

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659854

研究課題名（和文）オステオネットワーク獲得機構の解明を目指した挑戦的研究

研究課題名（英文） Challenge to clarify the acquirement of osteonetwork

研究代表者

山口 朗 (YAMAGUCHI AKIRA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00142430

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の進化に伴うオステオネットワークの獲得機構の解明を目指して種々の研究を行い、以下の研究成果を得た。1）真骨魚類の骨では骨細胞を有しないもの（無細胞性骨）と骨細胞を有するもの（細胞性骨）があり、細胞性骨でも骨細管系の発達は非常に悪かったが、両生類、爬虫類、哺乳類の骨では全ての種でよく発達した骨細胞・骨細管系が存在していた。2）ラットの骨組織はカルシウムの貯蔵庫としての機能を獲得しているが、カエルの骨ではそのような機能を獲得していないことを示唆する所見を得た。

研究成果の概要（英文）： We conducted various experiments to understand the mechanism of acquirement of osteonetwork in vertebrates. 1) Bones of zebrafish contained osteocytes (cellular bone) but with a poorly developed osteocyte lacunocanalicular system. Bones of *Xenopus laevis*, a freshwater species, and of other amphibians, reptiles, and mammals contained numerous osteocytes and a well-developed lacunocanalicular system. 2) Bone in rats acquired the function of mineral storage, but frog bones has not acquire such function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：形態系基礎歯科学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：骨細胞、脊椎動物、力学的負荷、進化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の骨組織は、種々の細胞・分子間のダイナミックな相互作用によりその構造と機能が維持されている。骨組織を構成するこれらの細胞群の分化と機能はホルモンやメカニカルストレスなどで制御されているが、最近、骨組織がリン代謝を制御するホルモンである FGF23 を産生することが明らかにされた。これらの新知見は骨組織が種々のホルモンの標的組織であるだけでなく、骨外臓器・組織を制御する内分泌器官の一つであることを示している。このような近年の骨生物

学の飛躍的進歩により、従来の概念で骨格を統合的に理解することが困難な状況になっている。そのため、本申請者は骨格を全身臓器・組織との関連の中で捉えなおす新機軸として「オステオネットワーク」という概念を提唱し（山口朗 他、最新医学 63:2155-2163, 2008）、科学研究費補助金（平成 22～24 年、基盤研究 A）の補助により「オステオネットワークの維持と破綻：顎顔面骨疾患の病態解明を目指した基盤研究」を推進している。

2. 研究の目的

本申請者は骨格を全身臓器・組織との関連の中で捉えなおす新機軸として「オステオネットワーク」という概念を提唱し、現在「オステオネットワークの維持・破綻機構」を解析している。脊椎動物は、進化の過程のその時々で生存に必要なオステオネットワークを構築し、様々な環境に適応した骨格を獲得してきたと考えられる。我々は、種々の脊椎動物の骨の形態学的解析により、陸生動物にみられる軟骨内骨化部は脊椎動物が上陸時に獲得した特有な構造で、カルシウム貯蔵庫として機能を担っているという仮説を立案した。本研究では、カエル、ラット、マウスの骨組織を用いた実験により、我々の仮説を検証し、「オステオネットワークの獲得・維持・破綻」という一連の統合研究へと発展させ、骨代謝研究の新たな潮流を創成することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まずメダカ (*Oryzias latipes*)、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)、ツチガエル (*Rana rugosa*)、カスミサンショウウオ (*Hynobius nebulosus*)、リクガメ (*Testudo horsfieldii*)、グリーンイグアナ (*Iguana iguana*)、マウス (C57BL6)、ヒトの骨組織を形態学的に解析した。メダカ、ゼブラフィッシュでは椎骨を、他の脊椎動物では大腿骨を解析した。各骨組織を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、5%ギ酸溶液で脱灰し、通法に従ってパラフィン切片を作成した。各切片にヘマトキシン・エオシン染色と Schoen 法による銀染色を施し、骨細胞と骨細管の分布を観察した。ゼブラフィッシュの椎骨とアフリカツメガエルの大腿骨では、4%パラフォルムアルデヒド溶液で、固定後、凍結切片を作成し、AlexaFluor488 を結合したファロイジンでアクチン線維を染色し、骨細胞・骨細管系の分布を解析した。また、アフリカツメガエルとマウスの大腿骨を 2%グルタルアルデヒド-2%パラフォルムアルデヒドの混合溶液で固定し、6N 塩酸及びコラゲナーゼ溶液 (1 mg/ml) で骨基質を除去後、走査電子顕微鏡で骨細胞・骨細管系の分布を観察した。さらに、ゼブラフィッシュの椎骨とアフリカツメガエルの大腿骨を 2%グルタルアルデヒド-2%パラフォルムアルデヒドの混合溶液で固定し、通法に従って Epon-Araldite に包埋後、超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡で骨細胞・骨細管系の分布を解析した

