

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	骨折修復における破骨細胞と骨芽細胞の分化誘導制御メカニズムの解析
Title(English)	
著者(和文)	武山和弘
Author(English)	Kazuhiro Takeyama
出典(和文)	学位:博士（理学）, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10089号, 授与年月日:2016年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:工藤 明,川上 厚志,徳永 万喜洋,山口 雄輝,立花 和則
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10089号, Conferred date:2016/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 27 年度

博士論文

骨折修復における破骨細胞と骨芽細胞の
分化誘導制御メカニズムの解析

東京工業大学 大学院生命理工学研究科

生命情報専攻 工藤・川上研究室

武山 和弘

指導教官 工藤 明 教授

川上 厚志 准教授

目次

要旨	1
背景・目的	1
方法・結果・考察	2
報文目録	4
参考論文	4
第 1 章 緒言	5
1.1. 骨の力学的な働き	5
1.1.1. 骨の起源	5
1.1.2. 骨形成の様式	6
1.2. 骨による無機物の貯蔵	7
1.2.1. 水生生物における骨組織の進化	7
1.2.2. 骨組織でのカルシウムの貯蔵	8
1.3. 骨代謝を行う細胞	9
1.3.1. 軟骨細胞	9
1.3.2. 骨芽細胞	10
1.3.3. 骨細胞	10
1.3.4. 破骨細胞	11
1.3.5. 骨形成と骨吸収の相互作用	12
1.4. 骨の疾患	14
1.4.1. 骨折	14
1.4.2. 代謝性骨疾患	14

1.5. 骨疾患の治療	16
1.5.1. 骨代謝の制御による対症療法	16
1.5.2. 再生医療	16
1.6. メダカを用いた骨研究	17
1.6.1. メダカにおける骨研究	17
1.6.2. メダカを用いた骨研究の意義	18
1.7. 本研究の目的	20
図表	21
第2章 メダカ骨折修復モデルの確立と破骨細胞と骨芽細胞の動態	25
2.1. 序論	25
2.1.1. 骨折修復の過程	25
2.1.2. 骨折修復における骨芽細胞と破骨細胞	27
2.1.3. メダカを用いた骨折修復研究の意義と目的	29
2.3. 実験結果	32
2.3.1. メダカの尾ヒレの構造と破骨細胞と骨芽細胞の局在	32
2.3.2. メダカ骨折修復モデルの開発	33
2.3.3. 骨軟骨染色	33
2.3.4. 破骨細胞と骨芽細胞の3次元経時観察	34
2.3.5. 初期破骨細胞と後期破骨細胞の組織解析	35
2.3.6. 破骨細胞の細胞起源	36
2.3.7. 骨芽細胞の細胞起源	37
2.3.8. Tg (COX-2: GFP)の作製と骨折修復における COX-2 の発現解析	38

2.3.9. COX-2 活性阻害下での破骨細胞と骨芽細胞誘導	39
2.3.10. PGE2 受容体の発現	40
2.4. 考察	41
2.4.1. メダカの尾ヒレの骨代謝	41
2.4.2. メダカ尾ヒレ骨折修復モデルの利点	42
2.4.3. メダカ骨折修復における骨形成機構	43
2.4.4. 骨折修復における 2 種類の破骨細胞の役割	43
2.4.5. 骨折修復における破骨細胞の細胞起源と分化機構	44
2.4.6. 骨折修復における骨芽細胞の細胞起源と分化機構	45
2.4.7. 骨折修復における骨形成と骨吸収の相互作用	46
2.4.8. 炎症に応答した骨折修復制御	46
2.5. 結論	48
図表	49
第 3 章 炎症性サイトカイン TGF β の骨折修復における機能	72
3.1. 序論	72
3.1.1. 骨代謝における TGF β の働き	72
3.1.2. TGF β 活性化メカニズム	75
3.1.3. メダカ骨折修復モデルを用いた TGF β 機能解析の意義と目的	76
3.2. 結果	78
3.2.1. 骨修復における TGF β の発現	78
3.2.2. メダカ尾ヒレにおける未熟骨芽細胞の局在	78
3.2.3. 骨芽細胞の細胞移動と細胞増殖	79

3.2.4. TGFβ阻害下での未熟骨芽細胞の遊走と分化	80
3.2.5. TGFβ阻害下での破骨細胞分化	83
3.2.6. メダカ骨修復における MMP の発現	84
3.2.7. TGFβ阻害下での MMP の発現	84
3.3. 考察	86
3.3.1. メダカの骨芽細胞	86
3.3.2. 骨折修復における TGFβ-2 の働き	86
3.3.3. 骨芽細胞における TGFβシグナルの働き	87
3.3.4. 破骨細胞における TGFβシグナルの働き	88
3.3.5. ヒレ再生における骨修復の意義	89
3.3.6. MMP による位置特異的 TGFβの活性化	90
3.4. 結論	92
図表	93
第 4 章 結言	118
第 5 章 実験手法	119
5.1. 実験動物と飼育方法	119
5.2. 尾ヒレの骨折	119
5.3. 尾ヒレの再生	119
5.4. 阻害剤と活性化剤の処理	119
5.5. 遺伝子のクローニング	120
5.6. 塩基配列の決定	121
5.7. 半定量 RT-PCR	121

5.8. トランスジェニックメダカの作製.....	122
5.9. 樹脂切片の作製.....	122
5.10. 組織切片の染色.....	123
5.11. Whole-mount BrdU 染色.....	124
5.12. 骨の生体染色.....	125
5.13. 骨染色.....	125
5.14. 共焦点レーザー顕微鏡による生体の 3D イメージング.....	125
5.15. 電子顕微鏡解析.....	126
5.16. Whole mount RNA in situ hybridization.....	126
図表.....	129
第 6 章 参考文献.....	130
第 7 章 謝辞.....	138

要旨

背景・目的

骨折修復は骨吸収と骨形成の協調した働きによって制御されており、骨折の治療だけでなく、骨代謝に関わる細胞の機能と分化機構が研究されてきた。骨折修復の過程は、炎症、仮骨形成、リモデリングの3つのステージに分類される。損傷を起こした骨組織は、炎症を起こし、修復のための細胞群を呼び寄せる。この中で仮骨形成期において特に重要なのが、骨を作る働きをする骨芽細胞と骨を吸収する働きをする破骨細胞である。骨芽細胞は骨基質を分泌し、骨折部を覆うようにこぶ状の骨組織である仮骨を形成する。続くリモデリング期においては、骨を吸収する細胞である破骨細胞が重要な役割を果たす。破骨細胞は、骨芽細胞が形成した仮骨を再び吸収し、形を整える。骨芽細胞による仮骨形成と破骨細胞によるリモデリングが繰り返されることにより、不要な骨が取り除かれ、なめらかな骨の輪郭と強度を回復する。これらの細胞は骨折修復のみならず、骨粗鬆症を始めとした骨疾患の多くに関わっており、破骨細胞と骨芽細胞の由来や分化・機能制御メカニズムを明らかにすることが骨代謝研究の重要な課題となっている。

これまでにマウスやラットなど哺乳動物を用いた実験系において、骨折修復の各ステージで重要なサイトカインや細胞集団が存在することが報告されてきた。また、骨芽細胞は血流中や骨表面の前駆細胞に由来し、破骨細胞は骨髄に由来するといわれている。しかしながら、骨折修復においては、修復の進行具合や損傷した骨の形状により、細胞の分化や機能を制御する必要があるため、骨折修復の解析は生きたままリアルタイムに行う必要がある。実際に修復の進行具合に応じて次々と誘導される細胞群の動態を生きたまま解析することで、骨折修復のみならず骨代謝における新たな知見を得られることが期待される。このような理由で、骨折修復を生きたまま解析するため、メダカを用いた新たな骨折修復モデルの開発に取り組んだ。本研究の目的は、新たに確立したメダカ骨折修復モデルを用いて、骨折修復における破骨細胞と骨芽細胞の機能と分化誘導を制御するメカニズムを明らかにすることである。

メダカ骨折修復モデルの確立と破骨細胞と骨芽細胞の動態

メダカの尾ヒレの骨組織である鰭条は一对の瓦上の骨からなるが、このうち片側のみを周囲の軟組織を傷つけないようにガラスキャピラリーを用いて骨折させた。まず骨軟骨染色を行い、修復過程を観察したところ、軟骨様の基質が徐々に石灰化するに伴い仮骨を形成し、さらに仮骨はリモデリングされ、最終的になめらかな骨の形状を回復した。

そこで、この過程でどのように破骨細胞と骨芽細胞が働くのか生きたまま解析することを試みた。破骨細胞と骨芽細胞を可視化する系として、破骨細胞特異的遺伝子である酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)プロモーター下流で DsRed が、骨芽細胞特異的遺伝子である *osterix* プロモーター下流で GFP が発現するトランスジェニックメダカ(Tg)を用いた。経時的な観察の結果、破骨細胞が骨芽細胞による仮骨形成に先立って誘導されることがわかった。骨折後 3 日目に現れる破骨細胞(初期破骨細胞)は、骨芽細胞による仮骨形成が起こる 7 日目にはほぼ消失した。続いて、11 日目に再び破骨細胞(後期破骨細胞)が現れ、25 日目にはなめらかな骨の形状を回復した。この結果から、骨折修復において機能的に異なる 2 種類の破骨細胞が存在し、初期破骨細胞は骨断片を吸収する働きが、後期破骨細胞は仮骨をリモデリングし形を整える働きがあることがわかった。また、細胞追跡の結果から、破骨細胞は初期、後期ともに血管周囲で分化すること、骨芽細胞は前後の鰭条表面から移動し骨折部に集合することが明らかになった。

つづいて、以上の細胞移動と分化に関わる現象として、組織の炎症に注目した。炎症応答性酵素であるシクロオキシゲナーゼ 2(COX-2)は炎症においてプロスタグランジン E2 を産生する酵素であり、骨折修復に必須の酵素であることが知られている。COX-2 の発現上昇を生きたまま解析するため、プロモーター下流で GFP を発現する Tg を作出し解析したところ、骨折後 3 日目で血管周囲の COX-2 発現が上昇することが明らかになった。さらに、COX-2

の働きを薬剤により阻害したところ、後期破骨細胞誘導が減少し仮骨のリモデリングが阻害されることがわかった。

炎症性サイトカイン TGFβの骨折修復における機能

破骨細胞が骨芽細胞を制御することで、骨吸収に伴った骨形成を行う因子をカップリングファクターという。トランスフォーミング成長因子β(TGFβ)はカップリングファクターの一つであると考えられてきた。TGFβは炎症性サイトカインの一つでもあり、骨折修復にも深く関わっていると考えられるが、TGFβの骨折修復における機能はわかっていない。哺乳動物を用いた実験系では、骨組織周辺の軟組織で起こる重篤な炎症反応が解析を妨げていることが一因であり、メダカ骨折修復モデルを利用することで TGFβの骨折修復における働きを解析できると考えた。

哺乳動物において 3 つの TGFβアイソフォーム TGFβ-1～3 が知られている。メダカ骨折修復モデルにおいてこれら TGFβの発現を解析したところ、TGFβ-2 のみが骨形成領域で発現していることから、骨芽細胞の骨形成に関与していることが考えられた。そこで、骨芽細胞の分化誘導を詳細に解析するため、新たに、未熟な骨芽細胞を検出できる type X collagen (COLX)プロモーター下流で GFP を発現する Tg を用いた。COLX 陽性の骨芽細胞は osterix 陽性の骨芽細胞よりも広範囲に局在し、骨折修復に応答して骨折部へ移動し、osterix 陽性の骨芽細胞へと分化した。薬剤により TGFβシグナルを阻害したところ、COLX 陽性の骨芽細胞の移動と osterix 陽性細胞への分化が著しく抑制された。一方で、破骨細胞に対する TGFβ-2 の働きを調べるため破骨細胞を DsRed で標識した Tg を用いたところ、TGFβシグナルの阻害は血管周囲での初期破骨細胞の分化を抑制した。

TGFβは潜在型として分泌されるため、機能するためには活性型に代謝される必要がある。TGFβ活性化メカニズムとしてマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)に注目して発現解析を行った。その結果、TGFβシグナルとは独立して MMP-2 および MT1-MMP の発現が骨形成領

域で検出された。以上より、骨形成領域でMMPを介したTGFβ-2の活性化が未熟な骨芽細胞の遊走と分化、破骨細胞の分化に関与していることが示唆された。

報文目録

1. [Takeyama K](#), Chatani M, Takano Y, Kudo A

In-vivo imaging of the fracture healing in medaka revealed two types of osteoclasts before and after the callus formation by osteoblasts

Developmental Biology, 394 (2) 294-304, 15 October, 2014

2. [Takeyama K](#), Chatani M, Inohaya K, Kudo A

TGFβ-2 signaling is essential for osteoblast migration and differentiation during fracture healing in medaka fish

Bone, under revision, 2015

参考論文

- 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, Kudo A. Microgravity promotes osteoclast activity in medaka fish reared at the international space station. Scientific Reports 5:14172, 2015
- Murata Y, Yasuda T, Watanabe-Asaka T, Oda S, Mantoku A, [Takeyama K](#), Chatani M, Kudo A, Uchida S, Suzuki H, Tanigaki F, Shirakawa M, Fujisawa K, Hamamoto Y, Terai S, Mitani H. Histological and Transcriptomic Analysis of Adult Japanese Medaka Sampled Onboard the International Space Station. Pros One 10(10):e0138799, 2015

第 1 章 緒言

骨は、われわれ脊椎動物にとって象徴的な器官である。脊椎動物の祖先である無脊椎動物は硬組織の無機成分として炭酸カルシウムを利用し、進化の過程でリン酸カルシウムを主要な無機成分とする骨を獲得した。この過程で、骨は単に骨格としての役割にとどまらない生理機能を獲得した。骨は身体の支持と運動だけでなく体液恒常性の維持や造血など、様々な生理現象に関わっていることから、骨は単なる運動器とは異なる。本章では、まず、進化の過程で獲得した脊椎動物の骨の役割と、それを維持するためのメカニズム、その破綻による骨病変について概説する。続いて、骨研究における、魚類を用いた研究を紹介し、本研究の包括的な目的と意義を述べる。

1.1. 骨の力学的な働き

1.1.1. 骨の起源

われわれ脊椎動物の骨に限らず、多くの生物が硬組織を獲得した要因となったのは地球の重力である。単細胞生物から多細胞化し体が大型化するに伴い、生物は自分の体を支える十分な運動能力を得るために、硬組織を形成する必要性が生じたと考えられる。また、生物が成長する過程で骨の形は力学的に安定であるように作り替えられなければならない。無脊椎動物の炭酸カルシウム由来の硬組織は、基本的には分解による再構成を介さずに成長する貝類のような相似成長を行うといえる。一方で、脊椎動物の骨の主成分であるリン酸カルシウムは、形成と分解を容易に行うことができ、骨は必要に応じて作り替えられている。このような理由から脊椎動物の硬組織である骨は、無脊椎動物に比べ特に大型化や複雑な構造の形成に有利な形質であったと考えられる。

水中で生まれた脊椎生物の中には進化の過程で水生から陸生へと移るものが現れた(Fig. 1-1)。水生脊椎動物は浮力を利用するため、彼らの受ける力学的負荷は地上の 1/6 程度といわれる[1]。6 倍近い負荷に適応するために、大型の陸生生物はより高度な骨を生み出してきた。このように、力学的な負荷は骨の起源に強く関連している。実際に、微小重力環境においてヒトに起こる問題の一つとして、カルシウムの流出により骨が脆弱になることが知ら

れている[2]。これは骨の形成が遅れることによるのか、骨が減少することによるのか議論されており、正確なメカニズムはわかっていないが、少なくともこの現象は骨組織と重力に切り離せない関係があることを示唆している。

1.1.2. 骨形成の様式

炭酸カルシウムを主成分とする硬組織をもった無脊椎動物に対し、脊椎動物においてはリン酸カルシウムを骨の主成分としている。脊椎動物において、骨化はコラーゲンにリン酸カルシウムの結晶が沈着することによって起こる。骨化の様式は大きく2つに大別され、それぞれ膜性骨化、内軟骨性骨化と呼ばれる。

膜性骨化は軟骨を介さない骨化様式で、結合組織中の未分化間葉系細胞が骨芽細胞に分化し、骨基質を分泌することによって起こる。鋳型を介さない骨形成であるため、形成初期の膜性骨はコラーゲンの配列が錯綜しており繊維性骨とも呼ばれる。骨の長径方向の成長でもこの膜性骨化が起こるが、成長の過程で層状の規則的な配列に作り替えられる[2]。

膜性骨化は脊椎動物が最初に獲得した骨形成であると考えられている[2]。最も原始的な脊椎動物といわれる甲皮類の一群である甲冑魚は、硬い外骨格に覆われていたが、その化石中から軟骨組織は見つからなかった(Fig. 1-1A)。このように、初期の脊椎動物が登場した時代には軟骨組織は存在せず、このことは体を覆う外骨格が膜性骨化によって形成されたことを示唆している[3]。外骨格はヒトにおいては、頭蓋骨と鎖骨のみに残されており、両者が膜性骨化によって形成されるのはこのためであると考えられる。

一方で、軟骨を鋳型とした骨化様式が内軟骨性骨化である。初期の脊椎動物には膜性骨化による外骨格だけで十分であったが、陸上への移住や、水中での高い運動性の獲得のために、より強い力学的負荷に耐えうる脊椎骨や体肢骨を形成する必要が生じた。そこで、元来軟骨で形成されていた内骨格を硬組織に置き換える能力を獲得することで、軟骨性骨化が生じたと考えられている[2]。ヒトにおいて、頭蓋骨と鎖骨を除く骨の主たる部分は内軟骨性骨化により形成される。

1.2. 骨による無機物の貯蔵

1.2.1. 水生生物における骨組織の進化

脊椎動物は無脊椎動物から進化した。無脊椎動物の硬組織における無機成分は炭酸カルシウムであるのに対し、脊椎動物の硬組織のほとんどは無機成分としてリン酸カルシウムを利用する。この変化が生じた大きな理由として、前述のように骨格としての特性だけでなく、海水から淡水への移行、水中から陸上への移住により無機イオンを貯蔵する器官が必要になったことが考えられている。

水生脊椎動物のうち硬骨魚類は淡水または汽水域を含む浅い海で生まれたといわれている(Fig. 1-1D)[4]。原始硬骨魚類は季節毎の水位の変化に対応するため肺を獲得し、空気呼吸をすることができた。肉鰭類の肺魚では肺が残っているが(Fig. 1-1F)、条鰭類では浮き袋として進化し呼吸機能を失った(Fig. 1-1E)[5]。海水中では生命活動に不可欠なカルシウムが水中に多く存在していたが、海水に比べ水中カルシウムが少ない淡水や汽水域で生活するためには、体内にカルシウムを貯蔵する必要が生じた。そこで、同じく生命活動に必須であるが海水、淡水ともに含有量の少ないリンと合わせて、体内に貯蔵されるようになった。この時期に、血中カルシウム濃度を増加させるビタミン D^{*1} が獲得され、進化的には硬骨魚類以降の種で確認されている[2]。淡水性硬骨魚類の血中カルシウム濃度は 2.5mM とヒトやニワトリなど高等脊椎動物とほぼ同じであり、体液の恒常性はこの頃にすでに決まっていたと考えられる[2]。

硬骨魚類に対し、淡水へと適応せずに海に残った一群は現在のサメやエイなどの軟骨魚類である(Fig. 1-1C)。彼らは肺や浮き袋のような硬骨魚類特有の形質を持たないことに加え、軟骨魚類の脊椎はほとんどが軟骨でできている[5]。彼らは体内のイオン濃度の調整のため血中に多く尿素を含んでおり、このため食べると癖のある味が感じられる。硬骨魚類に属するが、多くの原生硬骨魚類よりも原始的な形態を保持している肉鰭類シーラカンスは、脊椎を持たず体幹には脊柱のみが認められる。彼らもやはり、血中に尿素を含んでおり、軟骨魚

類に近い方法で体液維持を行っている[5, 6]。このことは脊椎骨の発生と体液恒常性維持が深く関連していることを示唆している。

※1 ビタミン D: 食物からのカルシウム吸収促進、尿からのカルシウム排出抑制、破骨細胞による骨吸収促進により、血中カルシウム濃度を増加させる。

1.2.2. 骨組織でのカルシウムの貯蔵

脊椎動物が陸生に進化すると、カルシウムを食物から摂取しなければならなくなり、さらに高度なカルシウム代謝調整が必要になった。骨の細胞が常に活発に代謝を行い、イオン濃度を調整するため生じたのが、副甲状腺ホルモン^{※2}である[2]。副甲状腺ホルモンを分泌する副甲状腺は陸生以降、すなわち両生類以降の生物にのみ存在する。副甲状腺は発生学的には魚類の鰓に相当するといわれており、体内のカルシウムとリンの調節を行う。副甲状腺ホルモンはビタミン D と共同して骨代謝を調整する働きをしている(Fig. 1-1G)。

