復骨の体積 (BV) は術後 8 週で術後 1 週の約 11 倍となり、骨塩量 (BMC) は約 30 倍となった。BV と BMC から算出した骨密度 (BMD)

は術後 8 週で術後 1 週の約 3 倍だった。術後 8 週の BMD は術後 1 週、2 週および 4 週より有意に高く、術後 4 週の BMD は術後 1 週および 2 週より有意に高かった。術後 2 週の BMD は術後 1 週より有意に高かった。一方、術後 1 週、2 週、4 週及び 8 週の BMD は、コントロールより有意に低かった。

(5) エネルギー分散型 X 線分析 (EDX)

元素マッピング

修復骨における元素マッピングの結果、Ca は骨基質に特異的に集積していた。P の元素分布は Ca の元素分布にほぼ対応していた。一方、C は Ca と P が集積していない領域に集積し、C の元素分布は Ca と P の元素分布と相補的であった。術後 1 週から 8 週にかけて、修復骨の増大に伴い Ca および P の分布領域は拡大し、C の分布領域は縮小した。

線分析

線分析の結果、Ca と P の線分析値は類似した。一方、C の値は Ca と P が低い値を示す部位で高く、Ca と P が高い値を示す部位で低かった。Ca、P、C の線分析値は術後 1 週で大きく変動していたが、術後週齢に伴い変動は小さくなった。

点分析

各術後週齢の修復骨およびコントロールのそれぞれ 7 個体の観察面において、Ca 濃度が高い点を任意に 7 点抽出し点分析した。Ca の P に対する濃度比 (Ca/P) は術後 4 週、8 週およびコントロールで術後 1 週より有意に高かった。一方、C の Ca と P それぞれに対する濃度比 (C/Ca, C/P) はいずれも術後 1 週、2 週および 4 週でコントロールより有意に高かった。

(6) 頭蓋骨発生・成長過程

組織切片上で、胎生 16 日に頭蓋骨の形成が認められた。SEM-EDX による分析では、Ca と P の元素分布は骨組織に一致して見られ、C の元素分布とは相補的であった。骨基質における元素濃度比 Ca/P は胎生 16 日で低く、発生・成長に伴い上昇する傾向が見られた。また、C/Ca、C/P は胎生 16 日で高く、胎生 18 日以降は低下した。さらに、XRD と FTIR による解析では、胎生 16 日以降生後 6 週に至る過程で骨基質の結晶構造が成熟することが示された。

(考察)

骨の成長に伴い骨体積が増加し、かつ骨密度が上昇することが知られている。骨欠損の修復過程でも、修復骨の伸長と厚みの増大の結果として骨体積の増加が認められるが、この体積増加に骨密度の上昇が伴うか否かは不明であった。そこで本研究では、ラ

ット頭蓋骨規格化骨欠損実験系を利用し、修復骨における骨密度(BMD)の動態を検討した。BMDは術後週齢に伴い漸次上昇し、術後8週で術後1週の約3倍に達した。本研究は骨欠損部に自己修復の機転で形成される修復骨の骨密度が、時間経過とともに上昇することを実験的に初めて示した。修復が進み修復骨の体積が増すに伴い、含まれるミネラルの密度が漸次上昇することが考えられる。これはミネラルに乏しい未熟な修復骨が欠損を埋めた後でミネラルが増大し密度が上昇するのではなく、ミネラル密度の上昇が修復骨の量としての増大と並行して進行することを示している。

骨のCa/P比は増齢で上昇するが、これに関連して、骨に含まれるミネラルは成熟するに伴い理想的なヒドロキシアパタイト結晶の化学分子量比(Ca/P = 1,67)に近づき、未熟な骨で認められる低いCa/P比はHAの前駆体に起因することが示唆されている。本研究では、修復骨のCa/P比が術後、漸次上昇する傾向を示した。骨の成長過程で報告されているように、骨の修復過程においても、骨に含まれるミネラルが経時的に成熟し、HAの結晶構造に近づくことが示唆される。ミネラルの成熟もミネラル密度の上昇と同様に、修復骨の量としての増大と並行することが考えられる。

術後8週のBMDは、コントロールの値に達しなかった。修復骨がコントロールすなわち既存骨と同等のBMDを獲得するためには、さらに時間を要するのかもしれない。修復骨の機械的特性に関しても、既存骨と同等に達するためには時間を要すると考えられる。