さらに、本研究では「オステオネットワ

ーク獲得機構」を解明するための一環として、脊椎動物の骨組織が進化の過程でどのようにしてカルシウム貯蔵庫の機能を獲得してきたかを解析する。我々が哺乳類の骨組織で重要なカルシウム貯蔵庫と考えている軟骨内骨化部の動態をカルシウム欠乏ラットを用いて解析する。魚類、カエルでは爬虫類、哺乳類にみられる軟骨内骨化部がみられないので、水生動物の骨はカルシウム貯蔵庫の機能を獲得していないと推測できる。この点に関して、カエルの後鰓体 (カエルのカルシトニン分泌器官) 除去実験などにより検証する。また、カエルで軟骨内骨化がみられない理由として、我々は Hedgehog 遺伝子の発現パターンが重要な要因であることを報告しているため、Hedgehog 遺伝子改変マウス・アフリカツメガエル作成の準備を行う。

4. 研究成果

1) 種々の脊椎動物における骨細胞の動態

a. 真骨魚における骨細胞・骨細管系の分布

メダカの椎骨は骨細胞を含まない無細胞性骨であったが、ゼブラフィッシュの椎骨は骨細胞を含む細胞性骨であった。メダカの骨では銀染色で骨細管が認められず、ゼブラフィッシュの骨でも銀染色では明瞭な骨細管が確認できなかった。ファロイジンによるアクチン線維染色と透過電子顕微鏡による観察で、ゼブラフィッシュの骨組織では骨細胞から細胞突起が骨基質に進展していることが確認できたが、他の脊椎動物に比べて骨細管系の発達は悪かった。また、ゼブラフィッシュの骨細胞ではアポトーシス小体に類似した電子密度の高い物質を含んでいるものがみられた。

b. 両生類における骨細胞・骨細管系の分布

アフリカツメガエルのオタマジャクシの大腿骨の軟骨周囲に皮質骨が形成される時期 (ステージ 61) では、皮質骨に骨細胞がみられ、銀染色で不規則な骨細管系の発達がみられた。成長したアフリカツメガエルの大腿骨の皮質骨では多くの骨細胞がみられ、銀染色でよく発達した骨細管系が認められた。また、ファロイジンによるアクチン線維染色、走査電子顕微鏡、透過電子顕微鏡による観察で、アフリカツメガエル大腿骨の皮質骨では骨細胞が良く発達した細胞突起を骨基質中に進展させていることが明らかとなった。さらに、銀染色でツチガエル、カスミサンショウウオの大腿骨の皮質骨でもよく発達した骨細管が観察された。

c. 爬虫類における骨細胞・骨細管系の分布

リクガメ、グリーンイグアナの大腿骨の皮質骨では、銀染色でよく発達した骨細胞・骨細管系が観察された。

d. 哺乳類における骨細胞・骨細管系の分布

マウス、ヒトの大腿骨の皮質骨では、銀染色でよく発達した骨細胞・骨細管系が観察された。また、走査電子顕微鏡による観察でマウス皮質骨では非常に良く発達した骨細胞の細胞突起が確認できた。

2) ラット骨組織のカルシウム貯蔵庫としての機能の解析

ラットを低カルシウム食で飼育し、カルシウム欠乏状態にすると大腿骨遠心部の海綿骨（軟骨内骨化部）が急速に減少することをマイクロCTで確認した。また、ラットを低カルシウム食で飼育し、大腿骨の海綿骨と皮質骨及び頭頂骨の骨量減少の経時的変化をマイクロCTと組織学検索により解析し、カルシウム欠乏の状態ではこれらの骨の中で海綿骨における骨量減少が皮質骨に比べて早期に出現する傾向を確認できた。

3) カエル骨組織のカルシウム貯蔵庫としての機能の解析

アフリカツメガエルは生涯水中で生活する水生ガエルであるが、ウシガエルなどは水中と陸上の両方で生活する陸生ガエルである。陸生ガエルでは、耳のリンパ嚢（我々の耳石が入っている部に相当）が脊椎に沿って尾部まで延長し、傍脊椎石灰嚢（paravertebral lime sac: PVLS）を形成しており、PVLSは炭酸カルシウムからなる石灰化物を含んでいる。哺乳類は炭酸カルシウムを生理的に利用することができないが、カエルでは生理的に炭酸カルシウムを利用できるために、PVLSが陸生ガエルのカルシウム貯蔵庫ではないかと考えられている。この考えはカエルのカルシトニン分泌器官である後鰓体を除去するとPVLSの石灰化物が減少し、血清カルシウム値が上昇する現象により支持されている（Yaoi Y, et al. *Endocrinology* 144:3287, 2003）。本研究では、このような陸生ガエルの特性を生かし、成長ウシガエルを用いて以下の実験を行った。その結果、後鰓体除去群、後鰓体除去群+カルシトニン投与群、擬似手術群、擬似手術+カルシトニン投与群の4群のカエルの大腿骨内骨膜面の骨吸収窩を走査電子顕微鏡で解析した所、各群間で明瞭な骨吸収窩の差異は確認できなかった。