両生類の幼生は鰓呼吸を行い水の中で過ごす、成体は肺呼吸を行い、陸で生活するものと水の中で生活するものがある。両生類の一種であるカエルの骨はカルシウムの貯蔵器官としてはまだ十分に発達しておらず、傍脊椎石灰嚢と呼ばれる炭酸カルシウムの器官をもち、この器官がカルシウムの貯蔵庫として機能していることが示唆されている[1]。

生涯を陸で生活する爬虫類以降の脊椎動物の長管骨端部には海綿骨から成る軟骨内骨化部(二次海綿骨)が存在する。低カルシウムで飼育したラットや、卵巣摘出により骨吸収が亢進したラット^{※3}ではこの二次海綿骨が著しく減少することから、二次海綿骨が骨組織において主要なカルシウム貯蔵器官として働いていると考えられており、骨粗鬆症治療のための標的組織の一つとなっている[1]。

※2 副甲状腺ホルモン: 腸や腎臓からカルシウムの吸収を促進すると共に、骨芽細胞に働きかけ骨形成を促進、そして、骨芽細胞を介した破骨細胞分化の促進により、古い骨を新しくする作用を促進する。

※3 卵巣摘出: 卵巣で産生される女性ホルモン(エストロゲン)は直接的または間接的に骨形成を正に制御する。女性に多い閉経後疾患としての骨粗鬆症はエストロゲンの欠乏が原因であり、マウスやラットを用いた卵巣摘出(ovariectomized: OVX)は骨粗鬆症モデルの一つである。

1.3. 骨代謝を行う細胞

上述のように、セキツイ動物の骨は成長に伴い形を変化させながら身体の支持や保護を行い、さらに必要に応じてリン酸カルシウムの貯蔵庫として機能している。骨の形作りや体液恒常性維持のために行われる骨の形成や吸収のことを骨代謝と呼ぶ。骨代謝は、軟骨細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞など多くの細胞群により制御されている。

1.3.1. 軟骨細胞

軟骨細胞は、2 型コラーゲン、ヒアルロン酸、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックスを分泌し、血管や神経のない特殊な軟骨組織を作る(Fig.1-2A)[1]。軟骨組織は、内軟骨性骨化の鋳型となる役割があり、胎児期には全身にわたり存在している。進化的には膜性骨化を行う骨芽細胞よりも後に登場した細胞集団であり[2]、骨芽細胞と共通の細胞起源を持つ。このことから、軟骨細胞は軟骨基質の分泌能を獲得した骨芽細胞が独立した細胞集団であると考えることができる。

骨のつなぎ目には軟骨基質が存在し、組織構造の維持や運動に不可欠な関節を形成する。これらは、永久に軟骨の形質を維持する細胞群であり、静止軟骨細胞と呼ばれる。一方で、骨が成長する際の起点となる骨端線付近には、骨形成に寄与する軟骨細胞群が存在する。骨端線付近の軟骨細胞は細胞増殖の盛んな増殖軟骨細胞層から、成熟軟骨細胞層、基質合成が盛んな肥大軟骨細胞層に移り、やがて硬骨に置き換わり、骨の長軸方向の成長に寄与する(Fig.1-2B)。この際、一部は細胞死するが、一部は骨芽細胞に分化し骨形成に寄与する(Fig.1-2C)[1]。

未分化間葉系細胞に由来する軟骨細胞は、転写因子 **sox-9** の働きで分化する(Fig.1-2A)[1]。**sox-9** は軟骨細胞基質の 2 型コラーゲンの転写に寄与することが知られている。一方、軟骨細胞の後期分化において、転写因子 **runx2** が働き、軟骨細胞の肥大化と血管浸潤に寄与する。一部の肥大軟骨細胞は転写因子 **osterix** を発現し骨形成を行う[1]。**osterix** 欠損マウスでも軟骨組織が存在するため、軟骨内骨化に **osterix** は関与しないと考えられてきた[7]。しかし、最近の研究では、軟骨細胞特異的に **osterix** を欠損させることで、

osterix が肥大軟骨細胞の石灰化や分解に関与することが明らかになった[8]。興味深いことに、runx2 や osterix は骨芽細胞分化にとって重要な因子であり、軟骨細胞と骨芽細胞の働きを制御する共通したメカニズムが存在している。

1.3.2. 骨芽細胞

骨芽細胞は、骨形成を担う細胞であり、骨基質の上に整列している。骨形成期は卵円形の形状で核が片側に偏在する(Fig. 1-3A)[3, 9]。粗面小胞体およびゴルジ体が発達しており、1 型コラーゲンや骨シアロタンパク質など骨質を分泌する。また、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性によりリン酸カルシウムを細胞外基質に沈着させる。

体の骨の大半は軟骨を鋳型として形成されており、軟骨内に浸潤した血管を介し供給された未分化間葉系細胞が骨芽細胞に分化することで内軟骨性骨化が起こる(Fig. 1-2C)[3]。骨芽細胞は鋳型を介さない膜性骨化も行い、骨の長径方向への成長に加え、頭蓋骨や鎖骨など外骨格由来の骨組織は膜性骨化により生じる。骨化の様式は異なるが、内軟骨性骨化を行う骨芽細胞も膜性骨化を行う骨芽細胞も類似のものであると考えられている[1]。

軟骨細胞と同様に骨芽細胞の由来は未分化間葉系細胞である(Fig. 1-3C)。骨芽細胞は未分化間葉系細胞から、転写因子 runx2 と osterix により骨芽細胞に分化する(Fig. 1-3D)[3, 9]。骨芽細胞は最終分化した後、ほとんどは細胞死するが、一部は自ら骨に埋まって骨細胞になるほか、骨形成機能を休止した bone lining cell となる[3]。Bone lining cell は骨膜などに多く存在し、骨損傷などのときに活性化し、骨芽細胞の供給源の一つとなると考えられている。

1.3.3. 骨細胞

骨細胞は骨芽細胞由来の細胞で、自身が分泌したマトリックスに埋まっている。細胞突起を伸ばし、ギャップ結合を介して、骨質中の他の骨細胞とネットワークを形成している(Fig. 1-3B)。細胞突起が通る小腔は骨細管と呼ばれ、骨細管によって生存に必要な酸素や栄養素が供給されることで、骨質中に深く埋まっても骨細胞は生存することができる[3]。

哺乳動物では、骨細胞の寿命は最長で数十年といわれ、骨質中の 9 割を占める細胞集団である。骨細胞ネットワークは以前から、力学的な負荷を感知する働きがあると考えられてきた[2]。骨細胞は骨形成抑制因子である **sclerostin (SOST)** を分泌し骨芽細胞に作用し間接的に骨代謝を制御する。力学的付加の大きいところでは **SOST** の発現が減少することで、付加に応じた骨形成を行っている[1]。しかし、最近の研究で、骨細胞が主体となる骨吸収や骨形成、骨細胞による破骨細胞分化機構の存在が明らかになった[1]。さらに、繊維芽細胞成長因子 23(FGF-23)、**dentin matrix protein-1 (DMP-1)**、**matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)**、X 染色体上エンドペプチデース類似リン酸調節遺伝子 (**PHEX**) などリン代謝に関わる遺伝子群の発現が骨細胞から特異的に検出され、体液恒常性維持の働きがあることも示唆されている。

骨細胞は一部の硬骨魚類と、陸生以降の高等脊椎動物で観察され、骨細管ネットワーク形成は進化に従い複雑化している[10]。このように骨細胞も生物の大型化と陸生への進化に従って獲得された骨芽細胞の一つの形態であると考えられる。骨は骨吸収と骨形成により常に作り替えられ(リモデリング)、力学的な働きを維持している。さらに、高等脊椎動物においては、体内の無機質貯蔵庫として必要に応じて骨形成または骨吸収が行われている。このような骨代謝反応により、成人の骨でも、2~6%は常に新しい骨質に置き換わっているとされており[1]、骨の表面だけでなく骨内部においても骨代謝に関わる骨細胞の働きが非常に重要であると考えられている。

1.3.4. 破骨細胞

破骨細胞は、巨大な多核細胞で骨組織を吸収する役割を持つ。破骨細胞は硬組織の吸収に特化した細胞で、そのための形態学的特徴と生化学的な機能を持つ(Fig. 1-4A)[3, 9]。成熟した破骨細胞は、骨の表面で極性を作り、吸収する内部と外部をアクチン細胞骨格に富んだ構造で遮断する。この構造は電子顕微鏡観察を行うと白く抜けることから明帯と呼ばれている。明帯によって遮断された吸収領域(吸収窩)では、破骨細胞はひだ状の構造(波状縁)を形成する。波状縁からは、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(**TRAP**)、カテプシン K、

マトリックスメタロプロテアーゼ 9(MMP-9)のようなプロテアーゼが分泌されると共に、プロトンポンプにより pH4 の酸性環境を作り、骨質中のタンパク質を分解し、結晶化したリン酸カルシウムを溶解させる。

造血幹細胞に由来する破骨細胞は、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)および破骨分化因子(RANKL)によって分化する(Fig. 1-4B)[3, 9]。M-CSF は造血幹細胞が破骨細胞系列に分化する際に、破骨前駆細胞が増殖するのに必要な初期の因子であり、RANKL は破骨細胞の成熟に必須な因子であると考えられている。興味深いことに、いずれの因子も骨形成に関与する間葉系細胞や骨芽細胞によって分泌されている。また、破骨細胞の分化を強力に阻害する RANKL のデコイレセプターであるオステオプロテグリン(OPG)もまた同様の細胞によって分泌される。このような理由で、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成は密接に関わっている。

1.3.5. 骨形成と骨吸収の相互作用

骨芽細胞と破骨細胞の細胞間相互作用は単に骨芽細胞から一方向的に破骨細胞の分化誘導制御を行うことにとどまらない。破骨細胞の骨吸収と骨芽細胞の骨形成を結びつける因子をカップリングファクターと呼び[2]、破骨細胞が骨芽細胞による骨形成制御することを示唆するいくつかの報告がある。RANKL デコイレセプターである OPG の欠損マウスでは、過剰な破骨細胞誘導が引き起こされるが、これが骨芽細胞による骨形成も活発化することで、表現型を一部相殺する[11]。また、破骨細胞を欠損する c-fos 欠損マウスでは骨芽細胞が減少することで、やはり破骨細胞の不足による表現系を一部相殺する [12]。このような現象を引き起こすカップリングファクターの候補として、骨質中に保持されているサイトカインである、トランスフォーミング成長因子 β (TGF β)、骨形成因子(BMP)、インスリン様成長因子(IGF)が想定されているが、カップリングのメカニズムはまだわかっていない。

骨は成長の過程で力学的に安定な形状に作り替えられ、成体でも力学的な支持能力を保つために新しく作り替えられている。そして、特に高等脊椎動物では骨形成と骨吸収による体液恒常性維持を行っている。骨芽細胞と破骨細胞の相互作用はこのような骨代謝回転を

正常に行うために非常に重要である。進化の過程で、骨を作る細胞はあまり変化していないにもかかわらず、骨の機能は徐々に複雑化していった。そのため、後天的に獲得した機能ほど、絶妙な骨代謝回転の調節によって維持されており、調節機構が何らかの形で破綻することで様々な疾患が発生する。

1.4. 骨の疾患

骨は臓器のように体内恒常性維持のための様々な機能を有するが、基本的には力学的な負荷を支える運動器である。ほとんどの骨代謝疾患は、結果的に運動器としての骨の機能低下を引き起こす。運動機能障害は、最近ではロコモティブシンドロームと呼ばれ、治療法の確立が高齢化社会における重要な課題となっている。

1.4.1. 骨折

骨の連続性が完全に、または部分的に断たれた状態をすべて骨折と呼ぶ。高い負荷がかかった事による外傷性骨折(または新鮮骨折)、小さな外傷の蓄積による疲労骨折、なんらかの骨代謝異常によって生じる病的骨折に分類される[1]。

詳細なメカニズムは後述するが、骨は一般に再生能力を持っており、自然骨折では、離れた骨を人工的に接するように固定しておくだけで治癒する。しかしながら、病的な骨の骨折、修復時の固定が不十分で骨が繋がらなかった場合(偽関節)など、骨表面の細胞活性が低いときの治療には骨移植が行われる。

1.4.2. 代謝性骨疾患

骨は骨形成と骨吸収の絶妙なバランスによって維持されているが、様々な要因により骨代謝のバランスが崩れることで、様々な疾患が発生する。くる病・骨軟化症、骨粗鬆症、大理石骨病などがこれに含まれる[3]。

くる病・骨軟化症は、骨芽細胞による骨の石灰化能力の低下が引き起こす疾患で、成長期に発生する小児疾患をくる病、成人の場合を骨軟化症と呼んでいる。原因は、ビタミン D の不足によるカルシウム、リン両方の不足か、遺伝的もしくは病的要因による慢性的な低リン血症に大別される。

一方で、骨粗鬆症と大理石骨病は骨形成と骨吸収のバランス異常によって引き起こされる。両者のバランスが骨吸収に偏ると、骨の形状を維持したまま骨密度が減少する骨粗鬆症を

引き起こす。逆に、両者のバランスが骨形成に偏ると、骨密度が上昇し、重度のものでは骨髓腔が石灰化組織で埋め尽くされる大理石骨病を発症する。

1.5. 骨疾患の治療

1.5.1. 骨代謝の制御による対症療法

骨の疾患治療において、骨形成または骨吸収を人為的に制御することで対症療法が行われる。骨吸収抑制作用をもつ薬剤として、ビスホスホネート、抗 RANKL 抗体、抗カテプシン K 抗体がある。また、骨形成促進作用を持った薬剤として、副甲状腺ホルモン製剤、抗スクレロシン抗体などがあり、臨床試験中のものも含めて多くの薬剤が存在する[1]。

いずれの薬剤においても共通するのは、骨芽細胞や破骨細胞を始めとした骨の細胞に、直接的あるいは間接的に働くことで機能していることである。すなわち、骨を維持するための細胞の動きを制御するメカニズムを明らかにすることは骨疾患の治療のために非常に重要である。

1.5.2. 再生医療

薬剤による治療の他に、骨と軟骨の再生医療が研究され、一部はすでに臨床段階でも利用されている[1]。組織修復は内因性の修復と外因性の修復に大別される。内因性修復は、外からサイトカインを投与することで、本来体内に備わっている前駆細胞の増殖や分化を促進することで欠損した組織を充填する。一方で、外因性修復は組織そのものや分化能力を持った細胞などを移植することで修復を誘発する。

最近では、軟骨培養細胞や、培養系で作られた人工骨の移植なども行われている。このように再生医療においても、重要なのは体内または体外で基質を形成する骨芽細胞や軟骨細胞の働きや分化を制御することである。基礎研究で明らかになった細胞の機能制御や分化メカニズムは、治療薬の開発だけにとどまらず、骨軟骨再生医療に応用されている。

1.6. メダカを用いた骨研究

小型の淡水性硬骨魚類であるメダカは、少ないスペースで多量に飼育でき、多産で世代交代が早いことに加え近郊系が確立され、ゲノムが解読されており、分子生物学的・遺伝学的研究の実験動物として優れている。メダカの胚は母体外で発生し、透明であるため、発生生物学分野では生きたまま組織の形態形成を解析する系として、古くから用いられてきた。最近では、メダカを含めた小型魚類を用いた実験系は、医学・薬学の分野で、ヒトの疾患メカニズム解析や薬剤スクリーニングなどを行う系として注目されている。

1.6.1. メダカにおける骨研究

メダカは孵化するまでに基本的な骨の構造が形成され、顕微鏡下で生きたまま骨形成を観察できることから、骨発生研究の有力な実験動物である。メダカの骨形成は顔面骨のみ軟骨を鋳型とした軟骨性骨化が起こるが、内軟骨性骨化はおこらず、ほとんどすべての骨が膜性骨化によって生じている。また、骨質に埋め込まれた骨細胞は存在しない[10]。しかし、哺乳動物などと同様に骨形成を行う骨芽細胞と、骨吸収を行う破骨細胞の存在が報告されている[13, 14]。これら骨芽細胞や破骨細胞の分化や機能に関連した哺乳動物と相同な遺伝子も発見され、その機能も保存されていることが示唆されている。

メダカの骨芽細胞

メダカの骨芽細胞では、哺乳動物などと同様に転写因子 *osterix* を発現し、成熟するに従い *osteocalcin* を発現する[14, 15]。最近の研究では、*osterix* を発現する前の未熟な骨芽細胞で 10 型コラーゲン(*typeX collagen: COLX*)の発現が報告されている[16]。これは、哺乳動物では軟骨細胞が分泌する基質であり、肥大軟骨細胞のマーカー遺伝子とされている。軟骨細胞の肥大化と石灰化を伴う内軟骨性骨化の起こらないメダカでは、骨芽細胞が一部軟骨細胞の働きを持っていることを示す進化的に興味深い現象である。

また、メダカを含め魚類は優れた再生能力を持っており[17]、同じ硬骨魚類であるゼブラフィッシュの尾ヒレ再生モデルにおいて次のような興味深い報告がある。骨を再生するため

に最終分化した骨芽細胞が、未熟な状態に戻り(脱分化し)、増殖し再分化することで再生に寄与するという[18-20]。しかし、この結果はメダカにおいては再現できず、同じ硬骨魚類でも異なった再生メカニズムが存在することが示唆されている。骨芽細胞の脱分化は、分化の定義が曖昧な魚類での研究では未だ議論の余地があるが、一般に最終分化した骨芽細胞は増殖できないとされているので、詳細なメカニズムが明らかになることが期待される。

メダカの破骨細胞

メダカの破骨細胞は、顎歯、咽頭歯、神経棘、血管棘で観察され、哺乳動物と同様に TRAP、カテプシン K、MMP-9 のようなマトリックス分解に関わる遺伝子を発現する。顎歯と咽頭歯において、破骨細胞は歯の生え変わりに寄与しており、明帯と波状縁を形成する多核の破骨細胞が存在することが報告されている[21]。一方で、脊椎骨から伸びる神経棘と血管棘においては、多核化し明帯は形成するものの波状縁が存在しない破骨細胞が報告されている[13]。神経棘と血管棘の破骨細胞は、脊椎骨が成長に従い徐々に大きくなること、また血管や神経が通る間隙を形成するのに必須であり、骨吸収活性は低いが高い移動能力をもっていることが示唆される。

破骨細胞の分化では、メダカにおいても RANKL が重要な働きをしていると報告されている[22]。RANKL を熱誘導的に強制発現したメダカでは、神経棘、血管棘に加え脊椎骨の周囲で TRAP 陽性の破骨細胞が分化する。全身での RANKL 発現誘導に関わらず、骨の周囲以外では破骨細胞分化が起こらないこと、また、普段は破骨細胞の存在しない椎骨周辺でも破骨細胞分化が起こることは、RANKL 刺激以前に破骨細胞の前駆細胞は骨の周囲に存在していることを示しており、骨の形作りにおける破骨細胞の動態を制御する未知のシステムが存在することが示唆される。

1.6.2. メダカを用いた骨研究の意義

骨は元々、力学的な支持・保護を行う器官として生まれたが、脊椎動物の骨は進化の過程で、付加的に多くの機能を獲得してきた。体液恒常性維持のような付加的に獲得した機能

は、絶妙なバランスで制御されており、その破綻が、ヒトにおける骨代謝疾患の多くの原因となっている。しかしながら、疾患を引き起こす直接的な要因となる骨芽細胞や破骨細胞のような骨の細胞は進化の過程であまり変化していない。

メダカの骨は進化的に見れば未熟な器官であり、内軟骨性骨化のような高度な骨形成機構、副甲状腺ホルモンを用いた高度な体液調整機構、そして、骨芽細胞の最終分化細胞としての骨細胞を欠いている。しかしながら、メダカにおいても骨は合理的なパターンニングをもって形成され、必要に応じて常に形や大きさが調整されている。このような骨形態形成機構は、哺乳動物でも解明されておらず、これを明らかにするためには、より単純な細胞組成をもったメダカをモデルとすることが非常に有効である。

また、最近では顕微鏡技術の発展により、大型の脊椎動物においても生きたまま細胞動態を観察することができるようになってきた[23]。しかしながら、その適応範囲は非常に限られており、生きた骨芽細胞や破骨細胞の動きを観察することができるという点で、メダカは非常に強力な実験系となり得る。