従来の研究は、胎生18日ラット頭蓋冠器官培養系を用い、ラット頭蓋骨の成長過程において骨基質を構成する元素であるCa、P、Cの分布と濃度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)で検討し、CaとPが集積する領域がほぼ共通するのに対して、CはCaとPが集積する領域でほとんど検出されず、CaとPが認められない領域に集積すると報告している。これは、骨が成長する過程で、CaとPからなるミネラルがCを主体とする有機質と置き換わる可能性を示唆している。一方、骨の修復過程において、同様の現象が認められるか否かは不明であった。本研究では、骨の修復過程において、骨基質を構成する元素であるCa、P、C元素の分布と濃度に関して元素マッピングと線分析を利用して検討した。その結果、修復過程におけるCaとPの集積はほぼ同様で骨基質に限られ、術後時間の経過に伴い拡大することが示された。一方、Cの集積は、骨中の結合組織等、CaとPが検出されない領域に限られ、Cの分布がCaとPの分布と相反し、相補的であることが示された。また、Cの集積領域が術後時間の経過に伴い縮小す

ることから、骨修復の過程で、骨成長過程と同様に、CaとPからなるミネラルがCを主体とする有機質と置き換わる可能性が示唆された。

骨の成長過程においては、ミネラルが増加し、有機質が減少することが報告されている。本研究におけるSEM-EDXを用いた分析で、骨修復の過程において骨基質のC/Ca比およびC/P比が低下する傾向が示された。前述のCaとPの集積する領域が拡大しCの集積領域が縮小する現象と同様に、C/Ca比およびC/P比の低下は、骨修復の進行に伴うCa、Pの増加とCの減少を反映しているのかもしれない。修復骨においてミネラルが増大して石灰化が進行するに伴い、有機質が分解され減少することも考えられる。

従来の研究は、骨の発生成長過程において、骨芽細胞と骨細胞がマトロプロテイナーゼ(MMPs)2,8,13を発現することを報告した。またMMP-2欠損マウスは長管骨において骨密度の低下と骨粗鬆症を示すと報告されている。MMPsは、骨発生成長において石灰化に参与する可能性が示されている。また、ラット頭蓋骨規格化骨欠損部における骨修復を検討した研究は、オステオカルシンやI型コラーゲンのような骨基質タンパクとともに、骨芽細胞と骨細胞がMMPs2,8,13を発現することを報告している。本研究で示唆された骨修復過程における有機質の減少の一因として、骨芽細胞と骨細胞によるMMPsを利用した有機質の分解が考えられる。

骨の修復過程を対象とした本研究では、修復骨基質の量の増大と並行して、ミネラルの増大と成熟および有機質の減少が進行することが示された。これは石灰化に乏しい未熟な修復骨が欠損を埋めた後で石灰化が本格的に始まるのではなく、修復骨の量的増大に伴い、石灰化が進行することを示している。すなわち、骨修復の過程では、骨の量の増大と質の成熟が並行することが考えられる。骨修復における石灰化のプロセスのさらなる検討は、骨修復の臨床に有用な知見を提供することが期待される。

また、修復骨の形成過程をより深く理解するため検討したラット頭蓋骨発生・成長過程の検討では、組織切片上で、胎生16日に頭蓋骨の形成が認められた。エネルギー分散型X線分析(SEM-EDX)による分析では、CaとPの元素分布は骨組織に一致して見られ、Cの元素分布とは相補的であった。骨基質における元素濃度比Ca/Pは胎生16日で低く、発生・成長に伴い上昇する傾向が見られた。また、C/Ca、C/Pは胎生16日で高く、胎生18日以降は低下した。さらに発生・成長に伴い、XRDとFTIRによる解析では、骨の結晶構造の成熟とミネラルに対するタンパク質の割合の低下が、また、アルシアン・ブルー染色ではプロテオグリカンの減少が示された。

修復過程と同様に骨の発生・成長過程で、有機質の減少を伴いながら石灰化が進行することが明らかとなった。成果は論文にまとめ Journal of Bone and Mineral Metabolism に投稿し、受理された。

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4件)

(1) Henmi A, Okata H, Anada T, Yoshinari M, Mikami Y, Suzuki O, Sasano Y (2015) Bone matrix calcification during embryonic and postembryonic rat calvarial development assessed by SEM-EDX, XRD and FTIR. J Bone Miner Metab, in press (査読有り)

(DOI) 10.1007/s00774-014-0647-x

(2) Okata H, Nakamura M, Henmi A, Yamaguchi S, Mikami Y, Shimauchi H, Sasano Y (2015) Calcification during bone healing in a standardised rat calvarial defect assessed by micro-CT and SEM-EDX. Oral Diseases 21: 74-82 (査読有り)

(DOI) 10.1111/odi.12212

(3) Tsuchiya S, Tsuchiya M, Nishioka T, Suzuki O, Sasano Y, Igarashi K (2013) Physiological distal drift in rat molars contributes to acellular cementum formation. Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology 296(8): 1255-1263 (査読有り)