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 17 件）

1. Cao L, Moriishi T, Miyazaki T, Iimura T, Tamamura S, Komori T, Yamaguchi A: Comparative morphology of osteocytes in aquatic and land vertebrates. *J Bone Miner Metab* 29:662-670,2011
2. Himeno-Ando A, Izumi Y, Yamaguchi A, Iimura T: Structural differences in the osteocyte network between the calvaria and long bone revealed by three-dimensional fluorescence morphometry, possibly reflecting distinct mechano-adaptations and sensitivities. *Biochem Biophys Res Co* 417:765-770, 2012
3. Aizawa R, Yamada A, Suzuki D, Iimura T, Kassai H, Harada T, Tsukasaki M, Yamamoto G, Tachikawa T, Nakao K, Yamamoto M, Yamaguchi A, Aiba A, Kamijo R: Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development. *Mech Dev* 129:38-50,2012
4. Umehara K, Iimura T, Sakamoto K, Lin Z, Kasugai S, Igarashi Y, Yamaguchi A: Canine oral mucosal fibroblasts differentiate into osteoblastic cells in response to BMP-2. *Anat Rec* 295:1327-1335,2012
5. Watanabe T, Tamamura Y, Hoshino A, Makino Y, Nishimura R, Kamioka H, Yoneda T, Amagasa T, Yamaguchi A, Iimura T: Increasing participation of Sclerostin in postnatal bone development revealed by three-dimensional immunofluorescence morphometry. *BONE* 51:447-458,2012
6. Nishimura R, Wakabayashi M, Hata K, Matsubara T, Honma H, Wakisaka S, Kiyonari H, Shioi G, Yamaguchi A, Tsumaki N, Akiyama H, Yoneda T: Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J Biol Chem* 287:33179-33190,2012
7. Hoshino A, Ueha S, Hanada S, Imai T, Ito M, Yamamoto K, Matsushima K, Yamaguchi A, Iimura T: Roles of

- chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts and osteoclasts. *J Cell Sci* 258:28826-28837,2012
8. Tanabe R, Haraikawa M, Sogabe N, Sugimoto A, Kawamura Y, Takasugi S, Nagata M, Nakane A, Yamaguchi A, Iimura T, Masae Goseki-Sone : Retention of bone strength by feeding of milk and dairy products in ovariectomized rats; involvement of changes in serum levels of 1alpha, 25(OH)2D3 and FGF23. *J Nutr Biochem*. 2012 [Epub ahead of print] 10.1016/j.jnutbio.2012.07.004. *Cytotechnology*. 64:315-322,2012
 9. Makino Y, Takahashi Y, Tanabe R, Tamamura Y, Watanabe T, Haraikawa M, Hamagaki M, Hata K, Kanno J, Yoneda T, Saga Y, Goseki-Sone M, Kaneko K, Yamaguchi A, Iimura T: Spatiotemporal disorder in endochondral ossification during axial skeleton development in the Mesp2-null mouse: A developmental etiology of spondylocostal dysostosis and spondylothoracic dysostosis. *BONE* 53:248-258,2013
 10. Matsumoto T, Iimura T, Ogura K, Moriyama K, Yamaguchi A: The role of osteocytes in bone resorption during orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 92:340-345, 2013
 11. 飯村忠浩、中根綾子、姫野彰子、杉山真由、山口 朗 : 骨の形態的解析法の進歩 ; 骨の In vivo 蛍光イメージングの現状と展望. *骨形態計測学会雑誌* 21:17-24, 2011
 12. 佐藤 潔、栢森 高、小村 健、山口 朗 : IL-6 の骨代謝に対する作用、*骨粗鬆症治療* 10:20-24, 2011
 13. 飯村忠浩、杉山真由、牧野佑司、中野綾子、山口 朗 : 脊椎動物の発生におけるライブイメージング、*Cytometry Research* 21:57-63, 2011
 14. 玉村禎宏、山口 朗 : 骨・歯とカルシウム・リン代謝、*CLINICAL CALCIUM* 22:11-17, 2011
 15. 中根綾子、沼野利佳、佐藤博己、高木裕三、山口 朗、飯村忠浩 : 骨の成長と代謝における概日リズムの働きー蛍光イメージングによるアプローチと展望ー、*骨形態計測学会雑誌* 21:41-50, 2011
 16. 山口 朗 : 種々の脊椎動物における骨細胞ネットワーク、*CLINICAL CALCIUM* 22:71-76,2012
 17. 山口 朗 : 骨・軟骨形成の分子メカニズムと再生医療の最新のトピックス、*細胞* 45:3-4,2013
- [学会発表] (計 19 件)
招待講演
1. 山口 朗 : オステオネットワークの維持と破綻 : 骨再生の分子基盤を中心として、第 11 回産学連携フォーラム、2011 年 2 月 28 日 (東京)
 2. 山口 朗 : 再生医療「骨再生」ーそのメカニズムと応用ー、平成 22 年日本歯科医師会生涯研修セミナー、2011 年 3 月 6 日 (京都)
 3. Yamaguchi A: Molecular mechanism of bone destruction by oral squamous cells carcinoma, The First international Oral Pathology Update Symposium, Taipei, 2011, Mar 27
 4. 山口 朗 : 骨再生の分子基盤 (シンポジウム : 骨の再生医療)、第 65 回日本口腔科学会学術集会、2011 年 4 月 15 日 (東京)
 5. 山口 朗 : 血管石灰化と骨・軟骨関連因子、シンポジウム : CDK における異所性石灰化 : 基礎と臨床、第 56 回日本透視医学会学術総会、2011 年 6 月 18 日 (横浜)
 6. Yamaguchi A: Molecular mechanism of bone destruction by oral cancer. The Second Chinese National Conference on Oral Maxillofacial Development and Regeneration. Wuyishan city, Fujian Province, China, July 29, 2011
 7. Yamaguchi A: Histopathological characteristics of bisphosphonate-related osteomyelitis (osteonecrosis) of jaw. Keynote Lecture. 5th Meeting of Asian Society of Oral and Maxillofacial Pathology. Fukuoka, August 24, 2011
 8. Yamaguchi A: Role of BMP, Notch, and CCN3 in osteoblast differentiation and bone regeneration. Lecture. International Summer Program 2011, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, August 30, 2011
 9. 山口 朗 : オステオネットワークの構築・維持・破壊、第 41 回骨・カルシウム代謝研究会 (特別講演)、2011 年 10 月 14 日、ホテルグランヴィア京都

