

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25670788

研究課題名(和文)メダカ体内で生きたまま視る造骨・破骨の相互作用

研究課題名(英文)Communication between osteoblasts and osteoclasts 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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：メダカ稚魚を用いることにより、骨代謝の全体像を解できるようになった。骨折モデルでの細胞移動と分化に関わる因子について検討した結果、骨折部で分泌されるTGF β -2は、骨芽細胞の骨折部への遊走と分化に関与し、初期破骨細胞の分化に関与することが示唆された。次に、咽頭歯骨の骨モデリング機構について検討した結果、骨芽細胞が産生する因子が破骨細胞の維持、生存に寄与し、新たな役割が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：To investigate TGF β function during fracture healing in vivo, we used the fracture healing model of the medaka fish, which enabled us to observe the behavior and function of living cells in response to a bone-specific injury. TGF β -2 functions specifically during fracture healing to stimulate the migration of osteoblasts as well as the differentiation of osteoblasts and osteoclasts. Next, we developed the bone modeling system by employing the pharyngeal bones, coupled with the osterix-DsRed/TRAP-GFP transgenic line visualizing osteoblasts and osteoclasts. Our results demonstrated that bone formation and resorption sites are divided by the posterior and anterior sides of developed supporting bones, respectively, and osteoblasts lead to coordination of bone morphology through the support to osteoclasts.

研究分野：骨生物学

キーワード：骨折修復 骨モデリング メダカ 骨芽細胞 破骨細胞 TGF β 尾ひれ 咽頭歯

1. 研究開始当初の背景

これまで造骨細胞と破骨細胞の分化メカニズムは in-vitro で実験され、ノックアウトマウスの作成によりその機能が決定された。一方、骨形成研究の最も興味深い現象、古い骨と新しい骨はどのように見分けるのか？破骨細胞と造骨細胞の細胞間相互作用は存在するのか？破骨前駆細胞はどのようにして骨吸収する場を見つけるのか？などの根源的な疑問には答えられないで来た。その理由は生きたまま、生理的な条件で骨の細胞を見るのは難しいことにある。私達はこれらの疑問に答える一つのモデル動物としてメダカを提案し、メダカの骨形成のシステムを検討してきた。その結果、造骨細胞と破骨細胞に発現している遺伝子群や細胞形態が哺乳類と同じであること。またメダカにもリモデリングする部位が存在し、さらに骨折修復のモデルも作成できたことにより、メダカを用い生きたままの細胞を追跡することにより、上記の疑問解明の端緒になることが期待できるようになった。さらにメダカ稚魚を用いることにより、造骨と破骨の全身像を見ることができ、これまでのマウスのような局所の動態ではなく、全身における細胞動態を観察し、骨代謝の全体像を解析できるようになった。

2. 研究の目的

ノックアウトメダカと骨の細胞特異的に発現するトランスジェニックメダカを駆使し、新しい骨代謝システムが検討できる基盤を整える。最終的に骨代謝の究極のテーマである、破骨細胞がどのようにして古い骨と新しい骨を見分けるのかその端緒を得る。

3. 研究の方法

1. 骨折モデルでの骨芽細胞の細胞移動と分化に関わる因子の同定とその因子と破骨細胞分化との関わりを解析する。

2. 咽頭歯骨のリモデリングに関与する骨芽細胞と破骨細胞の動態解析；破骨細胞プ

ロジェニターの動態観察が可能な c-fms プロモータートランスジェニックメダカと c-fms ノックアウトメダカの確立により、そのプロジェニターの動態と分化機構を解析する。

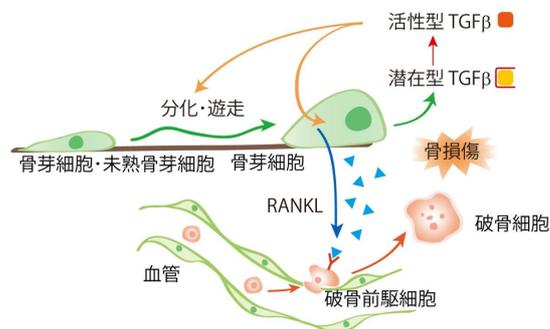
4. 研究成果

(1) 骨折修復モデルを用いた骨折修復因子の同定とその機能

トランスジェニックメダカの動態解析から、メダカ尾びれ骨折修復時に未熟骨芽細胞を含む骨芽細胞は、隣接する鱗条表面から骨折部へ移動し、分化する。骨芽細胞が骨折部に移動し、分化し、骨折部特異的に骨形成を行うためには、骨折の箇所を知る必要がある。TGFβ阻害剤を用いた実験から、骨折部で分泌される TGFβ-2 は、骨芽細胞の骨折部への遊走と、分化に関与していることが示唆された。