以上のように、骨研究においてメダカを用いる意義は以下の2点に集約される。

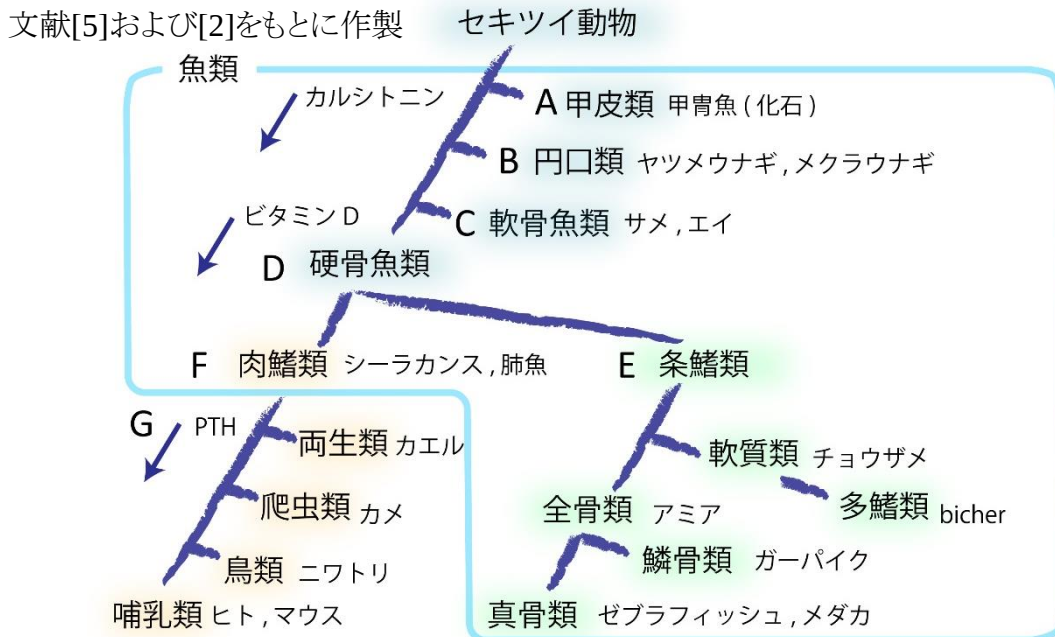
骨芽細胞と破骨細胞の機能制御による骨の形態形成機構の解析を行えること

骨芽細胞と破骨細胞の生きた細胞動態の解析を行えること

1.7. 本研究の目的

本研究では、メダカを利用する意義を最大限生かすために、まず、薄く透明なメダカの尾ヒレを用いて、生きたまま骨折修復に伴う骨芽細胞と破骨細胞の挙動を解析できる新しい実験系を確立した(第2章)。この中で、周囲の骨組織表面の骨芽細胞が骨折部に移動し骨修復を行うこと、修復過程に応じて必要な破骨細胞が血管表面で分化誘導されることを明らかにした。続いて、確立したメダカ骨折修復モデルを利用して、複雑な生理作用により骨における機能がよくわかっていない炎症性サイトカイン $\text{TGF}\beta$ の機能解析を行った(第3章)。 $\text{TGF}\beta$ のアイソフォームのうち $\text{TGF}\beta$ -2 が特異的に骨修復で働き、骨芽細胞の遊走と分化、破骨細胞の分化を誘導する働きがあることが新たに明らかになった。

Fig. 1-1 進化の系譜と骨代謝関連因子

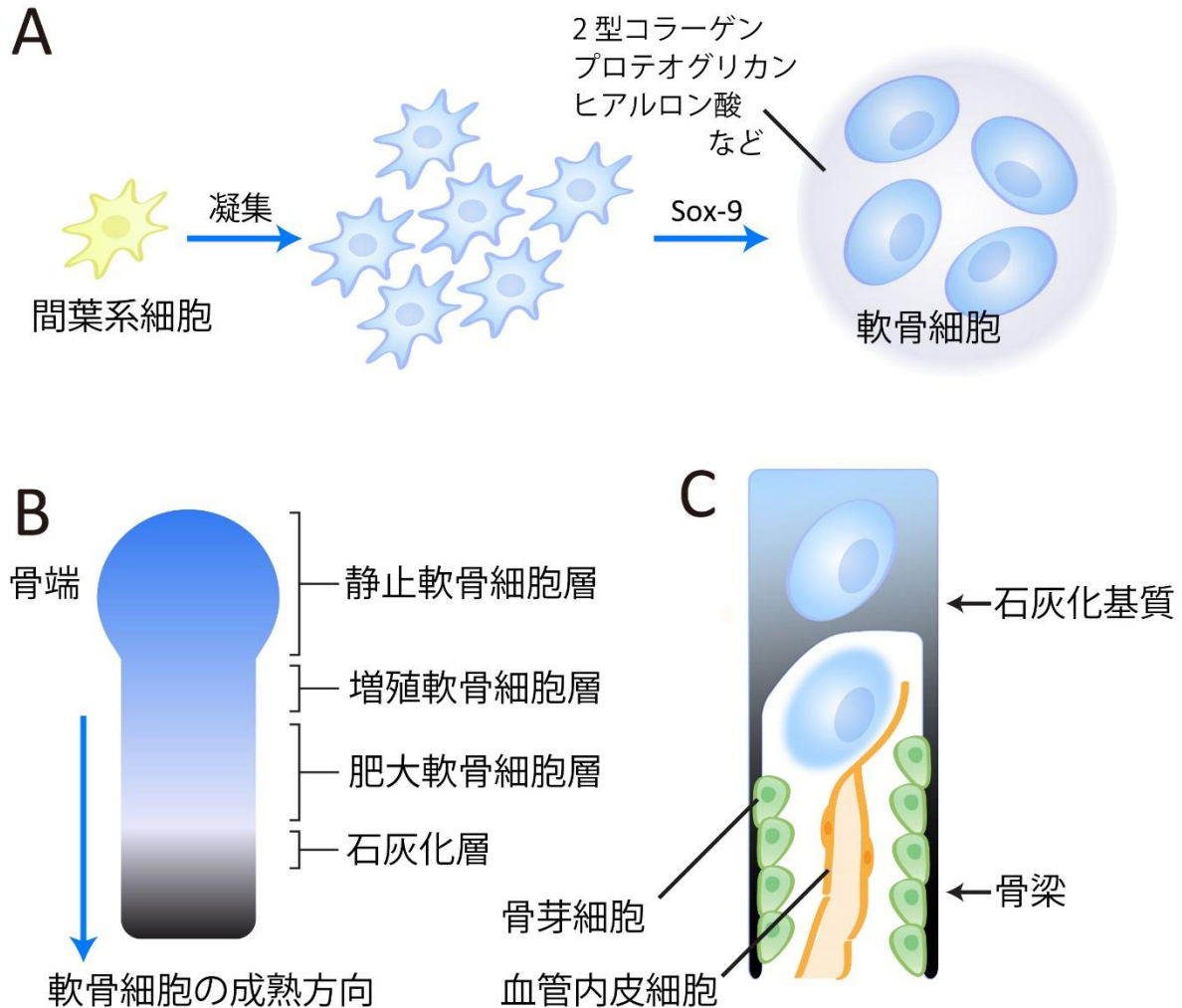


セキツイ動物進化の系譜。特に断りが無い限り、現生生物種を例示している。

- (A) 甲皮類は化石資料から定義される初期の脊椎動物である。体表はリン酸カルシウムの骨で覆われていた。また、軟骨組織が観察できず、骨芽細胞による膜性骨化によって骨組織が作られていたと考えられている。
- (B) 円口類は甲皮類と合わせて無顎類と定義されることもある。その名の通り、顎や歯のような捕食器官がない。無顎類の化石資料は甲冑魚のように硬骨を持つものがほとんどで、円口類は骨形成能力を退化させたと考えられている。円口類は軟骨をもつ。また、カルシウム代謝ホルモンであるカルシトニンも見つかっている。
- (C) 軟骨魚類以降の魚類は顎や歯のような捕食器官を持っている。内骨格は一部骨化しているもののほとんどが軟骨質である。
- (D) 当初の硬骨魚類は淡水または汽水域を含む浅い海で進化したと考えられており、肺を持ち空気呼吸を行うことができたと考えられている。リン酸カルシウムを沈着させた内骨格を持っている。硬骨魚類以降の生物では、ビタミン D が存在している。
- (E) 条鰭類は硬骨魚類の一種であり、筋肉のない鰭条のある鰭を持っている。また、肺は浮き袋に進化し、浮力の調整を行う。現生の条鰭類のほとんどは真骨類である。真骨類は海水で進化し、その後、一部が淡水に移住した。
- (F) 肉鰭類は硬骨魚類のうち、筋肉で動かすことのできる鰭を持っている。現生種はシーラカンスと肺魚のみで、このうちシーラカンスの肺は退化している。浮き袋は持たない。
- (G) 両生類以降の生物種は、淡水性の肉鰭類から進化したと考えられている。陸生以降は PTH により骨代謝がより高度に制御されている。

Fig. 1-2 軟骨細胞の分化と内軟骨性骨化における働き

文献[1]および[3]をもとに作製

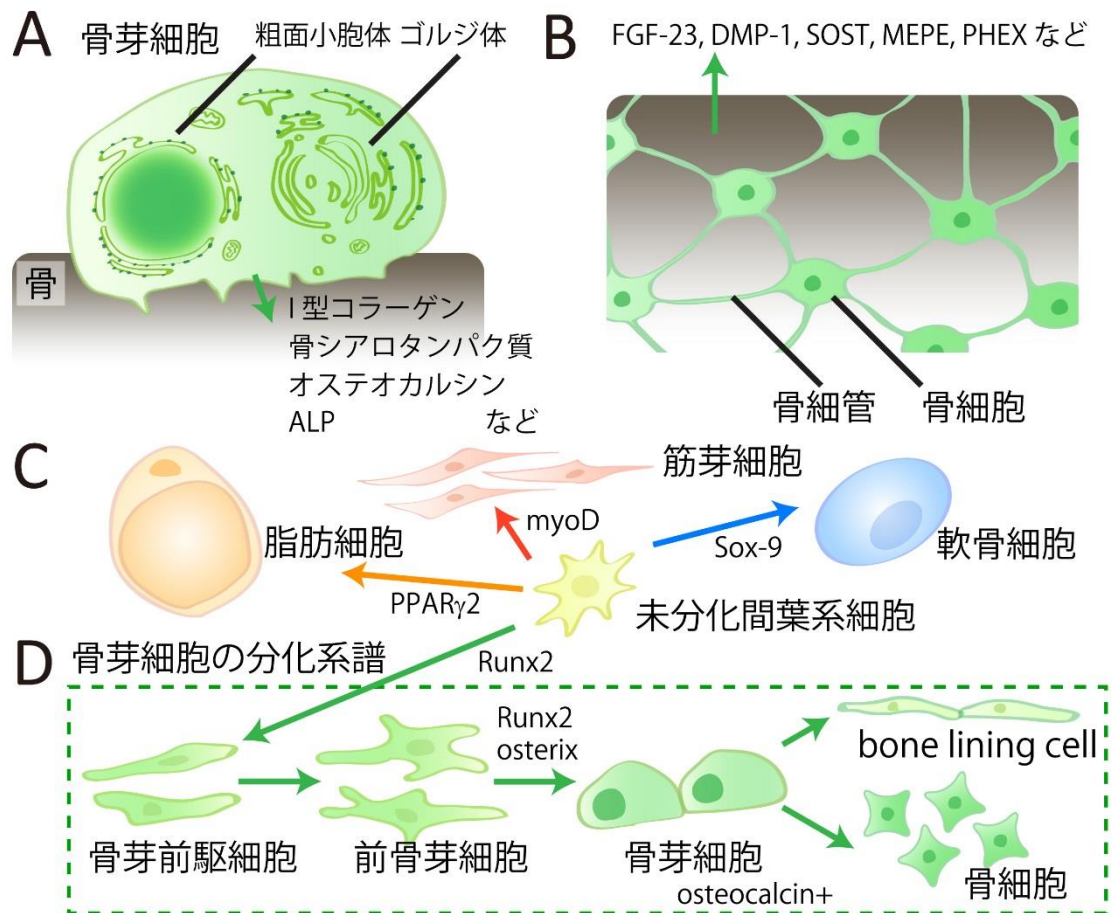


(A) 軟骨細胞分化の模式図。骨格の鋳型となる軟骨原基が形成される箇所において、間葉系細胞の凝集が起こる。凝集した細胞は転写因子である Sox-9 の働きで軟骨細胞に分化する。軟骨細胞は、互いに距離を取って分布し、2 型コラーゲン、プロテオグリカン、ヒアルロン酸などの軟骨基質を分泌する。軟骨基質の中には血管など他の細胞や組織は存在しない。

(B) 長幹骨形成における軟骨細胞分化の模式図。軟骨細胞は骨端の静止軟骨細胞層から、増殖が盛んな増殖軟骨細胞層、軟骨基質で肥大した肥大軟骨細胞層、内軟骨性骨化の生ずる石灰化層に向かって成熟する。

(C) 石灰化層での内軟骨性骨化の模式図。石灰化層の軟骨基質は軟骨細胞の働きで石灰化が進んでいる。軟骨基質の中に血管が浸潤し、肥大軟骨細胞の一部は細胞死する。石灰化基質の上には骨芽細胞が集まり、骨基質を分泌して骨梁を形成する。

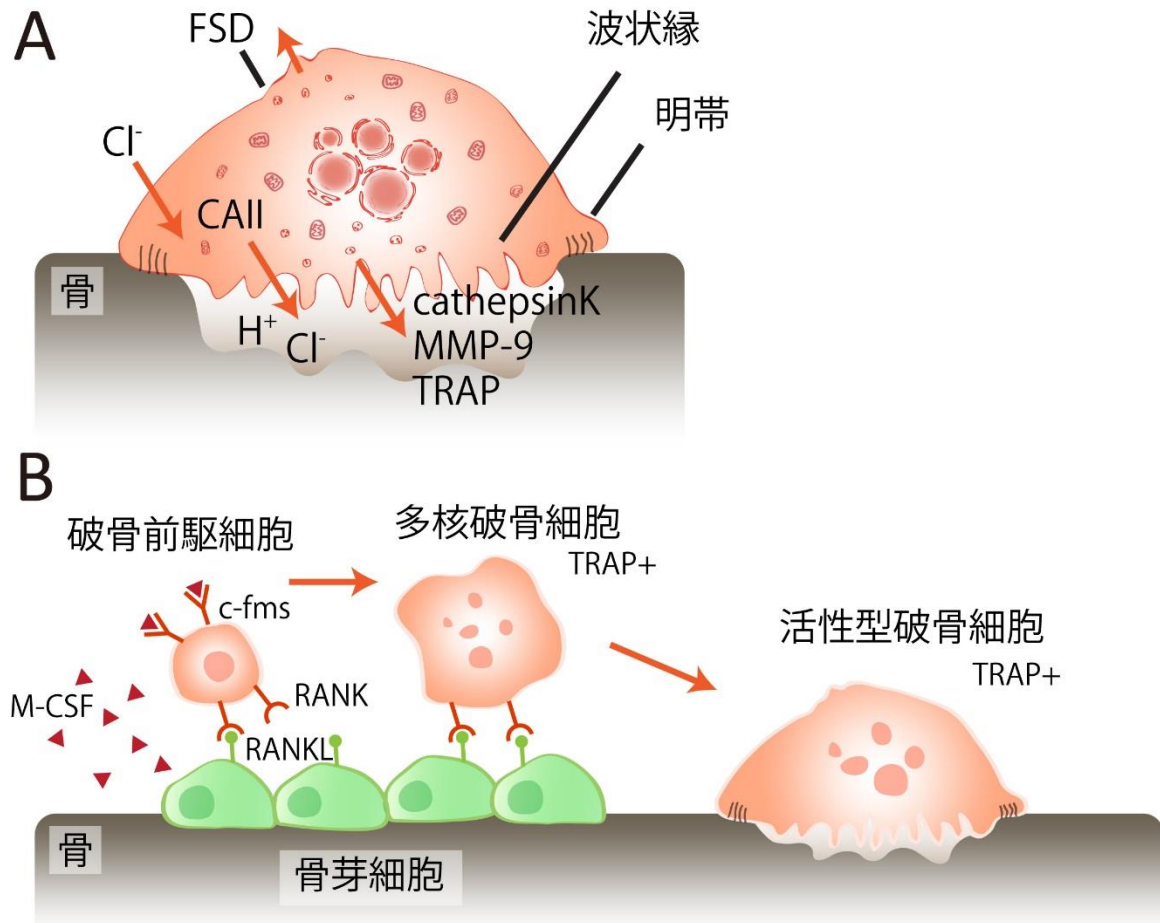
Fig. 1-3 骨芽細胞と骨細胞の分化と働き



- (A) 骨形成をする骨芽細胞の模式図。骨芽細胞は卵円状の細胞で骨基質表面にはほぼ一列に並んでいる。骨形成期の骨芽細胞では、細胞核が片側に偏在し、反対側にはゴルジ装置が見られる。骨芽細胞は発達した粗面小胞体やゴルジ装置をもち、タンパク質合成が盛んな細胞の特徴を示す。ALP 活性によりリン酸カルシウムを沈着させるほか、1 型コラーゲン、骨シアロタンパク質、オステオカルシンなどの骨基質を分泌する。
- (B) 骨細胞ネットワークの模式図。骨細胞は骨芽細胞が分化し骨に埋め込まれた細胞で、骨細管により互いに繋がりネットワークを形成している。骨形成抑制因子である SOST に加え、リン代謝に関わる FGF-23、MEPE、PHEX を分泌する。
- (C) 間葉系細胞の細胞運命。間葉系細胞は runx2 により骨芽細胞系列に分化するほか、sox-9 で軟骨細胞に、myoD で筋芽細胞に、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ 2(PPAR γ 2)により脂肪細胞に分化する。
- (D) 骨芽細胞分化の模式図。間葉系細胞から分化した骨芽前駆細胞は、runx2 と osterix により骨芽細胞に分化し、成熟骨芽細胞はオステオカルシンを分泌する。骨芽細胞の多くは最終的に細胞死するが、一部は自身が分泌する骨基質に埋まって骨細胞に分化するほか、骨表面の bone lining cell になる。bone lining cell は細胞小器官に乏しく扁平で骨形成能を持たない休止状態の骨芽細胞である。

Fig. 1-4 破骨細胞の分化と働き

文献[3]および[9]をもとに作製



- (A) 骨吸収する破骨細胞の模式図。破骨細胞は骨吸収機能を有する多核の細胞である。細胞質は好酸性を示し、辺縁にクロマチンを持つ不規則な形状の核、多数のミトコンドリア、小胞、空胞を有する。骨表面に接着し極性を持った活性型破骨細胞の細胞膜は、明帯、破状縁、血管側細胞膜の3箇所に分けられる。明帯はアクチンフィラメントに富み、インテグリンを介して骨基質への接着に関わり、吸収窩を密閉する。波状縁は破骨細胞の骨吸収部位で、細胞内の炭酸脱水素酵素酵素 II(CAII)により産生されたプロトン(H^+)を放出し吸収窩を酸性化する。さらに、小胞輸送により cathepsinK や MMP-9 などのプロテアーゼを分泌する。吸収窩で分解された産物は波状縁より細胞内の空胞に取り込まれ、血管側細胞膜にある functional secretory domain (FSD)から細胞外へ放出される。
- (B) 破骨細胞の分化メカニズム。破骨前駆細胞は骨芽細胞が分泌する M-CSF の刺激を受けて増殖と分化が促進される。骨芽細胞はさらに RANKL を発現し、それが破骨前駆細胞の RANK と結合することで破骨細胞は多核化し、TRAP 陽性の成熟破骨細胞になる。破骨細胞は骨表面に接着すると極性をもった活性型破骨細胞になる。

第2章 メダカ骨折修復モデルの確立と破骨細胞と骨芽細胞の動態

2.1. 序論

2.1.1. 骨折修復の過程

骨組織は一般に再生能力を有しており、骨修復の過程では、骨組織の発生・成長の際のメカニズムを再現することで損傷した骨組織を回復する。骨折の治療は整形外科領域の重要な課題であると共に、骨に関わるすべての細胞が関わっていることから、細胞動態解析の実験系として、古くから研究されてきた。

骨の修復過程は、組織学的な特徴から炎症期、軟骨性仮骨形成期、硬骨性仮骨形成期、リモデリング期に分類されている(Fig. 2-1)[24]。これらのステージを明確に区別することは難しく、必要に応じて重複する。それぞれの修復過程の進行具合に応じて、サイトカインや成長因子などが分泌されることで、修復に必要な細胞群が協調して修復に働くと共に、修復に必要な環境を作るように制御されている[25, 26]。

炎症期

骨折修復は一般に血管や骨髄などを含む周囲の軟組織の破壊を伴う。これがきっかけとなり、骨組織だけではなく非骨格系の組織を含む非特異的な創傷治癒が始まる。血管の破壊による出血は、骨折部を含む広い範囲で血腫を形成し、そこにマクロファージ、顆粒球、白血球、単球などが浸潤し、細菌感染から組織を防衛すると共に、サイトカインや成長因子を分泌する(Fig. 2-1A)[27]。

炎症期における細胞応答は、トランスフォーミング成長因子 β (TGF β)、血小板由来成長因子(PDGF)、繊維芽細胞成長因子(FGF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、インターロイキン 1、6(IL-1, IL-6)、骨形成タンパク質(BMP)、腫瘍壊死因子 α (TNF α)など様々なサイトカインによる正のフィードバックにより引き起こされる[25, 27]。これらのサイトカインは、間葉系幹細胞を呼び寄せ、骨折修復を進行するのに必要である。間葉系幹細胞の由来は、

