

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：23659855

研究課題名（和文）脳と骨の蛍光・発光ライブイメージングによる骨時計の発達機構の解明

研究課題名（英文）Investigation for the bone clock development by bioluminescence and fluorescence imaging on brain and bone

研究代表者

飯村 忠浩（IIMURA TADAHIRO）

東京医科歯科大学・歯と骨のGCOE拠点・特任准教授

研究者番号：20282775

研究成果の概要（和文）：骨の代謝リズムが概日リズムによって調節されている。いっぽう、末梢組織の概日リズムは、交感神経系や内分泌系を介して中枢からの制御を受けていると考えられている。本研究では、発光と蛍光イメージングの利点を生かしたイメージング法により、外実リズム形成を個体レベルから細胞レベルまで観察できるシステムを構築した。このシステムは、中枢と骨を含む末梢組織の概日リズムによる相互調節機構の解明に有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Bone metabolism is regulated by circadian clock. On the other hand, the central clock system in brain is thought to regulate peripheral clocks including bone. We established a dual imaging system of bioluminescence and fluorescence, which enables us to monitor circadian oscillation from body to cell levels. By exploiting this system, inter-regulation between brain and bone will be further investigated.

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：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：骨、イメージング、分子時計

1. 研究開始当初の背景

骨の代謝リズムが概日リズムによって調節されていることは、血中骨マーカーの日内変動や、PCRによる分化マーカーmRNAの発現変動によって報告されている。すなわち骨組織には、末梢時計としての分子時計メカニズム：骨時計が存在することが示唆される。いっぽう、末梢組織の概日リズムは、交感神経系や内分泌系を介して中枢からの制御を受けている。したがって、骨組織の概日リズムも中枢のインプットによる調節を受けていると考えられる。しかしながら、骨組織の概日リズムが、いつ、どのように、どの細胞で概日リズムを刻むのか？またその分子時計によって調節される機能発現すなわちアウトプットは何か？中枢時計からのインプ

ットによる制御機構は何か？その統合的な解析はまだされていない。そこで、組織・器官レベルで概日リズムを経時的に可視化し、骨時計のインプットからアウトプットまでの機能相関を把握することは有効なアプローチである。

2. 研究の目的

骨の代謝が概日リズムによって調節されていることは、血中骨マーカーの日内変動や、PCRによる分化マーカーmRNAの発現変動によって報告されている。また、骨を含む末梢組織は視交叉上核にある中枢時計からの制御を受けている。しかしながら、成長発達中の骨組織において、どの細胞が概日リズム

を発現し、どのようなリズムで骨の成長発達や機能発達を調節しているのか、また中枢時計からの制御メカニズムについては明らかにされていない。本研究では、機能的イメージングを駆使して骨組織でリアルタイムに概日リズムを可視化する技術を確立し、概日リズムを刻む分子時計による骨の成長発達過程の制御機構を解析する。

骨を含む各種臓器の恒常性維持機能は概日リズムによって調節されており、脳の視交叉上核にある中枢時計からの制御を受けている。しかしながら、生後から成長発達過程において、個体や臓器の成長に概日時計がどのように関与するかについては、関連遺伝子の発現振動が小さいため解析が進んでいない。この問題を解決するため、本研究代表者らは、蛍光・発光シグナルによって、時計遺伝子の発現振動をより高感度で観察する方法を確立してきた。その結果、新生児マウスでは、脳と骨とは独立して時計遺伝子の発現振動を示すこと、さらに骨細胞の周期振動が顕著であることを観察している。本研究では、脳と骨の蛍光・発光ライブイメージングにより、脳時計と骨時計の発達過程を比較しながら、両時計の独立性と統合性のメカニズムについて探索する。

3. 研究の方法

組織切片での経時間的なイメージングと、顕微鏡下でのライブイメージングを相補的に活用した機能的イメージングにより、概日リズムによる骨組織の機能制御機構を時空間的に解析するシステムを体系化する。まず、①骨における分子時計（骨時計）の時空間的な機能発現を把握し、②中枢時計からのインプットとの相関を見いだす。さらに、③骨時計のアウトプットとしての骨機能相関を見出す。