哺乳動物の発生において、TGFβ-2 は成長板周辺の石灰化軟骨や肥大軟骨細胞で発現する。また、骨折修復においては、軟骨性仮骨形成期に発現が上昇すると報告されている。実験結果と合わせて考えると、TGFβ-2 は、内軟骨性骨化における軟骨細胞の分化や石灰化、未熟骨芽細胞の骨形成領域への遊走と分化に関与していると考えられる。一方、破骨細胞に対しては、阻害剤を用いた実験から、TGFβ-2 のシグナルが骨折修復における初期破骨細胞の分化に関与することが示唆された。阻害剤処理群においても、コントロール群で後期破骨細胞誘導が生じる時期には、同様に破骨細胞誘導が生じていた。TGFβ阻害によって、骨折初期の RANKL の発現が減少していたこと、後期破骨細胞誘導時期における RANKL 発現が定常状態とほぼ変わらないことを考えると、後期には TGFβ非依存的なメカニズムで破骨細胞分化が起こっていることが示唆された。下図に結論を図示し

た。



TGFβ-2 は
骨芽細胞：骨折部への移動と分化に関与する。
破骨細胞：RANKL 発現を介した初期破骨細胞
分化に関与する。

(2) 咽頭歯骨の骨モデリング機構の解明
メダカの破骨細胞は、歯足骨と呼ばれる
咽頭部の歯（咽頭歯）を支える骨組織に集
中して局在することが明らかになっている。
近年の研究で咽頭歯は生涯を通して生え変
わることが示唆されたが、それに伴って歯
足骨の骨改変がどのように起こるのかにつ
いてはわかっていなかった。本研究では歯
交換に伴い、シンプルな構造の歯足骨列に
おいて骨モデリングが起こることを示し、
またこのシステムを用いて骨モデリングに
おける骨芽細胞と破骨細胞の相互作用を解
析した。

咽頭歯骨上には成熟歯が集合して複数の
成熟歯列を作っており、各列の
posterior 側には成熟歯の生え変わりのた
めの未熟な歯である歯胚が並んでいる。成
熟歯は円錐状の咽頭歯とその下にある円柱
状の歯足骨から成り、それらは結合組織に
よって結合している。一方歯胚は歯足骨を
持たない。歯足骨と歯胚が存在する面で水
平切片を作製し、骨組織の様子を観察した
ところ、骨組織の状態から歯胚及び成熟歯
の発生ステージをそれぞれ3段階ずつに分
類ことができ（歯胚：ステージ i-iii、成
熟歯：I-III）ステージが進んだものほど
anterior 側に配置されるように規則正しく
並んでいることが分かった。すなわち、
成熟歯列の posterior 側にはステージ I の

歯が、anterior 側にはステージ III の歯が
局在していた（下図参照）

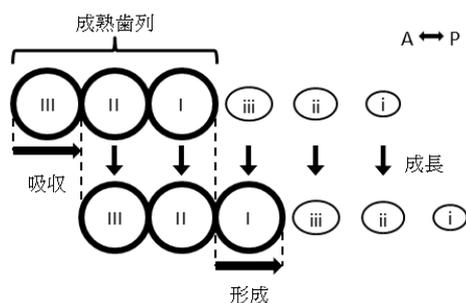
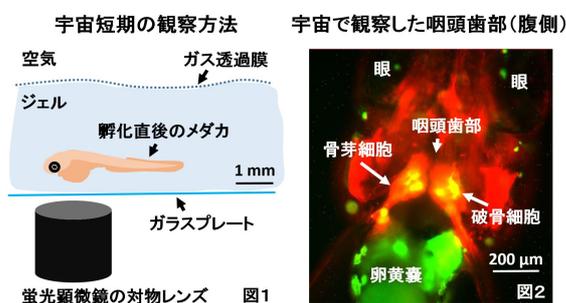