周囲の軟組織だけでなく[28]、骨膜や骨髓[29, 30]、血流に由来するといわれている[31-33]。

仮骨形成期

骨組織の損傷は力学的に不安定な状態を生ずる。骨折した組織では、間葉系幹細胞から軟骨細胞が分化し、軟骨組織を分泌し壊れた骨組織をつなぎ止める。この軟骨組織は、患部を力学的に安定な状態にする役割だけでなく、その後の骨形成の基礎となる役割を持つ(Fig. 2-1B)。修復過程で骨折部を覆うこぶ状の組織を仮骨というが、軟骨基質でつくられた仮骨を軟骨性仮骨と呼ぶ。

つづいて、骨を作る細胞である骨芽細胞の働きが活発になる。骨芽細胞は、軟骨性の仮骨を硬骨性の仮骨に置き換える骨形成を行う(Fig. 2-1C)。軟骨細胞は血管の浸潤に伴い細胞死し、軟骨内に生じた石灰化組織が骨化中心となり、内軟骨性骨化を生じる。これと平行して、切断された骨端や骨断片などでは、軟骨を介さない膜性骨化が起こる。以上の骨芽細胞による骨形成においては **BMP** が重要な働きをしているといわれているが、その他の様々なサイトカインが共存しており、それらが骨芽細胞の増殖や分化、または石灰化にどのようなかかわっているのかはよくわかっていない。

骨芽細胞は間葉系幹細胞に由来するが(Fig. 1-3C, D)、その前駆細胞が存在する組織として、豊富な未熟骨芽細胞または休止状態の骨芽細胞が存在するとされる骨膜が挙げられる。実際に、骨膜を除去した場合に修復が遅延するという報告もある[29, 34]。しかし、骨膜を除去した場合でも修復は起こる。このことは複数の前駆細胞の供給源があることを示している。血流は間葉系幹細胞の主要な供給源であり、骨形成のための栄養源としても重要である。炎症期に生産される血管内皮成長因子(VEGF)は血管形成に不可欠であり、骨折修復における骨形成を促進することが報告されている[35, 36]。血管形成が正常であっても骨形成が抑制される場合もあり[37-39]、血管から前駆細胞が供給されるためには細胞誘導のための特別なメカニズムが存在することが示唆されている。

リモデリング期

仮骨形成期に形成した硬骨性の仮骨は、急激な軟骨性骨化と膜性骨化によって形成されており、コラーゲン繊維の走行が不規則になっている。このような骨を繊維骨といい、これらは、骨吸収と骨形成によるリモデリングによって層状構造を持った骨に作り替えられる(Fig. 2-1D)。

この過程で重要な働きをするのが、骨を吸収する作用を持った破骨細胞である。破骨細胞は極性を作って骨質に接着し、酸やプロテアーゼで骨質を溶解させる。破骨細胞が骨を削った後には、吸収窩と呼ばれる穴が作られ、骨芽細胞が骨質を分泌して穴を埋める。この過程で、骨折部を広く覆っていた仮骨はその形状が整うと共に、層状の丈夫な組織構造を取り戻す[24]。

年齢や骨折部位によって異なるが、骨折修復を終えても骨折部には仮骨の形跡が残り完全に元の形に戻ることはない。修復過程でなんらかの原因により骨形成が不十分になり、切断した骨が結合せず、関節ではない部分で可動するような状態で骨修復が停止すると、偽関節と呼ばれる後遺症が生じる。このような場合には、修復に関わる細胞の活性が低下しているため、移植などによって細胞活性を再度獲得し骨新生を誘発する必要がある[1]。

2.1.2. 骨折修復における骨芽細胞と破骨細胞

骨芽細胞と破骨細胞

骨形成を行う細胞である骨芽細胞は、間葉系幹細胞に由来し、転写因子 *runx2* や *osterix* の働きで分化する(Fig. 1-3C, D)。骨折修復においては、仮骨形成期の硬骨性仮骨形成時とリモデリング期で骨形成に働くほか、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、Receptor activator of NFκB (RANKL)、オステオプロテグリン(OPG)を分泌することで破骨細胞の分化に関与している(Fig. 1-4B)。

破骨細胞は造血幹細胞に由来する骨吸収を行う多核細胞で、骨折修復においては、仮骨形成期の軟骨性仮骨吸収時とリモデリング期で観察される。RANKL のデコイレセプター

である OPG により破骨細胞分化を阻害したマウスでも、軟骨性仮骨の吸収とそれに伴う内軟骨性骨化は起こることから[40-42]、この過程においては破骨細胞の働きは必須ではなく、その他の細胞も作用していると考えられている。一方で、リモデリング期における破骨細胞の作用は必須である。

骨芽細胞と破骨細胞の相互作用

骨のリモデリングにおいては、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が協調して起こる必要がある。骨吸収と骨形成を結びつけるメカニズムはまだわかっていないが、破骨細胞の *in vitro* における培養が骨芽細胞との共培養で初めて成功したという歴史的経緯もあり、それらの協調作用は骨代謝の重要な課題として研究されている。骨には、「正常にせよ異常にせよ、加わる力に最も適した構造に発達する」という性質がある。この性質は提唱者の名前からウォルフの法則と呼ばれている。成長の過程で、骨は力学的に安定な構造に発達するが、成長の過程と同様のメカニズムを利用し急速に骨を再生する骨折修復においても、力学的な負荷は非常に重要である。実際に骨折修復時に力学的な負荷がかからないようにすると、骨折修復が阻害されるという報告がある[43]。

骨において、力学的な負荷に応答して骨形成と骨吸収を制御するメカニズムの一つとして考えられているのは、骨芽細胞の最終分化細胞である骨細胞が分泌するスクレロスチン (SOST) である[44, 45]。SOST は Wnt のアンタゴニストとして働き、骨形成を阻害する。力学的な負荷のかかる場所では TGF β シグナルを介して発現が減少し、結果的に骨形成が正に制御されるといわれている[1, 46]。骨折修復では、修復初期に発現が抑制され、骨形成を促進することを示唆する報告があるが[47]、リモデリング期の力学的負荷による応答でも関与をしていると考えられている。

炎症に応答した破骨細胞と骨芽細胞誘導制御

破骨細胞や骨芽細胞の働きには、M-CSF、RANKL、OPG、SOST など様々な因子が関与しているが、骨折修復ではそれぞれ異なった時期に発現し、異なった経路で発現制御さ

れていると考えられている[47, 48]。前述のように骨折修復では最も初期に発生し、細胞誘導を引き起こすメカニズムとして組織の炎症が想定されている。

炎症応答によって生じる因子の一つであるプロスタグランジンは骨代謝において重要な働きを持っている。特に、プロスタグランジン E2(PGE2)は、骨形成と骨吸収を共に制御することが知られている[9]。炎症における PGE2 の産生は、上流の酵素であり炎症に応答して活性化する性質をもつシクロオキシゲナーゼ(COX-2)によって制御されている。COX-2 欠損マウスでは内軟骨性骨化と破骨細胞誘導の異常を引き起こし、骨折修復が起こらないことが報告されている[49]。COX-2 のプロモーター上には炎症に関わる転写因子が結合する領域が数多く存在する[50]。また、COX-2 の mRNA は、3'末端に分解を促進する制御因子が存在し、不安定化されているが[51]、TNF α や IL-1 β のようなサイトカイン存在下で安定化し[52]、炎症に応答して急激に発現を上昇させる早期発現遺伝子となる。さらに、COX-2 はタンパク質としても低寿命で、アイソザイムである COX-1 が 12~24 時間の寿命であるのに対し、COX-2 の寿命は 2~7 時間である[50, 53]。このように、COX-2 は様々な方法で炎症による活性制御を受けている。

COX-2 の産物である PGE2 の受容体は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体で、4 種のサブタイプが存在している。骨代謝において、その働きが重要視されているのは EP-2 と EP-4 である。EP-2 と EP-4 は共に細胞内の cAMP 濃度を上昇させるが、主な発現細胞が異なることで別々の生理的な働きをしており、EP-2 は血管の拡張などを制御し、EP-4 は骨形成や骨吸収を制御する[54]。EP-4 欠損マウスでは仮骨形成の異常により骨折修復が起こらないことが報告されている[55]。

2.1.3. メダカを用いた骨折修復研究の意義と目的

骨折修復研究の問題点

骨折修復において重要なのは、前述のように修復部位における同化反応と異化反応のバランス制御である。しかし、従来の骨折修復モデルでは、特に初期の骨における同化反

応・異化反応を、周囲の軟組織に由来する同化反応・異化反応と区別することが困難である[24]。そのため、各ステージで高発現し、重要な働きを担うと考えられているサイトカインのうち、どれが破骨細胞や骨芽細胞に特異的な細胞誘導や機能制御応答に関わるのかわかっていない。この問題を解決するためには、骨折部周辺の非特異的な損傷をできるだけ排除したモデルが必要である。

また、特にリモデリング期において、骨折の進行具合に応じて骨折部の形態を認識しながら、骨芽細胞と破骨細胞が協調して骨を治していく必要がある。この過程には周囲の基質や細胞同士の相互作用を解析することが必須となる。しかしながら、固定したサンプルの解析では、あるステージで観察された細胞が次のステージでどのような挙動を示すのかを追跡することは困難である。加えて、形態の観察のみからでは前駆細胞の同定は難しく、どのようなシグナルを受けて、どこから骨芽細胞や破骨細胞が骨折部位周辺でのみ分化していくのかを解析することは難しい。これらの問題を解決するためには細胞を生きたまま解析する系が必要である。

メダカの尾ヒレの特長と骨研究

メダカやゼブラフィッシュなど条鰭類の一種である真骨魚類のヒレは上皮、間充織、神経、血管、骨組織である鰭条から成る。鰭条はアクチノトリキアと呼ばれる繊維状組織に沿って、分節構造を作りながら形成されるリン酸カルシウムを主成分とした石灰化組織である[56, 57]。魚類のヒレは高い再生能力を有し、発生生物学研究では組織再生のモデルとして用いられている[17]。最近では、ゼブラフィッシュを用いたヒレ再生研究で骨芽細胞の分化に注目した研究が行われている[18-20]。しかし、魚類を用いた骨研究の主流は、胚や幼魚での骨発生の研究である。その理由として、成魚を用いた研究の問題点は生きたままの観察が困難であり、小型魚類を用いた実験系の利点が生かしにくいことが挙げられる。メダカの尾ヒレは薄く単純な組織構造を持った組織であり、ゼブラフィッシュなど他の魚類モデルに比較して色素が少なく透明であることから、生きたまま骨組織を解析するために適したモデルであるといえる。

本研究の目的

従来の骨折修復研究は、哺乳動物を用いた組織解析によって行われてきた。しかし、骨折は周囲の軟組織の損傷を伴う複雑な現象であり、骨の修復のみに注目するためにはより単純化されたモデルが必要である。また、修復は損傷の度合いや進行具合に応じて、周囲の組織や細胞同士の相互作用によって制御されているため、骨芽細胞や破骨細胞が骨折部を認識し、分化し、修復に働くメカニズム解明のためには生きたまま骨折修復を観察する必要がある。

そこで、本章では、骨折修復の新たな実験系としてメダカの尾ヒレを用いた骨折修復実験系を開発し、修復過程を通じた細胞挙動の観察と分化誘導機構の解析を行った。

2.3. 実験結果

2.3.1. メダカの尾ヒレの構造と破骨細胞と骨芽細胞の局在

メダカの尾ヒレは鰭条、上皮、間充織、血管、神経からなる薄く透明な組織である(Fig. 2-2A)。骨組織である鰭条は瓦上の一对の骨からなり、内側に動脈、外側に静脈が存在する(Fig. 2-2B, 2-5A, B)。鰭条には骨組織を覆うように多数の細胞が局在している(Fig. 2-2B, 矢頭)。メダカの尾ヒレにおける骨芽細胞と破骨細胞の局在を調べるため、骨芽細胞特異的遺伝子である *osterix* の下流で GFP が、破骨細胞特異的遺伝子である TRAP の下流で DsRed が発現するトランスジェニックメダカ、Tg (*osterix*: GFP, TRAP: DsRed)を観察した。その結果、尾ヒレの骨組織である鰭条では、*osterix* 陽性の骨芽細胞は観察できたが、TRAP 陽性の破骨細胞は確認できなかった(Fig. 2-2C, 矢頭)。組織切片で TRAP 活性染色を行っても同様に TRAP 陽性の破骨細胞は尾ヒレの骨組織中には観察できなかった(Fig. 2-2D)。

尾ヒレの骨芽細胞の局在を詳細に観察するため、Tg (*osterix*: GFP)の骨をアリザリンコンプレクソン(ALC)で染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、鰭条の外側表面と縁で *osterix* 陽性骨芽細胞が観察できた(Fig. 2-3A, B, 矢頭, 矢印)。特に *osterix* は鰭条の縁において高発現していた。さらに、成熟骨芽細胞特異的遺伝子である *osteocalcin* プロモーター下流で DsRed が発現する、Tg (*osteocalcin*: DsRed)の骨を calcein により染色し、同様に共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、*osteocalcin* 陽性成熟骨芽細胞は鰭条の外側表面に点在していたが、*osterix* が高発現していた縁での発現は見られなかった(Fig. 2-3C, D, 矢印)。そこで、*osterix* と *osteocalcin* の発現を同時に観察できる Tg (*osterix*: GFP, *osteocalcin*: DsRed)を作製し観察を行った。その結果、*osterix* 陽性骨芽細胞の一部は *osteocalcin* 陽性であったが、*osteocalcin* 単独陽性の骨芽細胞は観察できなかった(Fig. 2-3E, 矢頭)。*osterix* は未熟骨芽細胞でも発現しており、*osteocalcin* は成熟骨芽細胞のみで発現することから、メダカの尾ヒレにおいて、未熟な骨芽細胞は鰭条の縁に特異的に局在しており、鰭条の外側の縁に移動したものは成熟骨芽細胞に分化していることが示唆された。さらに、骨形成を行う骨芽細胞は一般にアルカリホスファターゼ活性を有しているとされてい

るが、組織切片を ALP 染色した結果、骨芽細胞の局在する領域での ALP 活性が見られなかったことから(Fig. 2-2E, 矢頭)、メダカの尾ヒレの骨芽細胞は、無処理の状態では骨形成活性が非常に弱いことが明らかになった。

一方で、尾ヒレと同様に鰭条を持つが、乳状突起と呼ばれる特殊な器官を持つ尻ヒレの骨芽細胞と破骨細胞の観察を同様に行った(Fig. 2-4A)。その結果、TRAP 陽性の破骨細胞が Tg を用いた観察と組織切片での TRAP 活性染色によって、乳状突起の先端部と根元で検出された(Fig. 2-4B, C, 矢頭)。一方で、骨芽細胞は尾ヒレと同様に鰭条の外側表面と縁に局在しているほか、乳状突起の先端部で観察できた(Fig. 2-4C, 矢印)。

このことから、メダカの成魚のヒレにおいても、咽頭歯、顎歯、神経棘、血管棘のような常にリモデリングを行っている器官と同様に破骨細胞が形態形成に関わっており、必要に応じて特異的に誘導される仕組みがあることが示唆された。

2.3.2. メダカ骨折修復モデルの開発

前項でのメダカの尾ヒレの組織解析をもとに、鰭条の模式図を作成した(Fig. 2-5A, B)。メダカの尾ヒレを用いて新たな骨折修復モデルを開発するため、マイクロインジェクション用のガラスキャピラリーから、直径およそ 30 μm の針を作製した。この針を用いて、一对の鰭条のうち片側のみを骨折させ、残る片側を無処理とした(Fig. 2-5C)。

骨折の操作において、細いガラスキャピラリーでピンポイントに骨組織を破壊した。これにより、周囲の軟組織をほとんど傷つけずに、骨の破壊のみによる特異的な細胞誘導を観察できるようにした。骨折後 30 分経過後に血流の様子を観察したところ、骨折の操作により血流は失われていなかった(動画データは報文目録 1 を参照)。この結果から、鰭条の内部の血管は傷ついていないことが確かめられた。

2.3.3. 骨軟骨染色

骨折修復を生きたまま観察する前に、アリザリンレッド(ALR)染色とアルシアンブルー(ALB)染色による骨軟骨染色を固定したサンプルで行い、骨折修復過程での骨組織変化を

観察した。骨折直後、骨断片は分離しており、骨折した側の骨と骨折していない側の骨を切り離すことはできなかった(Fig. 2-6A)。骨折後 4 日目では ALB 陽性の軟骨様組織が形成し、骨断片が繋がっており(Fig. 2-6B, 矢印)、骨折した側の鰭条を分離して観察することができた。この時、骨折によって生じた骨断片は鋭くつながっていた(Fig. 2-6B, 矢頭)。骨折後 8 日目では、さらに ALB 陽性の軟骨様組織が広がると共に、一部は ALR 陽性の石灰化組織に置き換わっていた(Fig. 2-6C, 矢印)。また、骨吸収され丸みを帯びた骨断片が観察された(Fig. 2-6C, 矢頭)。ALB 陽性の軟骨様組織は徐々に石灰化が進み、骨折後 12 日目では ALR 陽性の仮骨に置き換わった(Fig. 2-6D, 矢印)。分厚く、いびつな形の仮骨はリモデリングされ、骨折後 24 日目ではなめらかな骨の形状を回復した(Fig. 2-6E)。この結果から、メダカ骨折修復における骨形成も軟骨様組織を介して行われること、骨折修復の過程で骨断片吸収と仮骨リモデリングの 2 種類の骨吸収が起こることが示唆された。

2.3.4. 破骨細胞と骨芽細胞の 3 次元経時観察

つづいて、破骨細胞と骨芽細胞がどのように骨折修復に関わるのかを調べるため、修復過程での破骨細胞と骨芽細胞の両方を生きたまま観察することを試みた。Tg (osterix: GFP, TRAP: DsRed)の骨を ALC で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時的に観察した。

鰭条にはもともと破骨細胞は存在しなかったが、骨折後 3 日目に破骨細胞が観察された(Fig. 2-7A, 矢頭)。骨折初期に誘導されたこの破骨細胞(初期破骨細胞)は、骨折した骨の断片に集まった。この時、骨芽細胞は骨折部の骨端付近に集まっていた(Fig. 2-7A, 矢印)。骨折後 5 日目において、初期破骨細胞は骨断片上に局在していたが、3 日目に比べその数は減少していた(Fig. 2-7B, 矢頭)。一方で、骨芽細胞の数は増加し、骨折により離ればなれになっていた鰭条をつなぐように分布していた(Fig. 2-7B, 矢印)。初期破骨細胞は、骨芽細胞による仮骨形成が最も活発になった骨折後 7 日目において、ほとんど消失した(Fig. 2-7C)。しかしながら、続く骨折後 9 日目において、骨芽細胞により仮骨が形成されると、破骨細胞は鰭条の中心部付近で再び観察された(Fig. 2-7D, 矢頭)。後期に誘導されたこの破骨細胞(後期破骨細胞)は骨折後 11 日目～17 日目において、仮骨を内部だけでなく外部からも覆

った(Fig. 2-7E, 矢頭)。骨折後 25 日目では後期破骨細胞は消失し、骨折した鰭条はなめらかな骨の形態を取り戻した(Fig. 2-7F)。これらの結果より、骨折修復過程において、2 種類の異なる役割を持った破骨細胞が存在し、それらは骨芽細胞による仮骨形成の前後に別々のタイミングで分化誘導されることが示唆された。

2.3.5. 初期破骨細胞と後期破骨細胞の組織解析

初期破骨細胞と後期破骨細胞は機能的・形態的に異なる破骨細胞であるかを検討するため、Tg (TRAP: DsRed, osterix: GFP)を用いて組織切片を作製し、その特徴を比較した。その結果、初期破骨細胞の多くは骨折した骨の断片で観察された(Fig. 2-8A, 上図 白矢頭)。さらに、内在的 TRAP 酵素活性を検出するため、同一切片における TRAP 活性染色を行った。TRAP 活性染色は酵素の局在を示すため、必ずしも破骨細胞の局在とは一致しないが、骨折初期において DsRed 陽性の領域と同様に、骨断片付近で TRAP 陽性の破骨細胞が観察できた(Fig. 2-8B)。一方、後期破骨細胞は初期破骨細胞よりも広範囲に位置し多くは仮骨の内部で観察された(Fig. 2-9A, 上図 白矢頭)。この結果は同一切片における TRAP 活性染色においても同様であった(Fig. 2-9B)。連続切片の TRAP 活性染色の方が蛍光よりも広い範囲に観察されたが、この理由として、破骨細胞のいる場所よりも広い領域で、骨吸収活性があることが考えられる。以上の結果から、初期の破骨細胞は骨断片の吸収、後期破骨細胞は仮骨のリモデリングという異なる働きを持っていることが示唆された。また、初期・後期共に一部の破骨細胞は血管周囲で観察できた(Fig. 2-8A, 2-9A, 下図 黄矢頭)。また、核を複数持った破骨細胞も存在していた(Fig. 2-8A, 2-9A, 下図 青矢頭)。

さらに、破骨細胞の形態を詳細に解析するため、電子顕微鏡解析を行った。TRAP プロモーター下流で GFP が発現する Tg (TRAP: GFP)を、骨折後 3 日および 12 日で固定し GFP 陽性細胞の位置を観察した(Fig. 2-10A, 2-11A)。その後、樹脂包埋し、GFP 陽性細胞を含むように超薄切片を作製し、電子顕微鏡による解析を行った。その結果、骨折後 3 日の初期破骨細胞において、単核で骨断片に接触する細胞(Fig. 2-10B, 赤破線)、多核化した細胞が観察できた(Fig. 2-10B, 黄破線)。細胞質内は多量のミトコンドリアで満ちており(Fig.