①骨組織の発生・成長発達過程での概日リズムの遷移の観察（骨時計機能の時空間的把握）

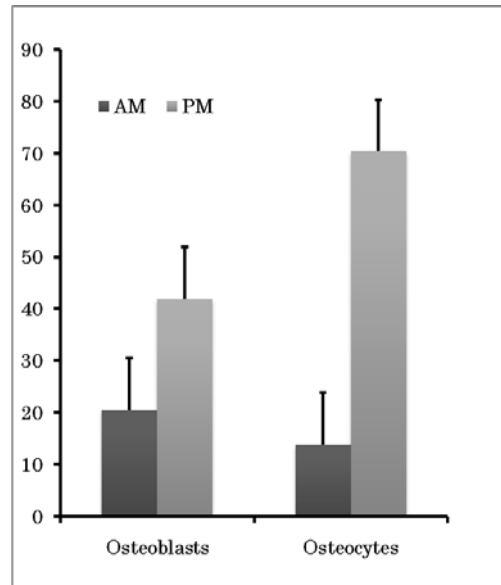
②中枢時計と骨時計との位相差の比較による、中枢制御機構の遷移の把握（骨時計へのインプットの把握）

③骨時計と、骨系細胞機能の相関関係の把握（骨時計からのアウトプットの把握）

4. 研究成果

本研究の主なる成果は、連携研究者である沼野利佳准教授（豊橋技術大学）らとともに、発光および蛍光イメージングの両方を駆使した、いわば Dual Imaging 技術によって、生後マウスにおいても各臓器において概日リズムが確立する過程を可視化し、計測する

ことに成功したことである。発光イメージングによって生きたマウスでの臓器レベルでの微弱な発光リズムを検出し、蛍光イメージングによって細胞組織レベルでのリズム形成が確認可能となった。これによって、生後の初期段階で、脳と骨には独立したリズム形成が観察された。また、骨組織において、細胞間での振動強度が違うことも観察された（論文発表 準備中、図1）。



（図1）Per1:GFP マウスの生後3日の骨芽細胞および骨細胞における、3次元 in situ 蛍光イメージングによる Per1 発現の経時間的な変化の比較。夜（午後10時）の発現レベルは昼（午前10時）と比較した場合、骨芽細胞で約2倍、骨細胞で約5倍に上昇した。

今後は、このシステムをさらに応用して、臓器間の連携メカニズムおよび、骨の各種細胞における概日リズム形成の機能的意義について調べるのが重要と思われる。

本研究で展開された、骨組織を対象とした蛍光・発光イメージングを用いて、脳をはじめとした他の骨代謝調節に関わる臓器である甲状腺や腎臓との比較観察を進めることで、臓器間ネットワークの解析が進むことも予想される。したがって骨の医学生物学の新たな解析法を提示し、新たな知見をもたらす可能性が高いとおもわれる。

また、骨時計と脳時計の独立性と統合性といった新たな視点で、概日リズムが攪乱された場合の骨の成長異常や代謝疾患における機能破綻を、細胞・分子レベルで、より視覚的に統合的に把握することが重要になると思われる。さらに、病態の診断や薬物治療のタイミングや標的部位の特定など、臨床医学への新たな指標を提示することが期待される。

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 Tanabe R, Haraikawa M, Sogabe N, Sugimoto A, Kawamura Y, Takasugi S, Nagata M, Nakane A, Yamaguchi A, Iimura T, Goseki-Sone M. (2013)

Retention of bone strength by feeding of milk and dairy products in ovariectomized rats: involvement of changes in serum levels of 1 α , 25(OH)(2)D(3) and FGF23. J Nutr Biochem;24(6):1000-7.

doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.07.004.

② Iimura T, Nakane A, Sugiyama M, Sato H, Makino Y, Watanabe T, Takagi Y, Numano R, Yamaguchi A. (2012)

A fluorescence spotlight on the clockwork development and metabolism of bone J Bone Miner Metab. 30(3):254-69.

doi: 10.1007/s00774-011-0295-3.

③ Himeno-Ando A, Izumi Y, Yamaguchi A, Iimura T. (2012)

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 Commun;417: 765-70.

doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.031.

