

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30日現在

機関番号：12608
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659856
 研究課題名（和文） メダカによる骨モデリング機構の解明
 研究課題名（英文） Bone modeling system in medaka

研究代表者
 工藤 明 (Kudou 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：90270925

研究成果の概要（和文）：メダカにおいて骨モデリングが起きる咽頭歯と椎骨、そして尾びれの骨である軌条を用いた骨折モデルについて、骨芽細胞と破骨細胞がそれぞれ赤色と緑色の蛍光で光るダブルトランスジェニックメダカを用い、それぞれの細胞のふるまいを生きたまま解析した。その結果、椎骨では骨芽細胞の跡を追いかけるように破骨細胞が進展していく様子が観察され、破骨細胞の進展方向を骨芽細胞が決めること、骨芽細胞と破骨細胞、破骨細胞同士の細胞間相互作用が必要なことが明らかになった。また、尾びれの骨折モデルにおいて、骨折した後にすぐ現れる破骨細胞がモデリングに寄与し、骨芽細胞による修復の後現れる破骨細胞がリモデリングに寄与することがわかり、異なる2種類の破骨細胞の存在が明らかになった。RANKL ノックアウトメダカの解析の結果、RANKL を介さない破骨細胞分化誘導が存在し、新たな破骨分化因子の発見が急がれる。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the mechanism of bone modeling in pharyngeal teeth and vertebral bone of medaka, we have developed the osteoblast and osteoclast specific double transgenic medaka which visualizes osteoblasts as a red fluorescence and osteoclasts as a green fluorescence in the live imaging. In the results, osteoclasts trace the trail of osteoblasts to expand the osteoclast area on neural arch. In the cell fusion of osteoclasts, cell-cell interaction of two osteoclasts on the neural arch is required. In the new established fracture model by using caudal bone, two different osteoclasts act for bone modeling and remodeling. In the analysis of RANKL knock-out medaka, osteoclasts are developed and generated in the RANKL independent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

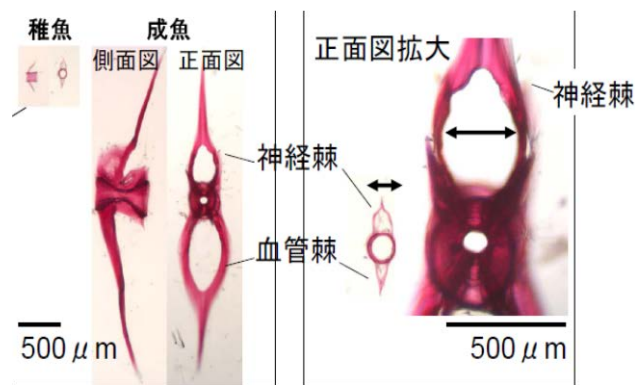
	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：口腔解剖学（含組織学・発生学）・メダカ

1. 研究開始当初の背景

骨形成には骨のモデリングとリモデリングが知られており、骨粗鬆の病態解明で骨リモデリングは詳しく研究されているが、一



方、骨モデリングは多くが未解明のままである。骨モデリングは、同一の骨の中で骨の片側で造骨が、もう片側で破骨が起きていることを示し、特に骨の発生時や、幼児期の骨形成期に特徴的に見られる。代表的な例としては、哺乳類の頭蓋の成長時には、脳の成長に従って頭蓋の内側に破骨細胞が存在し(Rice et al, Bone 1997)、外側では造骨が行われており、脳の形成とともに頭蓋骨は大きくなっていく。このときに脳が頭蓋骨の形と大きさの決定に関与しているのか全く明らかになっていない。また造骨と破骨が何らかの関連をもって、同調して活性化されていると考えるのが妥当であるが、そのようなことが起こっているのかもわかっていない。我々はこの骨モデリングの本格的解明にメダカを用いて研究する。

我々はこれまで世界に先駆けて骨の発生・形成についてメダカをモデル生物として研究してきた。メダカの骨の特徴は、椎骨の上下に神経棘、血管棘という、神経管、血管を守るように覆っている骨がある。我々のこれまでの研究から(Inohaya et al, Dev Dyn 2007, Development 2010)、メダカの椎骨、神経棘、血管棘において、硬節由来の骨芽プロジェニター細胞が移動して、石灰化し、骨を形成することが明らかになっている。以下の図で、椎骨、神経棘、血管棘を示す。それぞれ稚魚と成魚について、成長によって骨が大きくなっていくのを見ているが、コントロールとして椎骨の真中にある脊索は大きさが変わらないことに注意して欲しい。また形作りという観点から見ると、骨を造る骨芽細胞以外にも、骨を削る破骨細胞が必要であるが、我々はメダカにも破骨細胞が存在し、骨を削っていることを見出した(Nemoto et al, Bone 2007)。破骨細胞は神経棘の内側のみに存在し、外側には存在しない。従って、右図

のように成長に伴って神経管が大きくなり、それに従って神経棘が大きくなる必要が生じ、その為に神経棘の内側が破骨細胞によって削られて、神経管を通せる大きさになると考えられる。その結果、成魚における神経棘・血管棘の大きさは、それぞれ神経管・血管の大きさを反映していると考えられる。頭蓋骨の形成と対応させると、脳は神経管に、頭蓋骨は神経棘に相当し、メダカの骨形成をモデルにして、骨のモデリング機構の分子的解明が期待される。