2-10C, 'm'), これは破骨細胞の特徴の一つである。しかしながら、破骨細胞の特徴である波状縁と明帯の形成は見られなかった(Fig. 2-10C)。一方、骨折後 12 日の後期破骨細胞においては、複数の核をもつ破骨細胞は観察できなかったが(Fig. 2-11 B, 'N'), 細胞質内に多量のミトコンドリアを持ち(Fig. 2-11D, 'm'), 明帯を形成し骨に接着している破骨細胞が観察できた(Fig. 2-11B, C, 'cz')。また、発達した波状縁の形成は認められなかったが、細胞膜が一部陥入した波状縁様の構造が認められた(Fig. 2-11C, アスタリスク)。破骨細胞と仮骨の境界では、リン酸カルシウム結晶の脱灰が起こっていた(Fig. 2-11D, アスタリスク)。後期破骨細胞は、明帯と波状縁様構造をつくり、明らかに仮骨を脱灰しており、初期破骨細胞に比べ骨組織への接着が強く、骨吸収活性が高い破骨細胞であることが示唆された。

2.3.6. 破骨細胞の細胞起源

破骨細胞は造血幹細胞に由来する細胞であり、骨折において誘導される破骨細胞の一部は組織切片において、初期・後期共に血管の周囲で観察された(Fig. 2-8A, 2-9A, 下図黄矢頭)。そこで、破骨細胞の供給源として血管の関与を検討するため、血管内皮細胞マーカー遺伝子である friend leukemia integration 1 transcription factor (FLI1)プロモーター制御下で GFP が発現し、TRAP プロモーター制御下で DsRed が発現する、Tg (FLI1: GFP, TRAP: DsRed)を用いて、初期と後期における破骨細胞の誘導を解析した。その結果、初期・後期共に、DsRed 陽性の破骨細胞が始めに観察できるのは血管の周囲であった(Fig. 2-12A, C, 矢頭)。初期破骨細胞は骨折後 24 時間頃から血管周囲に現れ始め(Fig. 2-12A, 矢頭)、骨折後 3 日目では骨断片に特異的に接触する破骨細胞の数が多くなった(Fig. 2-12B, 矢頭)。後期破骨細胞は、骨折後 7~9 日頃から血管周囲で観察され始め(Fig. 2-12C, 矢頭)、骨折後 11~14 日目で仮骨に集まる破骨細胞が最も多くなった(Fig. 2-12D, 矢頭)。骨折の操作では血管は傷つけていないが、骨折後 24 時間で新たに骨折部周囲には細かい血管が形成されていた(Fig. 2-12A, 矢印)。

破骨細胞と血管の位置関係をより詳細に解析するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いた 3 次元解析を行った。その結果、初期破骨細胞は骨折部周辺の鰭条の外側にある静脈で

多く見られ、血管表面に隣接していた(Fig. 2-13A)。一方、後期破骨細胞は鰭条の外側にある静脈表面でも観察できたが、より多くの破骨細胞が鰭条の内側の動脈表面に局在していた(Fig. 2-13B, C)。さらに、Tg (FLI1: GFP)の組織切片を作製し(Fig. 2-14A, B, 破線)、内在性 TRAP 活性染色により、破骨細胞を観察したところ、初期・後期共に破骨細胞は血管表面に局在し、血管内部では観察できなかった(Fig. 2-14C, D, 矢頭)。

さらに、破骨細胞の分化機構を検討するため、破骨細胞分化に必須といわれている RANKL の発現を半定量 RT-PCR で解析した。その結果、RANKL 発現は定常状態でも見られるが、骨折後に発現が増加し、骨折後 3 日では強い発現が確認できたが、徐々に発現が減少した。骨折後 9 日目から 11 日目にかけて RANKL 発現はやや上昇し、定常状態に近い発現になった(Fig. 2-15)。このことから、初期破骨細胞分化には RANKL の発現上昇が関与しているが、後期破骨細胞分化は、RANKL の発現上昇以外のメカニズムで制御されていることが示唆された。

以上の結果から、初期・後期共に破骨細胞は血管内皮細胞の表面で、何らかのシグナルを受けて分化し、その後、骨吸収部へ移動することが示唆された。また、初期破骨細胞の多くは静脈周囲で分化するのに対し、後期破骨細胞は主に動脈周囲で分化することから、細胞分化を引き起こすシグナルの局在が初期と後期で異なっていると考えられた。

2.3.7. 骨芽細胞の細胞起源

骨芽細胞は間葉系幹細胞由来の細胞であり、様々な細胞供給源が報告されている。メダカ骨折修復モデルにおける組織解析の結果、*osterix* 陽性の骨芽細胞は骨表面以外では観察できなかった(Fig. 2-8, 2-9, 上図 白矢印)。そのため、メダカの尾ヒレに元々存在している骨芽細胞が骨折修復に寄与することが考えられた。

そこで、骨折直後の骨芽細胞誘導の様子をより短い間隔で観察した。その結果、骨折部位に元々存在していた骨芽細胞は、骨折後 12 時間頃に消失した(Fig. 2-16A, アスタリスク)。この時、骨折部に隣接する鰭条表面の骨芽細胞には大きな変化は見られず、円形の細胞

が観察できた(Fig. 2-16A, 矢印)。続いて、骨折後 24 時間で、骨折部周囲の骨芽細胞は骨折部に向かって細く伸び楕円形の形状を示していた(Fig. 2-16 B, 矢印)。骨芽細胞が消失していた骨折部においても細く伸びた骨芽細胞が観察され始め、骨折部に隣接する鰭条表面での骨芽細胞は増加していた。骨折後 48 時間において、多くの骨芽細胞が骨折部に集まり円形の骨芽細胞が多数見られた(Fig. 2-16C, 矢印)。この時、鰭条から離れた骨断片では骨芽細胞は観察できなかった(Fig. 2-16C, アスタリスク)。続く骨折後 72 時間においては、鰭条から離れた骨断片においても骨芽細胞が観察され始めた(Fig. 2-16D, 矢印)。また、この時、骨折部に隣接する鰭条表面において骨芽細胞はほとんど観察できなかった(Fig. 2-16D, アスタリスク)。これらの結果から、骨折部に隣接する鰭条表面の骨芽細胞が骨折部に移動してくることが示唆された。

細胞移動を証明するために、共焦点レーザー顕微鏡を用い、3 時間に 1 回、合計 72 時間の撮影を行い、取得した画像を用い動画を作製した(動画データは報文目録 1 を参照)。実体顕微鏡での観察から示唆されたように、骨折部に隣接する鰭条表面の骨芽細胞が、楕円形の仮足を伸ばしたような形状に変化し、骨折部に移動している様子が観察できた。特に、鰭条の縁の骨芽細胞が多く移動していた。また、興味深いことに、骨折後 72 時間頃において、骨折部での *osterix* 陽性の骨芽細胞の数が急激に増加していた。このことから、*osterix* 陰性の骨芽細胞系細胞が別に存在し、それらも骨折部へ移動し *osterix* 陽性の骨芽細胞に分化していることが示唆された。

2.3.8. Tg (COX-2: GFP)の作製と骨折修復における COX-2 の発現解析

骨折修復において必須とされる炎症応答性酵素 COX-2 が、メダカにおいても重要な役割を果たすかどうかを検討するため、COX-2 の発現を半定量 RT-PCR により解析した。その結果、COX-2 は骨折後 12 時間後に発現が一時的に大きくなり、骨折後 1 日目に発現がほとんどなくなった(Fig. 2-17A)。さらに、骨折後 3 日目以降に再び発現が上昇することがわかった(Fig. 2-17 B)。

そこで、骨折修復における COX-2 の関与を調べるため、COX-2 発現に応答して GFP を発現する Tg (COX-2: GFP) を作製した(Fig. 2-18A, B)。作製した Tg が COX-2 の発現に伴い GFP を発現するかを確認するため、ふ化後 3 日目の稚魚において、COX-2 発現活性化剤 (12-o-tetradecanoylphorbol 13- acetate: TPA) による COX-2 の強制発現を行った。コントロールにおいて、半定量 RT-PCR では COX-2 の定常的な発現は見られたものの(Fig. 2-19A)、RNA in situ hybridization では発現が検出できなかった(Fig. 2-19B, 左上図)。Tg (COX-2: GFP) の GFP 発現を RNA in situ hybridization を用いて検出したところ同様に GFP 発現は検出できなかった(Fig. 2-19B, 右上図)。一方で、1 時間 TPA 処理を行ったサンプルでは、口と鰓において COX-2 と GFP、それぞれの発現が観察できた(Fig. 2-19B, 下図 矢頭)。TPA 処理後、飼育水で 12 時間洗浄した Tg (COX-2: GFP) を蛍光顕微鏡で観察したところ、RNA in situ hybridization の結果と同様に口と鰓において GFP の蛍光が観察された(Fig. 2-18C, 矢頭)。これらの結果から、Tg (COX-2: GFP) を用い GFP 発現誘導を観察することで、COX-2 プロモーター活性化を検出できることが確かめられた。

続いて、Tg (COX-2: GFP) を用いて骨折修復における COX-2 発現を検討した。骨折前では、鰭条周辺で GFP の蛍光はほとんど検出できなかったが(Fig. 2-20A)、骨折により骨折部の周囲で GFP 発現が誘導され、3 日目で最も大きくなった(Fig. 2-20B, 矢頭)。骨を ALC で染色し発現場所を共焦点レーザー顕微鏡で 3 次元観察したところ、GFP 陽性細胞は鰭条の内部であることがわかった(Fig. 2-21A, 矢頭)。さらに、FLI1 プロモーター下流で DsRed が発現する、Tg (FLI1: DsRed) を新たに作製し(Fig. 2-21B)、COX-2 との発現箇所を比較した。その結果、COX-2 は血管内皮細胞周囲の細胞で発現していることがわかった(Fig. 2-21C, 矢頭)。組織切片での GFP 発現の観察からも同様に、cox2 発現細胞は血管内皮細胞ではなく血管周囲の細胞であることが確かめられた(Fig. 2-20C)。

2.3.9. COX-2 活性阻害下での破骨細胞と骨芽細胞誘導

続いて、骨折修復における COX-2 の機能を調べるため、Tg (osterix: GFP, TRAP: DsRed) を用いて、COX-2 の機能を薬剤で阻害する実験を行った。経時的に破骨細胞と骨芽細胞

誘導を観察したところ、骨折後 3 日における初期破骨細胞誘導において、阻害剤処理群では破骨細胞が増加する傾向にあったが(Fig. 2-22A, 矢頭)、蛍光画像の DsRed 陽性領域を定量したところ有意な差は認められなかった(Fig. 2-22D, 左図)。さらに、骨折後 5 日目で行われる骨芽細胞の集合と仮骨形成にも大きな差は見られず(Fig. 2-22B)、GFP 陽性領域の定量結果も有意な差は認められなかった(Fig. 2-22D, 右図)。また、この時、阻害剤処理群も非処理群も、初期破骨細胞の消失が確認できた(Fig. 2-22B)。しかし、興味深いことに、骨折後 11 日目で行われる後期破骨細胞誘導が、阻害剤処理群において著しく減少し(Fig. 2-22C, 矢頭)、DsRed 陽性領域の定量結果から、後期破骨誘導に有意な差があることが示された(Fig. 2-22D, 左図)。骨折後 25 日目で骨軟骨染色を行った結果、阻害剤処理群において、いびつな形状の骨が観察されたことから(Fig. 2-22E, 矢頭)、COX-2 は後期破骨細胞分化を誘導し仮骨のリモデリングに寄与していることが示唆された。

2.3.10. PGE2 受容体の発現

COX-2 下流分子である PGE2 の受容体発現を調べるため、半定量 RT-PCR を行った。マウスなどで知られる 4 種類の PGE2 受容体(EP-1, EP-2, EP-3, EP-4)のうち、メダカの尾ヒレにおいては、6 つの受容体(EP-1a, EP-1b, EP-2, EP-3, EP-4b)が定常的に発現し、特にそのうち 3 つ(EP-1a, EP-2, EP-4b)が高発現していた(Fig. 2-23A)。続いて、骨折修復過程において、骨代謝に重要な働きを持つことが知られている EP-4 と、EP-4 と同様の機能を持った EP-2 に関して半定量 RT-PCR による発現解析を行った。その結果、EP-4b の発現が修復の進行と共に上昇していることがわかった(Fig. 2-23B)。この結果より、EP-4b を発現する細胞の増加、または EP-4b 発現誘導が、後期破骨細胞誘導に働いていることが示唆された。

2.4. 考察

2.4.1. メダカの尾ヒレの骨代謝

メダカの成魚において破骨細胞の存在が報告されているのは、顎歯、咽頭歯、神経棘、血管棘のみであった[13]。メダカの尾ヒレにおいて、定常状態では破骨細胞は観察できなかったが、尻ビレの乳状突起で新たに破骨細胞の存在が示された。乳状突起に限らず、ティラピアなど一部の硬骨魚類では、鰭条骨形成のために破骨細胞による骨吸収が働いているという報告がある[58]。このことから、特定の条件で必要に応じて破骨細胞を誘導するメカニズムが存在することが示唆され、破骨細胞の前駆細胞も鰭条周辺に豊富に存在していると考えられる。ヒレ組織に豊富に存在する血管は、造血幹細胞由来である破骨前駆細胞の供給源として有力な候補となる。

乳状突起はメダカのオス固有の形態であり生殖行動に関連している。最近、乳状突起形成部では、男性ホルモンであるアンドロゲン依存性の受容体が存在し特異的に骨形成を起こしていることが報告された[59]。骨代謝と性ホルモンの関係を示す現象として、女性ホルモンであるエストロゲンは破骨細胞の骨吸収を直接的あるいは間接的に制御することが知られている[1]。また、男性ホルモンであるアンドロゲンが骨芽細胞に直接作用して骨形成を促すことが報告されている[60]。メダカ乳状突起における破骨細胞誘導が、アンドロゲン受容体によって引き起こされているのか、あるいは、乳状突起形成に伴うストレスで引き起こされているのかは詳細な解析が必要であるが、性ホルモンと骨代謝の関係は非常に興味深い。

メダカの鰭条の骨表面には骨を覆うように多数の細胞が局在しているが、骨芽細胞は尾ヒレの鰭条の外側表面でのみ観察できた。骨芽細胞マーカーである *osterix* は鰭条の縁に多く局在し、成熟骨芽細胞マーカーである *osteocalcin* は縁を除く外側表面で観察でき、*osterix* と共局在していた。この結果から、骨芽細胞の供給源は鰭条の縁で、外側表面に移動するにつれて成熟骨芽細胞に分化することが示唆された。しかしながら、これらの骨芽細胞は ALP 活性を示さないことから、通常は骨形成活性の非常に低い骨芽細胞であることが示さ

れた。メダカの尾ヒレは成長に伴い、破骨細胞による骨吸収を伴わずに、外側に一方向的にゆるやかに成長していることが示唆された。

2.4.2. メダカ尾ヒレ骨折修復モデルの利点

本研究では、ガラスキャピラリーを用いて、周囲の軟組織をできるだけ傷つけないように、骨組織である鰭条に特異的な損傷を与えて骨折修復モデルとした。哺乳動物などを用いた実験系では、骨折は周囲の軟組織の損傷を伴う[24]。特に、骨の内部に血管が走行するため、血管の損傷は避けられない。血管は骨に関わる様々な細胞の供給源となり、損傷した血管自身が再生のために成長因子やサイトカインを分泌する。これらの理由で、哺乳動物を用いた実験系では、周囲の軟組織の損傷と広範囲な炎症応答反応が骨組織に特異的な細胞応答の解析を妨げているといえる。一方、メダカ尾ヒレの骨折修復モデルでは、骨折の直後でも血流は維持されており、周囲の軟組織の損傷はほとんど起こらない。そのため、メダカ骨折修復モデルは、骨組織損傷に特異的な細胞応答を解析する系として適している。

メダカの尾ヒレは、鰭条、上皮、間充織、神経、血管からなる単純な組織構造を持っている。さらに、メダカには存在しない骨細胞や軟骨細胞は骨修復に関与しない。哺乳動物の骨は複雑な組織構造を持ち、生理的にも多くの働きを持っている。メダカに比べ多くの種類の細胞が存在しており、それぞれが骨代謝反応に関与している。そのため、メダカでの骨折修復の現象は、厳密には哺乳動物で起こっているものと同じとはいえない。しかしながら、メダカには、哺乳動物と同様の特徴と働きを持った破骨細胞と骨芽細胞が存在し、骨折修復において機能していた。破骨細胞と骨芽細胞は、哺乳動物の骨代謝においても最も重要な細胞種であり、メダカの尾ヒレを用いることで、これらの骨折修復過程での細胞応答を観察することができる。また、メダカ骨折修復モデルは、他の細胞種がほとんど介在しない点で、骨修復の現象をより単純化して考えることができる実験系であるといえる。

最近では、顕微鏡技術の発展により、哺乳動物でもライブイメージングを行うことができるようになってきた。例えば、2光子励起顕微鏡は、生体組織での散乱の少ない長い波長の光で焦点面のみの蛍光物質を励起することができ、生体内イメージングに適した顕微鏡である

[23]。しかしながら、生体内イメージングの適応範囲はまだ小さく、一般的な骨折修復の解析方法は固定した組織を用いたものである。組織解析のみでは、あるステージで観察された細胞が、その後の同一組織内でどのような挙動をするのかを解析することは困難である。メダカを用いた本実験系は、骨折修復において生きた破骨細胞と骨芽細胞の動態観察することを可能にした。

以上の理由で、新たに確立したメダカ骨折修復モデルは骨折修復における破骨細胞と骨芽細胞の動態を解析するための強力な実験系であるといえる。

2.4.3. メダカ骨折修復における骨形成機構

哺乳動物において骨の発生は、外骨格系の一部の骨を除いて、主に軟骨内部から骨を作る内軟骨性骨化で行われる。これは、骨折修復においても同様に、損傷した骨の近傍や血管の行き届かない箇所を除いて、始めの仮骨形成は軟骨細胞によって行われ、のちに内軟骨性骨化によって硬骨に置き換わる[27]。

一方、メダカにおいて、主たる骨化は軟骨を介さない膜性骨化によって行われる。そのため、メダカ尾ヒレの骨折修復においても軟骨細胞を介さない膜性骨化が起これと考えられた。しかしながら、骨軟骨染色を行った結果、アルシアンブルー陽性の軟骨様組織が修復初期に観察され、骨折によって切り離された骨断片は軟骨様組織によって結びつけられた。この軟骨様組織はしだいに石灰化した仮骨に置き換えられ、メダカ骨折修復でも、哺乳動物で調べられてきたような軟骨組織を介した仮骨形成に近い過程を経ることが明らかになった。また、骨折初期に軟骨基質を分泌する細胞が存在することが示唆され、それは骨芽細胞系の細胞であるのか、別の細胞であるのか明らかにするには、さらなる解析が必要である。

2.4.4. 骨折修復における 2 種類の破骨細胞の役割

骨折修復過程において、仮骨形成前後で 2 段階に破骨細胞が誘導された。このうち、初期の破骨細胞は、骨断片に特異的に接触していた。後期破骨細胞誘導が起こる時期ではすでに骨折した骨断片は丸みを帯びており、骨吸収が行われていると考えられることから、

初期破骨細胞は骨断片を吸収する働きがあると考えられる。電子顕微鏡解析の結果から、初期の破骨細胞は、明帯や波状縁の形成は認められなかったが、ミトコンドリアに富む破骨細胞の形態的特徴を示すことに加え、多核化したものも観察された。これは、脊椎骨における破骨細胞と類似した特徴である[13]。この理由として、メダカの骨質は小さく、強い骨吸収活性を必要としないこと、広範囲の骨質の吸収のため細胞の移動性を高める必要があることが考えられる。哺乳動物の骨折モデルにおいても、仮骨形成期および仮骨形成以前で破骨細胞の存在は報告されている[24]。特に、内軟骨性骨化の際に観察されるものを破軟骨細胞と呼ぶことがあり、明帯と波状縁を持たないこれらの形態的特徴はメダカ骨折修復の初期破骨細胞に類似している[61, 62]。しかしながら、破骨細胞分化を阻害しても内軟骨性骨化による仮骨形成が起こることが報告されている[40, 41, 63]。この時期には、その他にも骨質の吸収により修復に関わるマクロファージが存在しており[64]、破骨細胞や破軟骨細胞と相補的に働いていると考えられる。