④ Watanabe T, Tamamura Y, Hoshino A, Makino Y, Kamioka H, Amagasa T, Yamaguchi A, Iimura T. (2012)

Increasing participation of sclerostin in postnatal bone development, revealed by three-dimensional immunofluorescence morphometry.

Bone;51: 447-58.

doi: 10.1016/j.bone.2012.06.019.

⑤ Umehara K, Iimura T, Sakamoto K, Lin Z, Kasugai S, Igarashi Y, Yamaguchi A. (2012)

Canine oral mucosal fibroblasts differentiate into osteoblastic cells in response to BMP-2.

Anat Rec (Hoboken);295: 1327-35.

doi: 10.1002/ar.22510.

⑥ Oue E, Lee JW, Sakamoto K, Iimura T, Aoki K, Kayamori K, Michi Y, Yamashiro M, Harada K, Amagasa T, Yamaguchi A. (2012)
CXCL2 synthesized by oral squamous cell carcinoma is involved in cancer-associated bone destruction.

Biochem Biophys Res Commun;424: 456-61.

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.132.

⑦ 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, Kamiyo R. (2012)

Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development.

Mech Dev 12012;129: 38-50.

doi: 10.1016/j.mod.2012.02.002.

⑧ Cao L, Moriishi T, Miyazaki T, Iimura T, Hamagaki M, Nakane A, Tamamura Y, Komori T, Yamaguchi A. (2011)

Comparative morphology of the osteocyte lacunocanalicular system in various vertebrates.

J Bone Miner Metab;29: 662-70.

doi: 10.1007/s00774-011-0268-6.

⑨ Iimura T, Sugiyama M, Watanabe T, Nakane A, Makino Y and Yamaguchi A. (2011)

Lighting up skeletal biology by fluorescent imaging

Journal of Oral Biosciences;53:97-108.

Doi : 10.1016/S1349-0079(11)80012-5

⑩ Iimura T, Sugiyama M, Makino Y, Nakane A, Watanabe T and Yamaguchi A. (2011)

Illumination of vertebrate development by fluorescence live imaging

Cytometry Research. , 21:57-63

J-GLOBAL ID : 201102290995317883

〔学会発表〕(計 6 件)

①飯村忠浩

「3次元蛍光イメージングによるスクレロスタチンの時空間分布の変遷」

第11回日本歯科骨粗鬆症研究会

2013年3月2日 東京医科歯科大学

②飯村忠浩

「異骨症モデルを用いた骨格発生と病態の時空間的解析」

第54回歯科基礎医学会学術集会 サテライトシンポジウム6 2012年9月14日 奥羽大学

③飯村忠浩、山口朗
「3次元蛍光イメージングと計測にて見る骨格の発生異常と骨の発達メカニズム」
第30回日本骨代謝学会学術集会 若手シンポジウム基礎 2012年 7月20日 京王プラザホテル

④飯村忠浩
「3次元蛍光イメージング法による骨発達の分子メカニズムの探索」
第66回日本口腔科学会学術集会 教育研修会 2012年 5月16日 リーガロイヤルホテル広島

⑤飯村忠浩
「3次元蛍光イメージングによる骨の発達メカニズムと骨代謝研究」
第68回日本顕微鏡学会学術講演会 硬組織シンポジウム 2012年 5月14日 つくば国際会議場

⑥Tadahiro Iimura
「Multi-dimensional fluorescence imaging approaches for embryonic development and bone biology.」
8th Meeting of Bone Biology Forum 2011
年8月20日 富士教育研修所

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
飯村忠浩 (IIMURA TADAHIRO)
東京医科歯科大学
・歯と骨のGCOE拠点・特任准教授
研究者番号：20282775

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
沼野 利佳 (NUMANO RIKI)
豊橋技術科学大学・准教授
研究者番号：30462716

山口朗 (YAMAGUCHI AKIRA)
東京医科歯科大学大学院・教授
研究者番号：00142430

宮脇敦史 (MIYAWAKI ATSUSHI)
独立行政法人理化学研究所・チームリーダー
研究者番号：80251445