(DOI)10.1002/ar.22731

(4) Sasano Y, Nakamura M, Okata H, Henmi A, Mikami Y (2012) Remodeling of extracellular matrices initiates and advances calcification during development and healing of bones and teeth. Journal of Oral Biosciences 54:25-29 (査読有り)

(DOI) 10.1093/jmicro/dfr068

[学会発表](計15件)

(1) ラット切歯エナメル質と象牙質の石灰化過程における Ca, P および C の SEM-EDX 分析。(丸山顕太郎、逸見 晶子、笹野 泰之) 第 56 回歯科基礎医学会学術大会 2014 年 9 月 25 日～27 日、福岡市

(2) Extracellular Matrix Remodeling and Biomineralization in Bone during Development and Healing. (Sasano Y) 3rd International Symposium on Dental

Implantology and Biomaterials of West Coast Strait. November 23, 2014, School and Hospital of Stomatology, Fujian Medical University, Fuzhou, China

(3) Remodeling of Extracellular Matrices and Biomineralization during Bone Development and Healing. (Sasano Y) International Symposium on Biomineralization. June 13, 2014, Chonnam National University, Gwangju, Korea

(4) Calcification in the bone matrix during rat calvarial development. (Henmi A, Okata H, Anada T, Yoshinari M, Mikami Y, Suzuki O, Sasano Y) The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science. January 20-21, 2014, Sendai, Japan

(5) Calcification in healing calvarial bone assessed by micro-CT and SEM-EDX. (Okata H, Nakamura M, Henmi A, Yamaguchi S, Sasano Y) The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science. January 20-21, 2014, Sendai, Japan

(6) Calcification in rat developing mandibular bone. (Hayashi R, Kozuka M, Shishido S, Kakiuchi Y, Henmi A, Okata H, Sasano Y) The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science. January 20-21, 2014, Sendai, Japan

(7) ラット頭蓋骨発生・成長過程における骨基質石灰化の成熟に関する検討。(逸見 晶子、大方 広志、三上 靖人、鈴木 治、笹野 泰之) 第 55 回歯科基礎医学会学術大会 2013 年 9 月 20 日～23 日、岡山市

(8) ラット下顎骨発生における石灰化。(林 利華、狐塚 雅弘、穴戸 駿一、柿内 裕輔、逸見 晶子、大方 広志、笹野 泰之) 第 55 回歯科基礎医学会学術大会 2013 年 9 月 20 日～23 日、岡山市

(9) FGF23/klotho 軸の破綻は血管骨化を誘導する -klotho 遺伝子変異マウスを用いた組織学的検索。(長谷川 智香、山田 珠希、佐々木 宗輝、笹野 泰之、網塚 憲生) 第 55 回歯科基礎医学会学術大会 2013 年 9 月 20 日～23 日、岡山市

(10) 骨発生・成長における石灰化過程の解析(逸見 晶子、大方 広志、穴田 貴久、三上 靖人、鈴木 治、笹野 泰之) 日本解剖学会 第 59 回東北・北海道連合支部学術集会 2013 年 9 月 14 日～15 日、札幌市

(11) Analysis of calcification in bone healing with a standardized rat calvaria defect model. (Okata H, Nakamura M, Henmi A, Yamaguchi S, Mikami Y, Shimauchi H, Sasano Y) ASahct2013 International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy, August 27-28, 2013, Sendai, Japan

(12) 硬組織の発生・修復における細胞外基質リモデリングと石灰化。(笹野 泰之、逸見 晶子、大方 広志、三上 靖人、中村 恵) 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 研究集会・懇話会 2013年3月27日～30日、高松市

(13) 骨密度と構成元素の解析を利用した修復骨基質の石灰化の検討。(大方広志、中村 恵、逸見晶子、島内英俊、笹野泰之) 第 58 回東北・北海道連合支部学術集会、2012年9月22日～23日、山形市

(14) 骨欠損修復における骨基質の石灰化に関する検討。(大方広志、中村 恵、逸見晶子、島内英俊、笹野泰之) 第 54 回歯科基礎医学会学術大会 2012年9月14日～16日、福島県郡山市

(15) 実験的骨欠損における修復骨形成過程の石灰化進行に関する検討。(大方広志、中村 恵、逸見晶子、島内英俊、笹野泰之) 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012年3月26日～28日、甲府市

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

中村 恵 (NAKAMURA MEGUMI)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：20431512

(3) 連携研究者

高橋 信博 (TAKAHASHI NOBUHIRO)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：60183852