一方で、後期破骨細胞は初期の破骨細胞よりも広範囲に観察された。これは後期破骨細胞が仮骨のリモデリングの役割を持っており、仮骨の広い範囲を覆って全体をなめらかにする働きがあるためと考えられる。電子顕微鏡解析の結果から、ミトコンドリアに富むという破骨細胞の一つの特徴を示すと共に、明帯を形成していた。さらに、後期破骨細胞は波状縁様の構造を形成し、仮骨の脱灰を行っていた。このことから、後期破骨細胞は、メダカの咽頭歯部のリモデリングに関わる骨吸収活性の高い破骨細胞に類似していると考えられる[21]。この理由として、修復初期に初期破骨細胞が吸収する骨断片に比べ、はるかに分厚い仮骨を吸収するために、より強い骨吸収活性が必要なためと考えられる。このように、初期と後期それぞれに適した破骨細胞が誘導されることから、それぞれの活性化機構に違いがあることが示唆された。

2.4.5. 骨折修復における破骨細胞の細胞起源と分化機構

メダカの尾ヒレにはもともと破骨細胞が存在しないので、修復過程で観察された破骨細胞はすべて骨折に伴い特異的に誘導された破骨細胞である。血管内皮細胞を可視化した系

での破骨細胞の誘導解析から、破骨細胞は始め血管の外側表面で分化することが示唆された。

血管内皮細胞において、炎症によって生ずる IL-1 や $\text{TNF}\alpha$ が単球やマクロファージを呼び寄せる顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)の発現を誘導することが報告されているほか[65]、病変血管においてはリポタンパクが血管内皮細胞における M-CSF の発現を誘導するといわれている[66]。また、血管内皮成長因子(VEGF)が M-CSF と相補的に働くという報告もある[67]。さらに、*in vitro* においては、破骨前駆細胞が IL-1 β や $\text{TNF}\alpha$ など炎症性サイトカインによって刺激を受けた血管内皮細胞に結合すること[68]、骨髓由来の血管内皮細胞は RANKL を発現し破骨細胞分化を誘導することが報告されている[69]。破骨細胞は造血幹細胞由来の細胞であり、造血幹細胞は、哺乳動物においては骨髓中に多く含まれる。メダカには骨髓は存在しないことから、血流中に豊富に存在する前駆細胞が血管内皮細胞など血管周囲の細胞からのシグナルを受けて、血管の外側表面で分化すると考えられた。

初期破骨細胞は骨折部付近の広い範囲の血管表面で分化し、後期破骨細胞は骨吸収を行う仮骨の付近でのみ分化したことから、血管周囲で破骨細胞が分化するメカニズムが初期と後期で異なることが示唆された。半定量 RT-PCR による破骨分化因子 RANKL の発現解析では、修復初期に RANKL 発現が一過的に上昇したが、後期破骨細胞が誘導される時期では定常状態の発現まで減少していた。このことから、RANKL の発現上昇は初期破骨細胞分化に関与しているが、後期破骨細胞分化には関与しないことが示唆された。これが RANKL を介さない破骨細胞分化制御なのか、RANKL を競合阻害する OPG のような別の因子との相互作用によって生じた結果なのかは、より詳細な解析が必要である。

2.4.6. 骨折修復における骨芽細胞の細胞起源と分化機構

骨折修復時の骨芽細胞の供給源の一つとして、骨膜が知られている。骨膜中には骨形成能を示さない扁平な bone lining cell と呼ばれる休止状態の骨芽細胞が多量に存在しており[3]、これが組織の損傷に応答して急激に活性化し修復に寄与するといわれている[29,

34]。メダカの尾ヒレにおいて、鰭条の表面には *osterix* や *osteocalcin* の発現も示さない多数の細胞が骨を覆うように存在していた。骨折時に骨芽細胞は隣接する鰭条表面から集まると、骨折部において *osterix* 陽性細胞が急激に増加することから、鰭条表面には骨膜様の *osterix* 陰性の休止状態骨芽細胞が多量に存在し、修復に関わることが示唆された。

骨折後、骨折していない側の骨において、通常は *osterix* を発現しない鰭条の内側表面で *osterix* を発現する骨芽細胞が観察できたことから(Fig. 2-8, 2-9, 下図 黄矢印)、*osterix* 陰性の休止状態骨芽細胞は鰭条の内側表面にも存在することが示唆された。このことは同時に *osterix* 発現を誘導するシグナルは、骨折部から広い範囲に広がっていることを示している。しかしながら、骨折していない側の骨では骨形成は起こらないこと、仮骨形成は鰭条の外側方向のみに起こることから、骨芽細胞分化を引き起こすシグナルと骨形成を引き起こすシグナルは異なっていることが示唆された。

2.4.7. 骨折修復における骨形成と骨吸収の相互作用

骨折修復の過程において、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成は修復の進行具合に合わせて時間的に制御されていた。さらに、破骨細胞は骨折部周辺でのみ分化し、修復すべき場所にのみ移動した。また、骨芽細胞も骨形成部分にのみ集合していた。哺乳動物において、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を結びつける因子をカップリングファクターと呼び、そのメカニズムが研究されている。メダカにおいても、骨吸収と骨形成を結びつけるカップリングの働きが存在しており、破骨細胞と骨芽細胞が骨折した場所を認識し骨折修復を行っていることが示唆された。

2.4.8. 炎症に応答した骨折修復制御

メダカ骨折修復において、COX-2 は骨折後 12 時間で発現が急激に上昇し、一旦発現が減少した後、骨折後 3 日目から再び発現が上昇した。トランスジェニックメダカを用いた COX-2 発現細胞の解析では、骨折後 2 日目以降で GFP が血管周囲で発現し、骨折後 3 日目に最も発現が強くなった。この発現時期は、骨折修復において血管新生が活発化する

時期に重なった。初期の COX-2 発現が上昇する細胞の同定はできなかったが、それは発現上昇が極めて短時間であり GFP のシグナルを観察できなかったためか、もしくは、初期の COX-2 発現上昇はプロモーター活性化ではないためと考えられる。COX-2 阻害は初期破骨細胞誘導には有意な変化を引き起こさなかったが、後期破骨細胞誘導を著しく阻害した。その発現細胞が血管周囲にあること、破骨細胞分化が血管周囲で起こることから、COX-2 発現が破骨細胞誘導制御に関与していると考えられる。

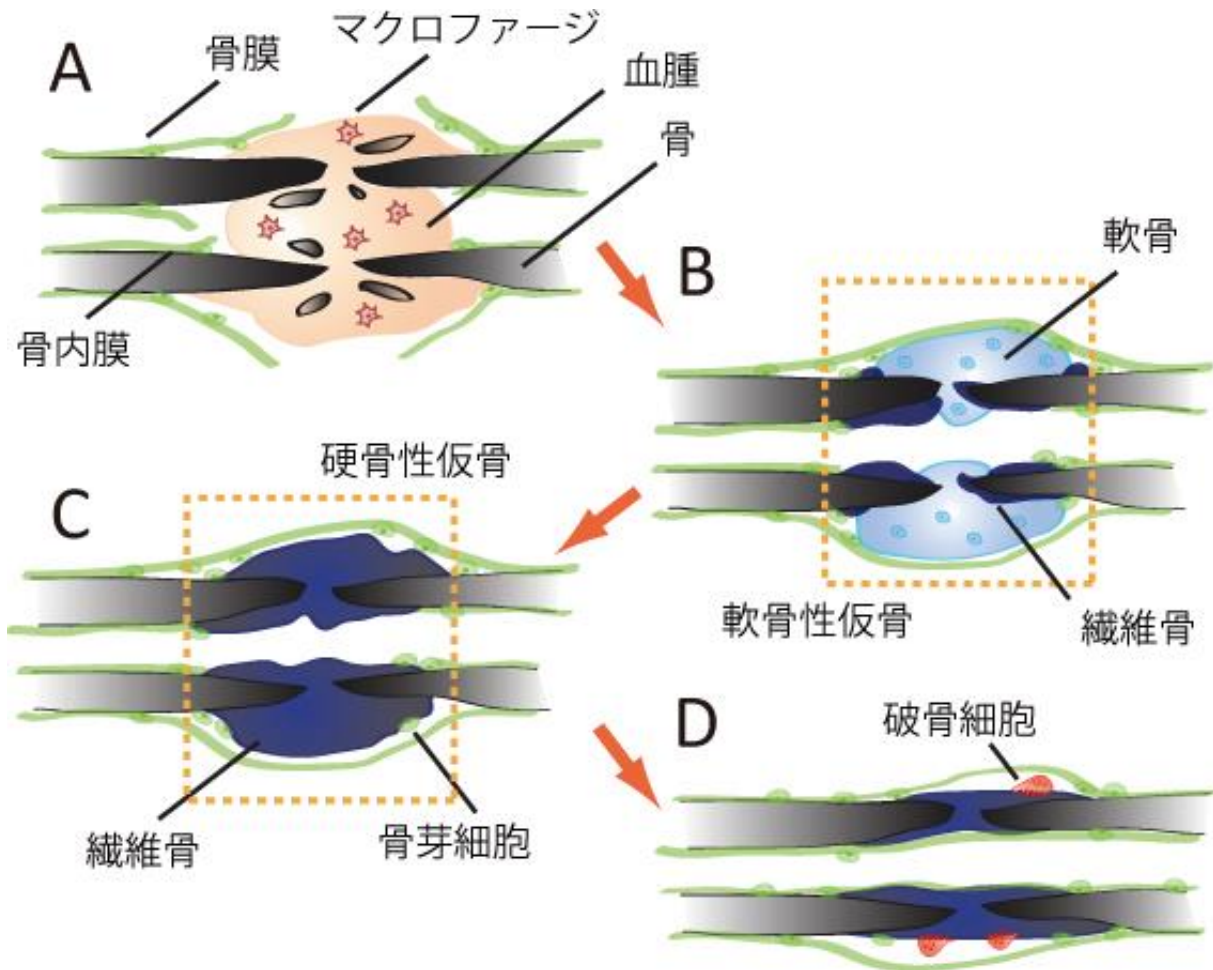
メダカの尾ヒレにおいては、PGE2 受容体のうち EP-2 と EP-4b が高発現していた。EP-4b は骨折後、経時的に上昇しており、後期破骨細胞誘導への関与が示唆された。PGE2 は *in vitro* の骨芽細胞において、OPG 産生を阻害し、RANKL 発現を上昇させることで、破骨細胞誘導を引き起こすことが知られているが、この時に働く受容体として EP-4 が重要であることが示唆されている[70]。しかしながら、破骨細胞は血管の外側表面で分化すること、COX-2 発現が血管周囲で起こることから、この PGE2 シグナルは血管およびその周囲の細胞に作用すると考えられる。報告は少ないが血管内皮細胞も破骨細胞分化に寄与していると示唆されており、PGE2 シグナルは血管内皮細胞を始めとした血管周囲の細胞集団で破骨細胞誘導を行っていると思われた。

2.5. 結論

本研究において、メダカの尾ヒレの骨組織である鰭条を用いて、骨折修復における破骨細胞と骨芽細胞を生きたまま解析できる実験系を確立できた。破骨細胞の由来は血管の周囲、骨芽細胞の由来は隣接する鰭条の表面であり、骨折部周囲で位置特異的に分化誘導された細胞は、骨折部に集まり修復を行った。興味深いことに、骨折修復における、骨吸収と骨形成は修復の進行具合に応じて制御されていた。骨折部特異的に細胞を集め、タイミング良く働かせるメカニズムには組織の炎症が関連していると考えられた。

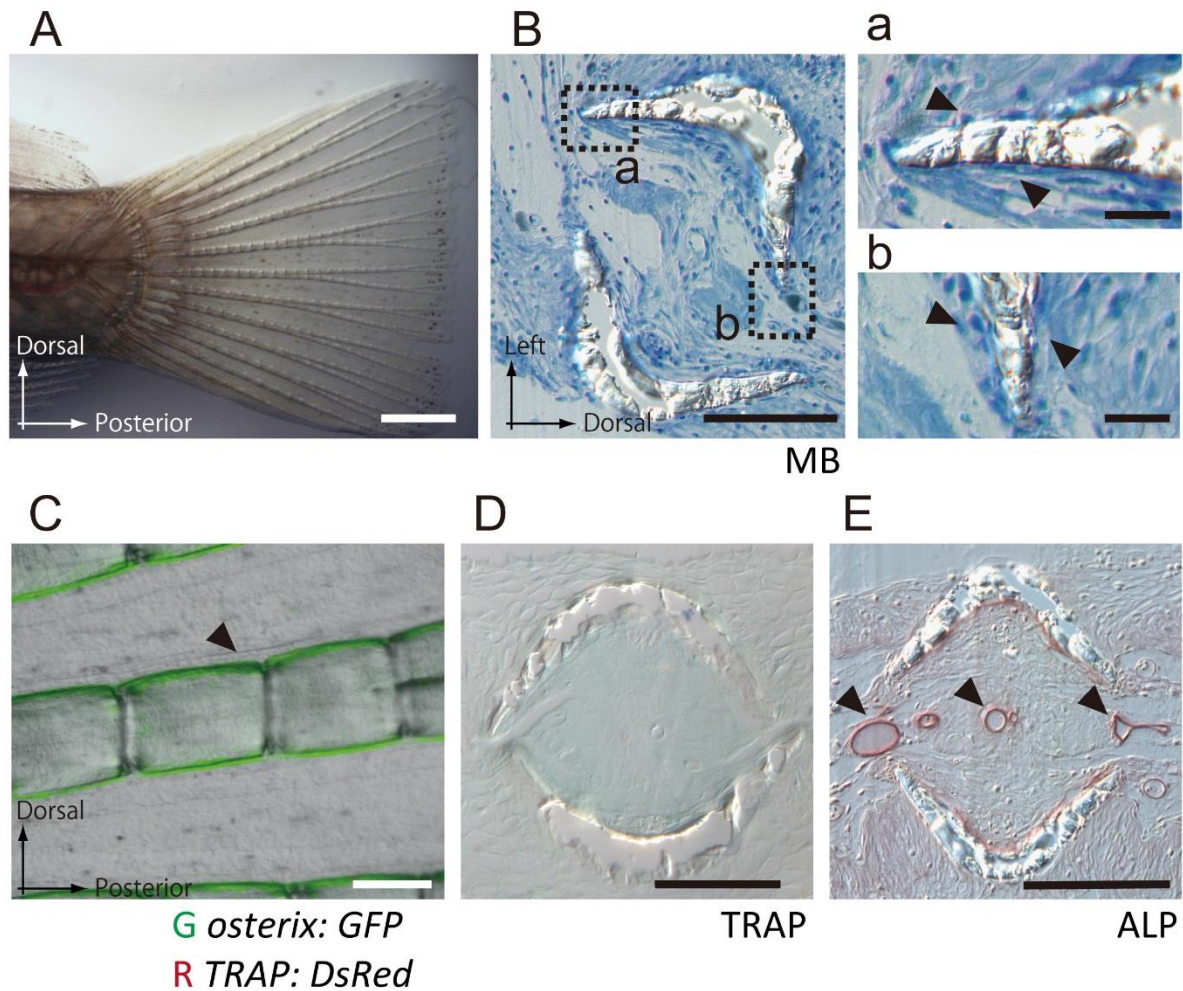
Fig. 2-1 骨折修復過程の模式図

文献[3]をもとに作製



- (A) 炎症期。骨折直後には、骨組織だけでなく、骨膜、骨髄、血管を含んだ周囲の軟組織損傷を伴う。血管の破壊による出血は骨折部に血腫を形成する。血腫の中にはマクロファージなどが浸潤し、壊死組織などの除去を行う。
- (B) 軟骨性仮骨形成期。骨膜や血流、周辺の軟組織に由来する間葉系幹細胞が軟骨細胞に分化し、骨折部を覆うこぶ状の組織である軟骨性仮骨を形成する。骨折した皮質骨の表面では、骨芽細胞による膜性骨化が生じ繊維骨を形成する。
- (C) 硬骨性仮骨形成期。軟骨細胞は血管の浸潤と共に細胞死し、内軟骨性骨化によって石灰化組織に置き換わる。はじめにできる骨は繊維骨と呼ばれ、石灰化はしているものの、コラーゲン繊維の走行が乱れているなど、構造上強度が弱い骨である。
- (D) リモデリング期。破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成を繰り返すことで、繊維骨は層状構造を持った構造上強度の強い骨に置き換わる。

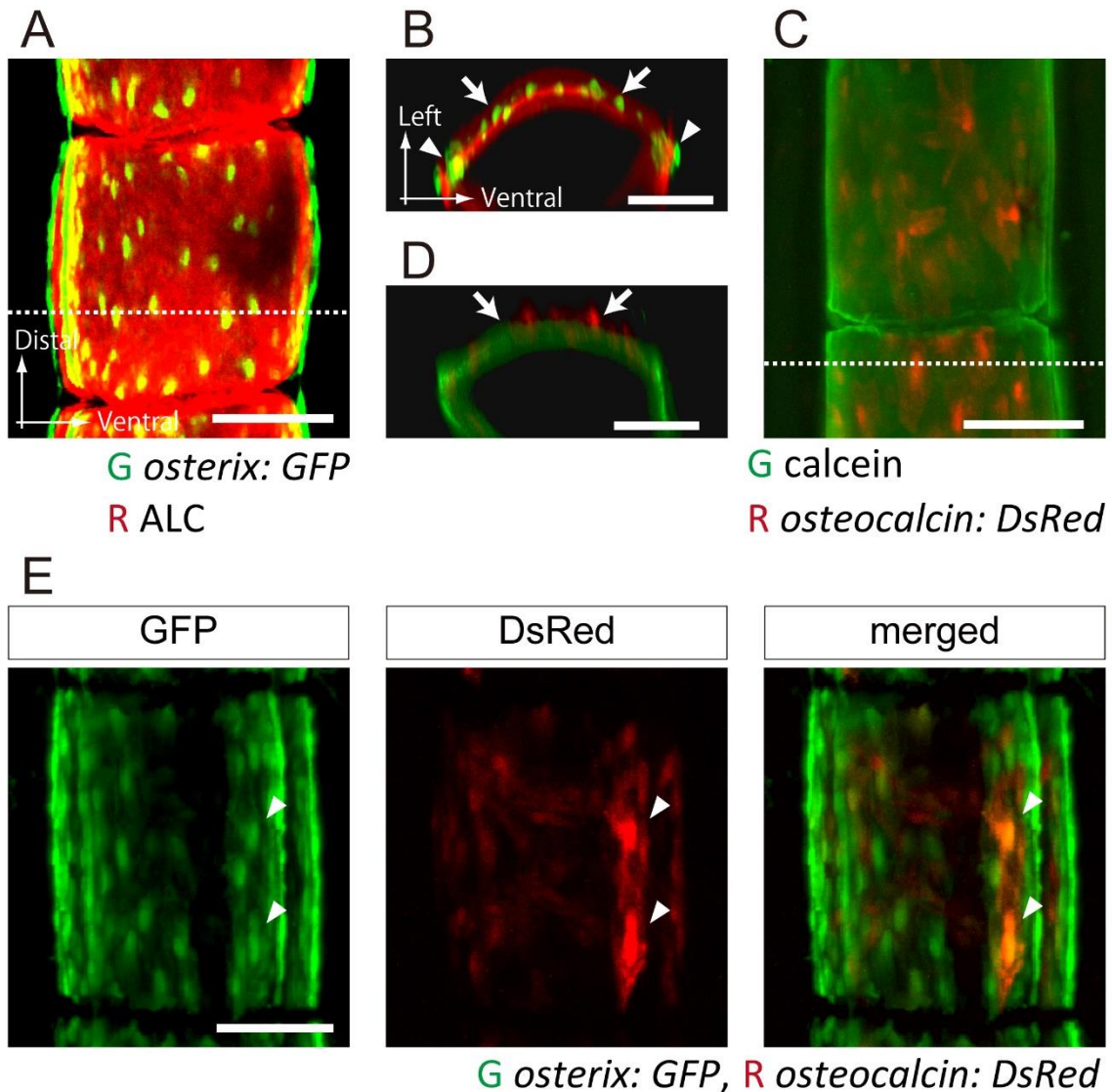
Fig. 2-2 鰭条の構造



- (A) メダカの成魚の尾ヒレ。メダカの尾ヒレは薄く透明であり、分節を持った骨組織である鰭条を持つ。
- (B) 鰭条の横断面切片のメチレンブルー染色画像。点線での拡大図を a, b に示す。鰭条は一对の瓦上の骨から成る。鰭条の表面は一層の扁平な細胞で覆われていた(矢頭)。
- (C) Tg (*osterix: GFP*, *TRAP: DsRed*)の鰭条の蛍光画像。*osterix* 陽性骨芽細胞は鰭条の表面と縁に観察されたが、*TRAP* 陽性の破骨細胞の存在は認められなかった。
- (D) 鰭条の横断面切片の *TRAP* 活性染色画像。*TRAP* 活性染色陽性の細胞は尾ヒレの鰭条周辺では観察できなかった。
- (E) 鰭条の横断面切片の *ALP* 活性染色画像。鰭条の内部の動脈と両端の静脈において内在性 *ALP* 活性が検出されたが(矢頭)、*ALP* 活性を示す骨芽細胞は鰭条表面では観察されなかった。