2. 研究の目的

我々は頭蓋形成で代表される骨モデリングをより分子的に解明する実験モデルとして、メダカの骨形成のシステムを用いて研究する。内側を削る破骨細胞と外側を造る骨芽細胞が協調しているのか、また外胚葉由来の神経管と中胚葉由来の血管という、独立に分化してきた器官が中胚葉由来の神経棘・血管棘の形と大きさの決定に関与するのかを解明する。

3. 研究の方法

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。この2つの仮説を証明するために、破骨細胞の時期特異的な破壊効果を、新たなトランスジェニックラインを作成してライブで観察する。破骨細胞が消失したときに、神経棘や血管棘の成長はどうなるのか、また造骨はどうなるのかを観察する。また逆に、神経管・血管を消失したときに神経棘や血管棘の成長はどうなるのかを検討する。その方法として、神経管・血管形成特異的なモルフォリノアンチセ

ンスの投与により、マイルドに神経管や血管破壊した時の神経棘や血管棘の形成について検討する。

(1) 破骨細胞のタイムラプスによるライブイメージング

破骨細胞特異的のトランスジェニックラインを用いて、破骨細胞がどのように骨を認識するのかをタイムラプスによって検討する。つまり、なぜ神経棘・血管棘の内側しか認識しないのかを検討する方法として、新たに骨形成した場所をカルセインで標識することにより、新しい骨の存在をビジュアルにする。この状態で破骨細胞が新しい骨と古い骨、どの骨を認識するのかをライブで映像により検証する。

(2) 尾びれ骨折モデルによる骨モデリングの機構解明

骨芽細胞を赤、破骨細胞を緑の蛍光で観察できるダブルトランスジェニックメダカを用いて、骨リモデリング機構を解明する。この目的のため、尾びれを用いた、生きてまま解析できる骨折モデルを作成し、骨折修復における骨モデリングの機構を解明する。

(3) RANKL ノックアウトメダカの解析

大阪大学藤堂研究室との共同研究で作成 RANKL ノックアウトメダカを作成し、その解析を行う。RANKL は哺乳類において必須な破骨分化因子であり、これが欠損すると破骨がないメダカの作成が可能になる。骨モデリングにおける RANKL の機能を解析するとともに、破骨がないメダカが得られたときに、骨モデリングへの影響が解明できる。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞のタイムラプスによるライブイメージング

椎骨部にある神経棘において、最初に骨芽細胞

が現れ、その後現れた破骨細胞は神経棘の内側に特異的に限局し、破骨細胞は骨芽細胞の跡を追跡するように拡がって行く。

最初破骨細胞は TRAP 陽性の単核破骨細胞であるが、神経棘の骨上で、2つの破骨細胞が融合し、多核の細胞になる。その細胞融合の様子は世界で初めてライブイメージングで視ることができた。

(2) 尾びれ骨折モデルによる骨モデリングの機構解明

尾びれの骨である軌条を軌条内の血管を壊さないで骨折させる新たなモデルを構築した。骨芽細胞と破骨細胞を別々の蛍光で視覚化したダブルトランスジェニックメダカを用いて、2つの細胞の様子を観察した。この結果、骨折直後に骨折部の外周の血管沿いに破骨細胞が現れ、骨折によるいびつになった骨の部分を削るモデリングを行っていることがわかった。次に骨芽細胞が現れ、骨折部位の修復を行い、最後に再び破骨細胞が現れ、修復された骨をきれいな形に直していく、リモデリングを行っていることが明らかになった。このリモデリングには COX-2 の関与が見出された。

(3) RANKL ノックアウトメダカの解析

破骨分化因子である RANKL の欠損したメダカを Tilling 法で確立し、さらに破骨細胞を観察するために、TRAP-GFP トランスジェニックメダカと掛け合わせた。このメダカの観察の結果、RANKL を介さない破骨分化誘導系が存在し、脊索や血管周囲に破骨細胞が観察できた。このことは新たな破骨分化因子が存在することが明らかになり、その発見が急がれる。

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 1 件)

- ① 査読有 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 4 件)

- ① Chatani, M. 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. The ASBMR Annual Meeting 2013 年 10 月 4 日—10 月 7 日 Baltimore, USA
- ② 萬徳晃子 加重力環境下における破骨細胞活性化のメカニズム 第 30 回日本骨代謝学会 2012 年 7 月 19 日—7 月 21 日 東京
- ③ Takeyama, K. Cyclooxygenase-2 regulates osteoclasts in bone remodeling during fracture healing in medaka, *orizias latipes*. 10th International Conference Zebrafish Development and genetics 2012 年 6 月 20 日—6 月 23 日 Madison, USA
- ④ Takeyama, K. In vivo imaging of medaka fracture healing reveal that cyclooxygenase-2 plays an important role in inducing osteoclasts for bone remodeling. Joint Meeting of 45th JSDB & 64th JSCB 2012 年 5 月 28 日—5 月 31

日 Kobe

[図書] (計 1 件)

- ① Kudo, A. Medaka Bone Development. Chapter 6 pp81-93 in Medaka: A Model for Organogenesis, Human Disease, and Evolution edited by Takeda, H. et al., Springer, May 30, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

工藤 明 (Kudou 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 : 90270925