10. 山口 朗:インプラントをみすえた骨の形態学的解析；骨のリモデリングを中心として、Dentistry, Quo Vadis?, 特別講演、2011年12月10日（東京）
11. Yamaguchi A: Bone destruction by oral cancer, The 6th Global COE international Symposium at TMDU, 2012 Jan. 22 (Tokyo)
12. 山口 朗:オステオネットワークの維持と破壊：顎骨疾患の病態解明と新たな治療法の開発を目指して、第30回北海道医療大学歯学会、特別講演、2012年3月3日（札幌）
13. 山口 朗:オステオネットワークの獲得・維持・破綻、米田俊之教授退官記念講演会、大阪大学中之島センター、2012年5月5日（大阪）
14. 山口 朗:オステオネットワークの維持と破綻：骨疾患の病態解明を目指して、第27回長崎骨粗鬆症研究会、長崎県医師会館、2012年5月9日（長崎）

一般演題

15. 渡辺高、天笠光雄、山口 朗、飯村忠浩：骨芽細胞分化と骨形成における骨芽細胞特異的転写因子の細胞内局在-蛍光イメージングによる解析-、第65回 日本口腔科学会学術集会、2011年4月15日、タワーホール船堀、東京
16. 松本 力、飯村忠浩、山口 朗：強制力による歯の移動における骨細胞の役割、第31回日本骨形態計測学会、2011年5月20日、長良川国際会議場、岐阜
17. 渡部 高、天笠光雄、山口 朗、飯村忠浩：定量的 in situ 蛍光イメージングによる骨芽細胞特異的転写因子の骨組織内での分布と細胞内局在の変化の観察、第31回日本骨形態計測学会、2011年5月21日、長良川国際会議場
18. 相澤怜、山田篤、鈴木大、山本剛、飯村忠浩、山口朗、山本松男、上條

竜太郎：Cdc42 は四肢形成における軟骨形成と肢芽指間域のアポトーシスを制御する（優秀ポスター賞）、第53回歯科基礎医学会学術大会、2011年9月30日、長良川国際会議場、岐阜

19. 松下祐樹、坂本啓、勝部憲一、原田清、山口朗：CCN3 は骨再生抑制因子か？第54回歯科基礎医学会学術大会・総会、2012年9月15日、郡山（奥羽大学歯学部）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 朗 (YAMAGUCHI AKIRA)

東京医科歯科大学大学院・歯学総合研究科・教授

研究者番号：001424430