スケールバーはそれぞれ 1 mm (A)、100 μ m (B-E)を示す。

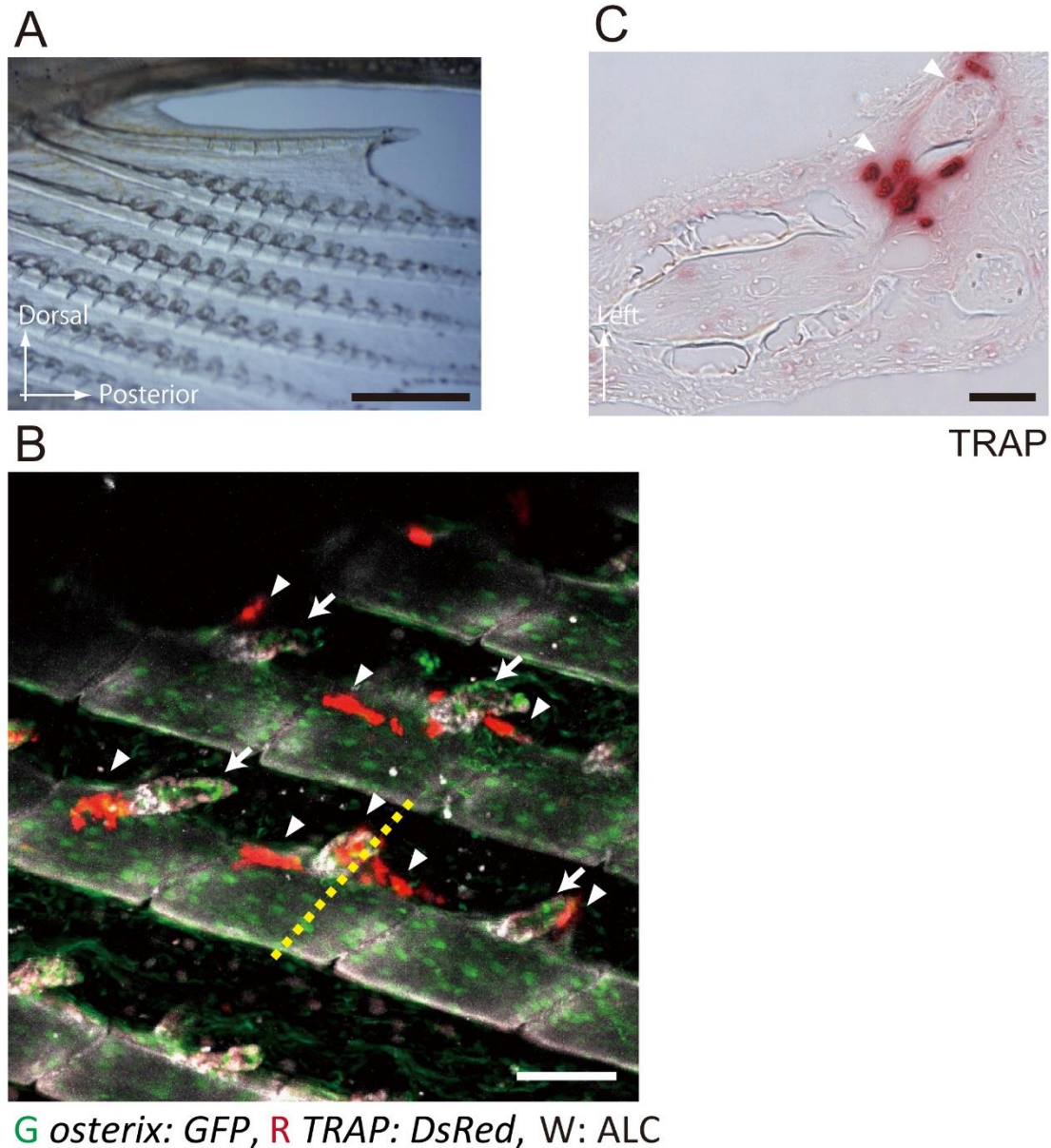
Fig. 2-3 鰭条における骨芽細胞の局在



- (A) Tg (*osterix: GFP*)の共焦点レーザー顕微鏡による重ね合わせ画像。ALC で骨を赤く染色した。*osterix* 陽性骨芽細胞は鰭条の縁と表面で観察できた。
- (B) 立体構築画像から作成した(A)の破線部での横断面図。*osterix* 陽性骨芽細胞は、鰭条の縁に多く存在し(矢頭)、その他は鰭条の外側表面に点在していた(矢印)。
- (C) Tg (*osteocalcin: DsRed*)の共焦点レーザー顕微鏡による重ね合わせ画像。カルセインにより骨を緑に染色した。*osteocalcin* 陽性骨芽細胞は鰭条の表面でのみ観察できた。
- (D) 立体構築画像から作成した(C)の破線部での横断面図。*osteocalcin* 陽性骨芽細胞は、鰭条の外側表面に点在していた(矢印)。
- (E) Tg (*osterix: GFP, osteocalcin: DsRed*)の共焦点レーザー顕微鏡による重ね合わせ画像。一部の *osterix* 陽性細胞は共に *osteocalcin* を発現していた(矢頭)。*osteocalcin* 単独陽性の骨芽細胞は観察できなかった。

スケールバーはそれぞれ 1 mm (A)、100 μ m (B-E)を示す。

Fig. 2-4 尻ビレ乳状突起における骨リモデリング



(A) 尻ビレの乳状突起。鰭条の側面から突起状の骨組織が伸びている。

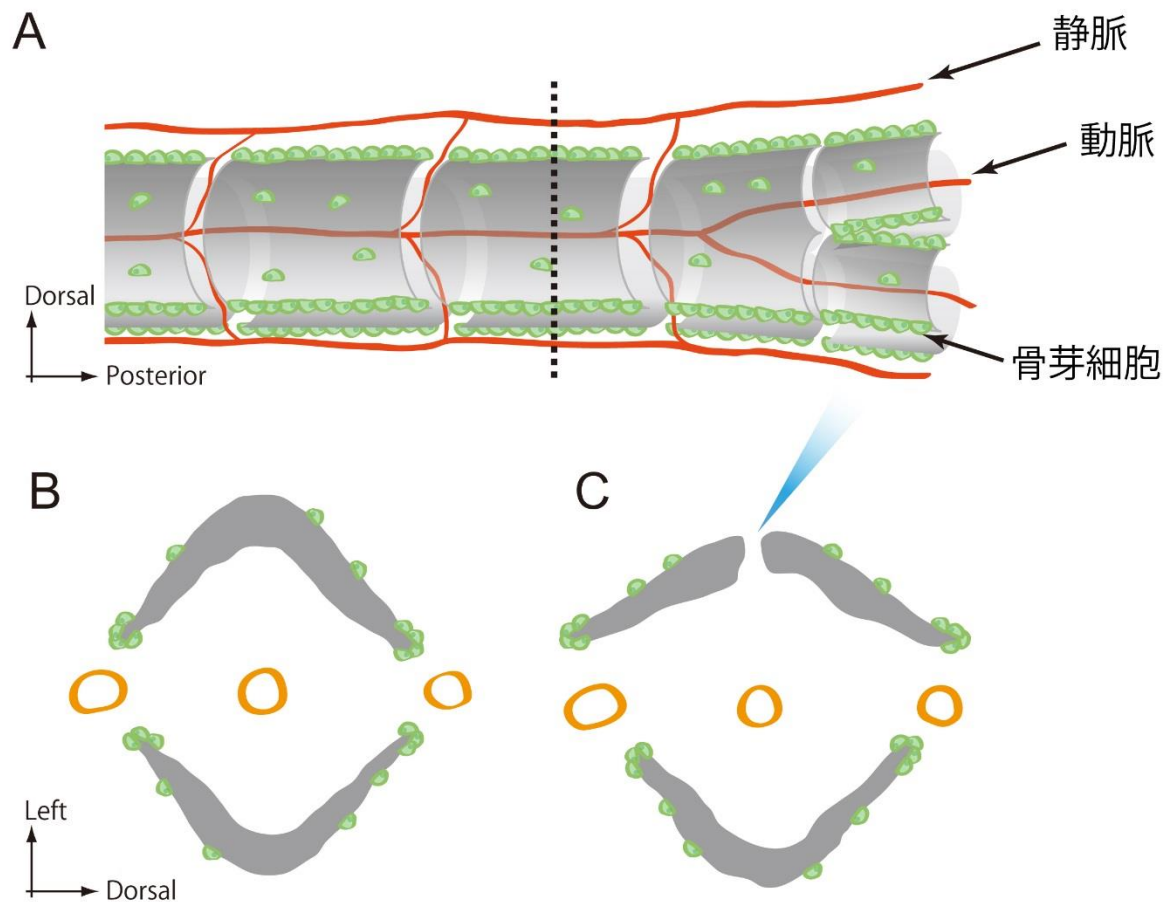
(B) Tg (*osterix: GFP*, *TRAP: DsRed*)の共焦点レーザー顕微鏡による重ね合わせ画像。

ALC で骨を染色し白で示した。TRAP 陽性の破骨細胞は乳状突起の先端部と根元部分に局在していた(矢頭)。一方、*osterix* 陽性の骨芽細胞は、尾ビレの鰭条と同様に鰭条の外側表面と縁に局在しているほか、乳状突起の先端部でも観察できた(矢印)。破骨細胞は、骨芽細胞の少ない乳状突起に多く存在していた。

(C) (B)の破線部での横断面切片の TRAP 活性染色。内在性 TRAP 活性は乳状突起の先端と根元で観察できた(矢頭)。

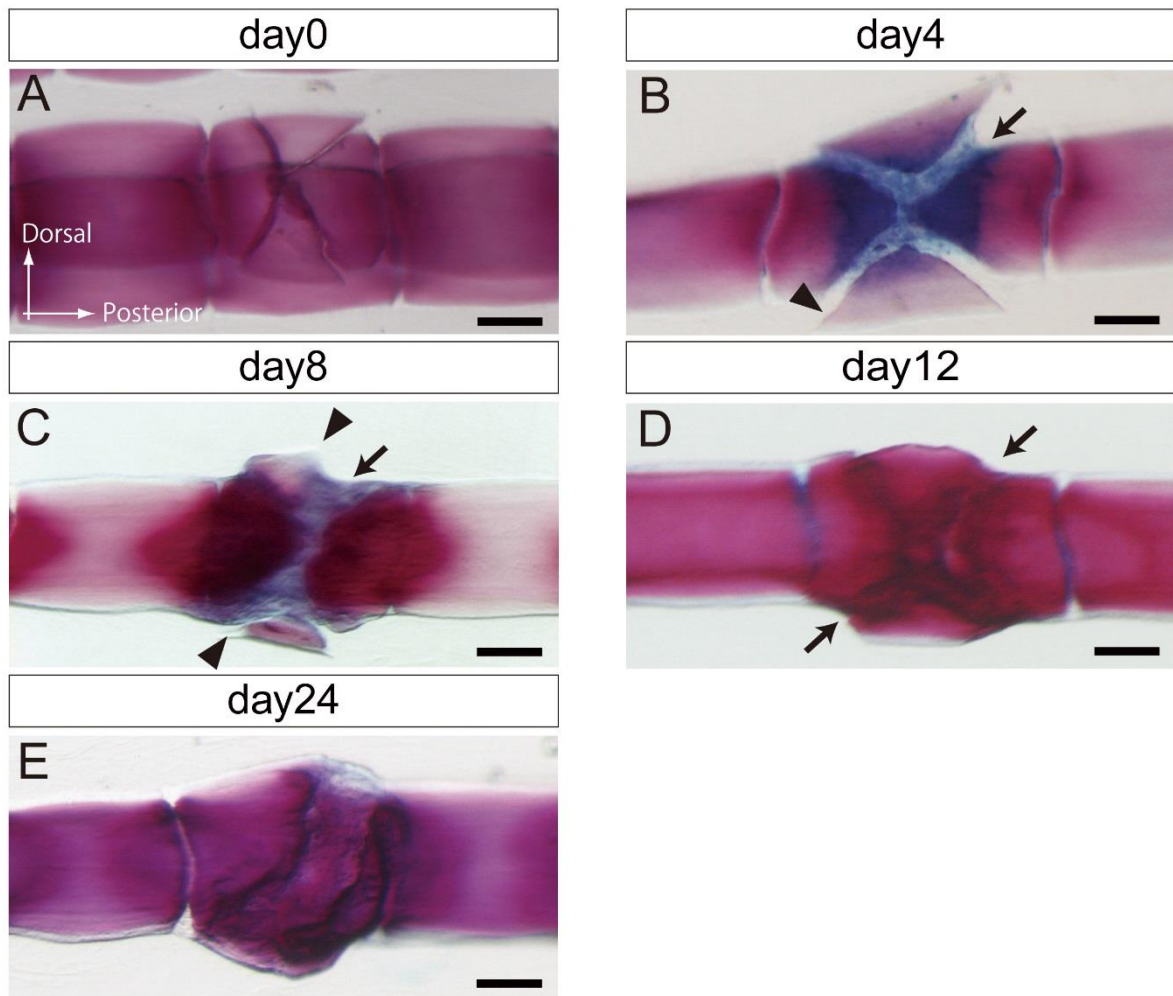
スケールバーはそれぞれ 500 μm (A)、100 μm (B)、200 μm (C)を示す。

Fig. 2-5 尾ヒレの鰭条の模式図と骨折方法



- (A) メダカの尾ヒレの鰭条の矢状面図。鰭条は分節性を持った一対の骨組織で、鰭条の内部と外部の両端に血管を持つ。内側のものが動脈で、外側両端のものが静脈である。動脈と静脈は、一対の鰭条の間を通る血管によって一部繋がっている。
- (B) (A)の破線での横断面図。中心部を通る血管が動脈で、両脇のものが静脈である。骨芽細胞は鰭条の縁と外側表面に局在する。
- (C) 骨折方法の模式図。太さおよそ $30\ \mu\text{m}$ のガラスキャピラリーを用い、顕微鏡下で片側の鰭条に押し当て、骨折させた。残る片側は骨折させずに残した。

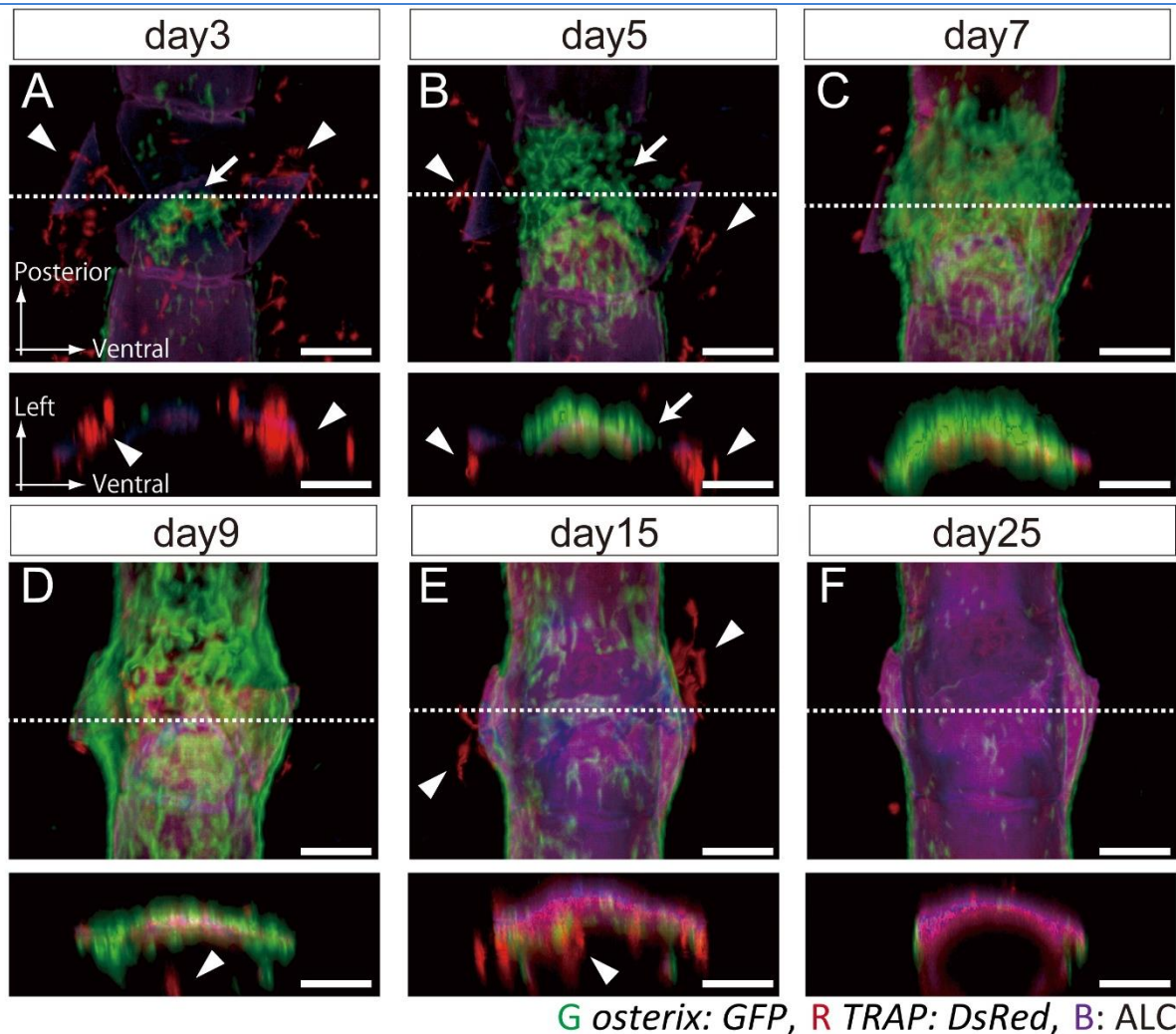
Fig. 2-6 骨折修復過程での骨軟骨線色



- (A) 骨折直後の両側の鰭条。メダカの鰭条はアリザリンレッド陽性であるが、アルシアンブルー陰性であった。骨折直後は折れた骨は離ればなれになっており、一対の鰭条を分離することはできなかった。
- (B) 骨折後 4 日目の片側の鰭条。アルシアンブルー陽性の軟骨様組織(矢印)によって、骨折によって分離した鰭条は繋がっていた。骨断片は鋭くとがっている(矢頭)。
- (C) 骨折後 8 日目の片側の鰭条。アルシアンブルー陽性の軟骨様組織は一部がアリザリンレッド陽性組織に置き換わっていた(矢印)。骨断片は丸みを帯び、新生骨に取り込まれ、骨折修復時に観察されるこぶ状の骨組織である仮骨を形成した。
- (D) 骨折後 12 日目の片側の鰭条。仮骨はアリザリンレッド陽性組織に置き換わり、アルシアンブルー陽性組織は観察できなくなった(矢印)。仮骨の表面には凹凸が見られた。
- (E) 骨折後 24 日目の片側の鰭条。仮骨の表面は丸みを帯びなめらかな骨の輪郭を回復した。

スケールバーはそれぞれ 100 μm を示す。

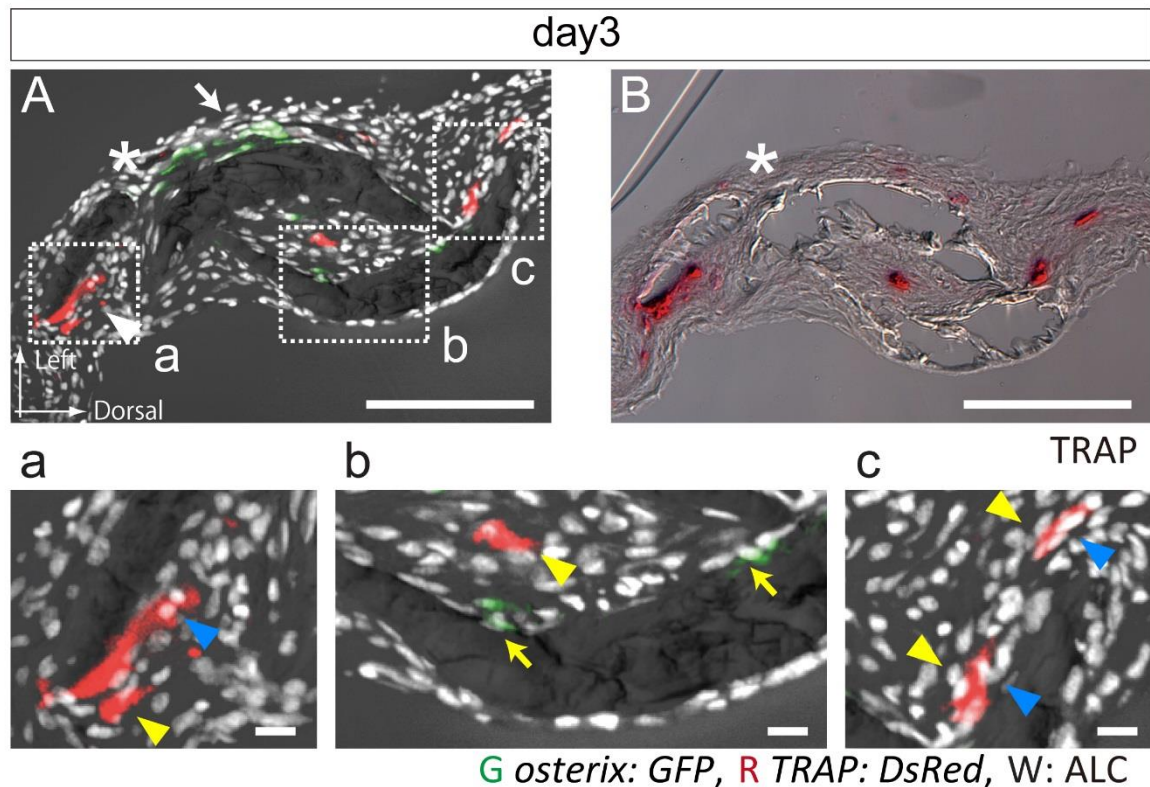
Fig. 2-7 骨芽細胞と破骨細胞の 3 次元経時観察



- (A) 骨折後 3 日目。TRAP 陽性の破骨細胞は、特に骨断片の鋭い部分に局在していたが (矢頭)、鰭条内部では観察できなかった。osterix 陽性の骨芽細胞は、骨断片上からは消失したが、折れた骨の骨端部分で他の部分に比較して多く観察された。
- (B) 骨折後 5 日目。破骨細胞は一部骨断片に残っているものも存在したが (矢頭)、3 日目よりも減少していた。骨芽細胞は離れた鰭条を繋ぐように骨折部に集まった (矢印)。
- (C) 骨折後 7 日目。破骨細胞はほぼ消失した。骨芽細胞は、骨折部全体に広がり、仮骨様の分布を示した。
- (D) 骨折後 9 日目。鰭条の内部で破骨細胞が観察された (矢頭)。骨芽細胞は骨断片を完全に取り込む形に分布した。
- (E) 骨折後 15 日目。破骨細胞が仮骨の内外の広い範囲で観察された。一方、骨芽細胞の数は減少した。
- (F) 骨折後 25 日目。仮骨の輪郭はなめらかになり、破骨細胞はほぼ消失した。骨芽細胞の数は、骨折前と同様にわずかしこ観察できなかった。