図1: 歯足骨代謝の様子

次にトランスジェニックメダカの解析から、
歯足骨列というシンプルな構造において骨
芽細胞は骨形成面に、破骨細胞は骨吸収面
に分極して局在しており、歯交換に伴って
生涯にわたって骨モデリングを起こすとい
うことが明らかになった。c-fms-a 変異体
の解析から骨モデリングには破骨細胞の骨
吸収が必須であることが分かった。正常な
骨モデリングを達成するにあたり、破骨細
胞には以下の二つが要求されると考えられ
る。第一に適切な位置で骨吸収を行うこと。
そして第二に骨形成量とバランスのとれた
骨吸収を行うことである。

最後にこの咽頭歯骨の骨リモデリング
が微小重力下の環境でどのように変化す
るかを調べた。2014年の宇宙実験では、骨関
連トランスジェニックメダカの稚魚を特殊
なジェルに包埋することで、生きた状態で
姿勢を固定させたまま国際宇宙ステーショ
ン内に移送し、微小重力環境下直後から咽
頭歯骨の細胞をリアルタイムで一週間連続
観察した（次ページの図を参照）。この結
果、骨芽細胞と破骨細胞特異的な蛍光が共
に増加しており、また遺伝子発現でも同様
の遺伝子の発現増加が見られた。さらに遺
伝子解析による微小重力初期に発現が変化
した遺伝子として、FKBP5、ddit4、そして
pai-1 が見出され、ともにグルココルチコ
イド受容体に関連する遺伝子であった。



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 3 件)

1. Chatani, M., Mantoku, A., Takeyama, K., Abduweli, D., Sugamori, Y., Aoki, K., Ohya, K., Suzuki, H., Uchida, S., Sakimura, T., Kono, Y., Tanigaki, F., Shirakawa, M., Takano, Y. and Kudo, A. DOI: 10.1038/srep14172

Microgravity promotes osteoclast activity in medaka fish reared at the international space station. *Sci. Rep.* 5: 14172 (2015)

2. Mantoku, A., Chatani, M., Aono, K., Inohaya, K. and Kudo, A. Osteoblast and osteoclast behaviors in the turnover of attachment bones during medaka tooth replacement. *Dev. Biol.* 409: 370-381 (2016)
doi: 10.1016/j.ydbio.2015.12.002.

3. Takeyama, K., Chatani, M., Inohaya, K. and Kudo, A. TGF β -2 signaling is essential for osteoblast migration and differentiation during fracture healing in medaka fish. *Bone* 86: 68-78 (2016) doi: 10.1016/j.bone.2016.03.001

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Masahiro Chatani, Yoshiro Takano, Takeshi Todo, Akira Kudo

RANKL/OPG double deficient medaka unveils the decision system for the bone resorption site in a whole-body. The ASBMR 2015 Annual Meeting, Oct 9-12, 2015 Seattle, WA, USA

2. Masahiro Chatani, Akiko Mantoku, Kazuhiro Takeyama, Hiroya Morimoto, Takehiko Ito, Naoki Tanigawa, Koji Kubota,

Hiromi Suzuki, Satoko Uchida, Japan; Fumiaki Tanigaki, Masaki Shirakawa, Yoshiro Takano, Akira Kudo

Early response to microgravity in the analysis of whole transcriptome and live imaging. the ASBMR 2015 Annual Meeting, Oct 9-12, 2015 Seattle, WA, USA

3. Kazuhiro Takeyama, Masahiro Chatani, Akira Kudo

TGF β signaling activated by MMP2 is essential for bone fracture healing
9th European Zebrafish Meeting, Oslo Congress Center, June 28-July 2, 2015 Oslo, Norway

4. Masahiro Chatani, Akiko Mantoku, Kazuhiro Takeyama, Dawud Abduwari, Kazuhiro Aoki, Yasutaka Sugamori, Keiichi Ohya, Satoko Uchida, Hiromi Suzuki, Toru Sakimura, Yasushi Kono, Fumiaki Tanigaki, Masaki Shirakawa, Yoshiro Takano and Akira Kudo

Microgravity enhances osteoclast activity revealed by 2 months-rearing of medaka fish in ISS
ISSR&D Conference, July 7-9, 2015 Marriot Copley Place, Boston, MA, USA

5. Masahiro Chatani, Yoshiro Takano, Takeshi Todo, Akira Kudo

RANKL/OPG double knockout medaka unveils the decision system for the osteoclast site in a whole-body. FishBone2015, Oct. 8, 2015 Harborview Medical, Seattle, WA, USA

6. Akira Kudo Medaka Osteoclast in ISS. 12th Japan-Korea joint seminar on space environment utilization Oct. 20-21, 2015 Yonsei University International Campus, Songdo, Incheon, South Korea

7. 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

〔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

<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