破線部での横断面を下に示している。スケールバーはそれぞれ 100 μm を示す。

Fig. 2-8 初期破骨細胞誘導ステージでの組織解析

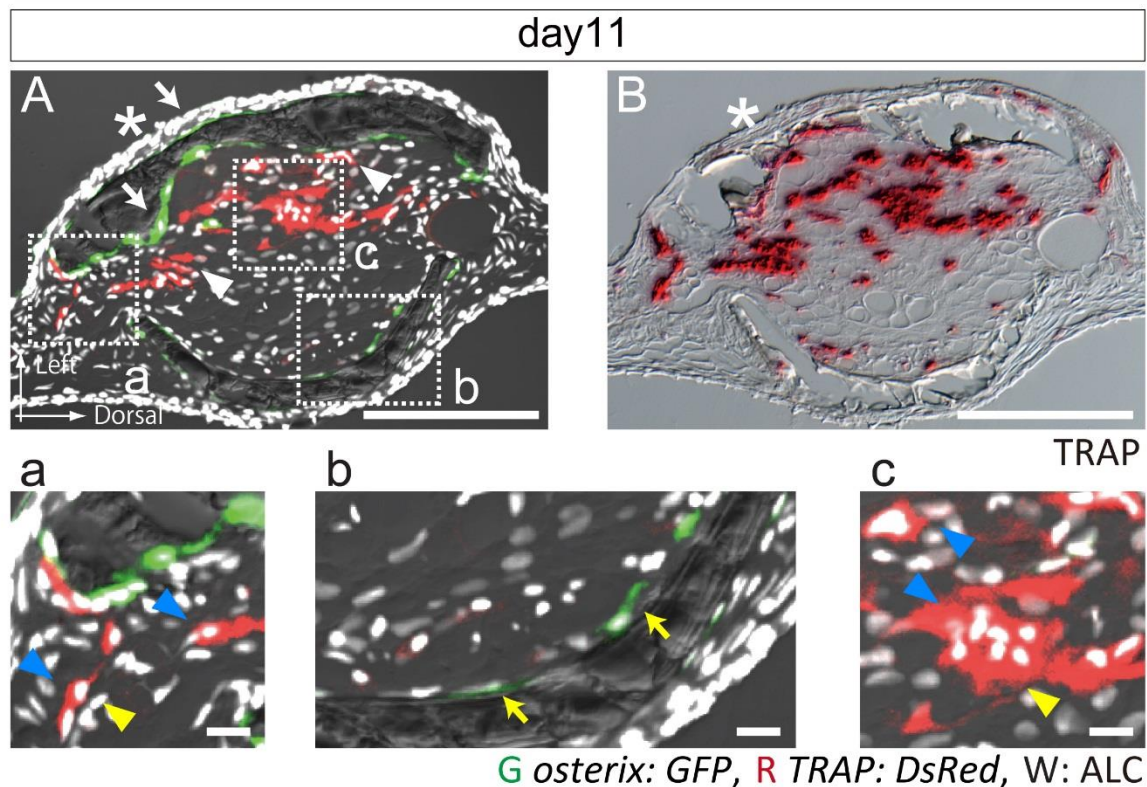


(A) 骨折後3日目における、Tg (osterix: GFP, TRAP: DsRed)の横断面切片。骨折部分をアスタリスクで、破線の拡大図を a, b, c に示した。TOPRO3 による核染色を行い核が白で示されている。TRAP 陽性破骨細胞は骨断片周囲で多く観察された(上図, 白矢頭)。また、一部の破骨細胞は骨断片から離れた血管周囲の位置に局在していた(a-c, 黄矢頭)。破骨細胞の中には複数の核を持ったものも確認された(a-c, 青矢頭)。一方、osterix 陽性骨芽細胞は骨断片付近の鰭条表面に円弧状に局在していた(上図, 白矢印)。また、骨折していない側の鰭条の内側表面で osterix 陽性骨芽細胞が観察できた(b, 黄矢印)。

(B) (A)と同一の切片での TRAP 活性染色。TRAP-DsRed 陽性細胞と内在性 TRAP 活性染色陽性細胞は一致していた。

スケールバーはそれぞれ 100 μm (A, B)、10 μm (a, b, c)を示す。

Fig. 2-9 後期破骨細胞誘導ステージでの組織解析



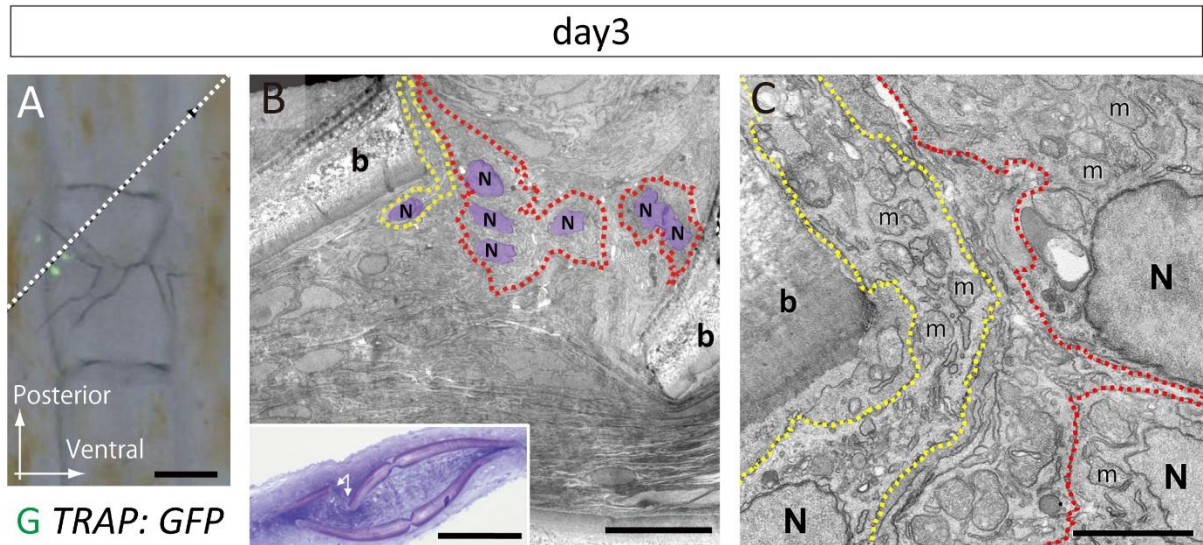
(A) 骨折後 11 日目における、Tg (*osterix: GFP*, *TRAP: DsRed*)の横断面切片。骨折した側の鰭条をアスタリスクで、破線の拡大図を a, b, c に示した。TOPRO3 による核染色を行い核が白で示されている。*TRAP* 陽性破骨細胞は仮骨周囲で多く観察された(上図, 白矢頭)。一部の破骨細胞は仮骨から離れた位置の血管周囲に局在していた(a, b, c, 黄矢頭)。破骨細胞の中には複数の核をもったものも確認された(a, b, c, 青矢頭)。*osterix* 陽性骨芽細胞は仮骨の周囲に局在していた(上図, 白矢印)。また、骨折をしていない側の鰭条の内側でも *osterix* 陽性骨芽細胞が観察できた(a, b, c, 黄矢印)。

(B) (A)と同一の切片での *TRAP* 活性染色。*TRAP-DsRed* 陽性細胞の局在と類似したパターンで内在性 *TRAP* 活性染色像が得られた。*TRAP* 活性染色の方が広範囲に検出された。

スケールバーはそれぞれ 100 μm (A, B)、10 μm (a, b, c)を示す。

Fig. 2-10 電子顕微鏡による初期破骨細胞の形態解析

東京医科歯科大学 高野吉郎 博士より提供



(A) 骨折後 3 日目における Tg (TRAP: GFP) の蛍光画像。

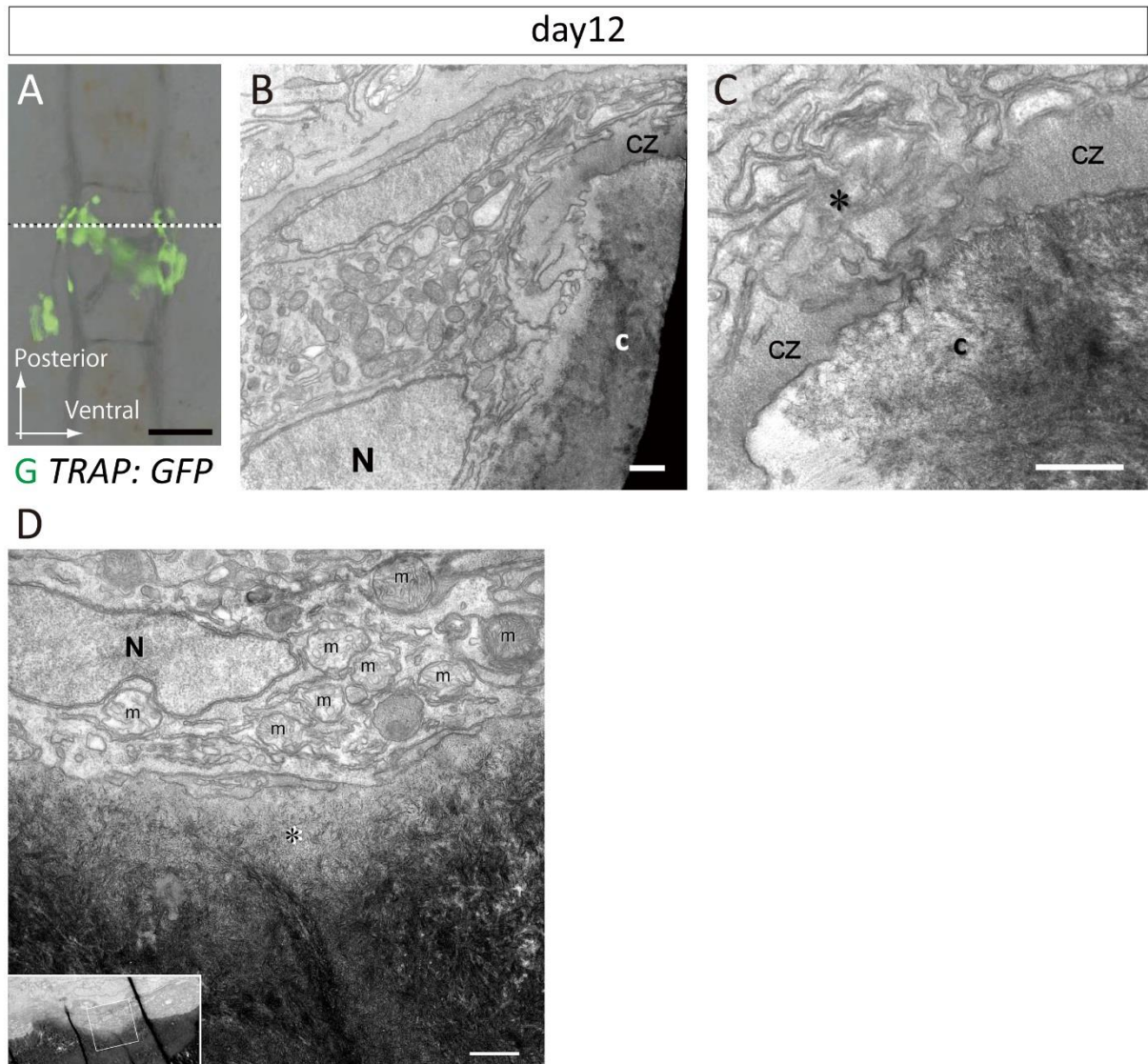
(B) (A) の破線での超薄切片における透過型電子顕微鏡撮影像。左下写真の矢印で示す骨断片を **b** で示し、核を **N** で示している。多核化破骨細胞(赤破線)と単核破骨細胞(黄色破線)が観察された。

(C) (B) の拡大画像。多核・単核どちらの破骨細胞もミトコンドリア(**m**)を豊富に含んでいる。骨断片との間には、明帯と波状縁の形成は見られなかった。

スケールバーはそれぞれ 100 μm (A, B 左下図)、10 μm (B)、2 μm (C)を示す。

Fig. 2-11 電子顕微鏡による後期破骨細胞の形態解析

東京医科歯科大学 高野吉郎 博士より提供



(A) 骨折後 12 日目における Tg (TRAP: GFP) の蛍光画像。

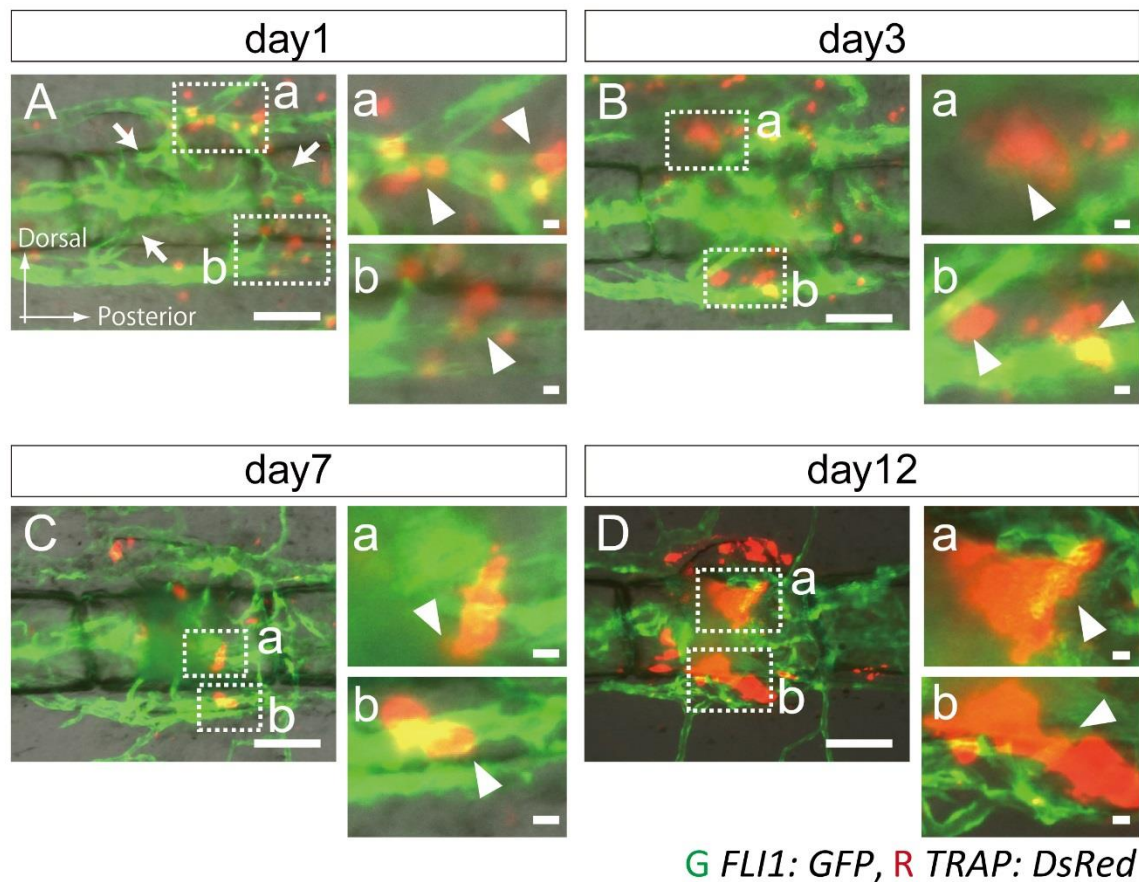
(B) (A) の破線での超薄切片における透過型電子顕微鏡撮影像。仮骨を c で示し、明帯を cz、核を N で示している。後期破骨細胞において、細胞質はミトコンドリアに富み、明帯を形成して仮骨に接着していた。

(C) (B) の拡大画像。後期破骨細胞において顕著な波状縁の形成は見られなかったが、細胞膜が陥入し折り重なっている波状縁様の構造が形成されていた(アスタリスク)。

(D) 左下画像の破線で示す骨吸収領域の拡大画像。骨吸収窩(アスタリスク)ではリン酸カルシウム結晶が薄くなり、破骨細胞による脱灰が生じていた。核を N、ミトコンドリアを m で示す。

スケールバーはそれぞれ 100 μm (A)、1 μm (B, C)、500 nm (D)を示す。

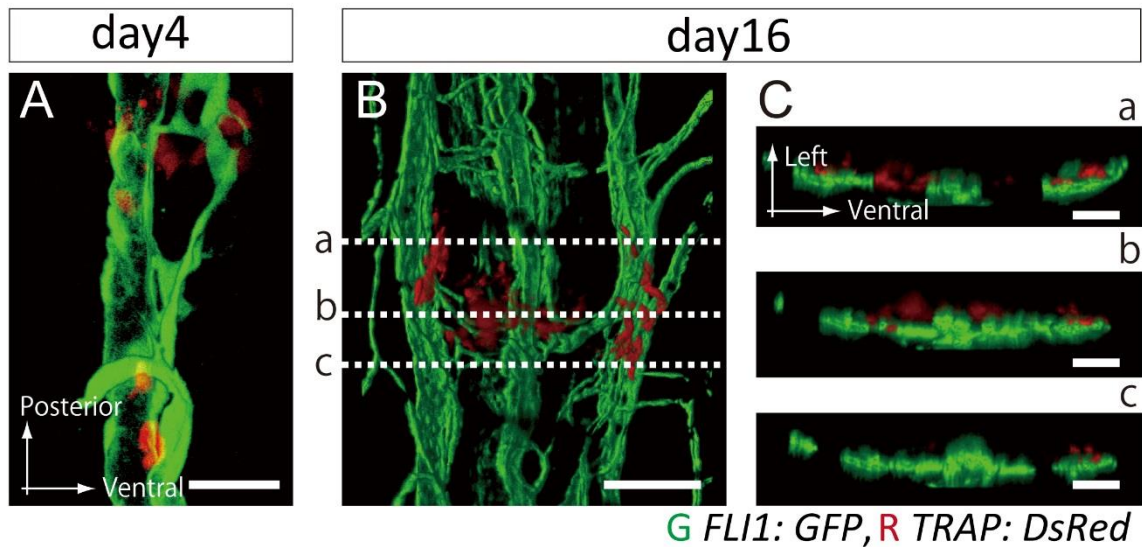
Fig. 2-12 血管周囲での破骨細胞分化



- (A) 骨折後 1 日目における Tg (FLI1: GFP, TRAP: DsRed) の蛍光画像。初期破骨細胞が血管の周囲で観察された(矢頭)。また、骨折部位周囲で血管新生が生じていた(矢印)。
- (B) 骨折後 3 日目。初期破骨細胞の多くは骨断片周囲に集まった(矢頭)。
- (C) 骨折後 7 日目。後期破骨細胞が血管の周囲で観察された(矢頭)。
- (D) 骨折後 12 日目。後期破骨細胞は仮骨周囲を覆うように集まった。初期破骨細胞は鰭条の内部にはほとんど局在しないのに対し、多くの後期破骨細胞が鰭条の内部に局在していた。

破線部の拡大画像を右に示している。スケールバーはそれぞれ 100 μm (A-D)、10 μm (A-D a, b)を示す。

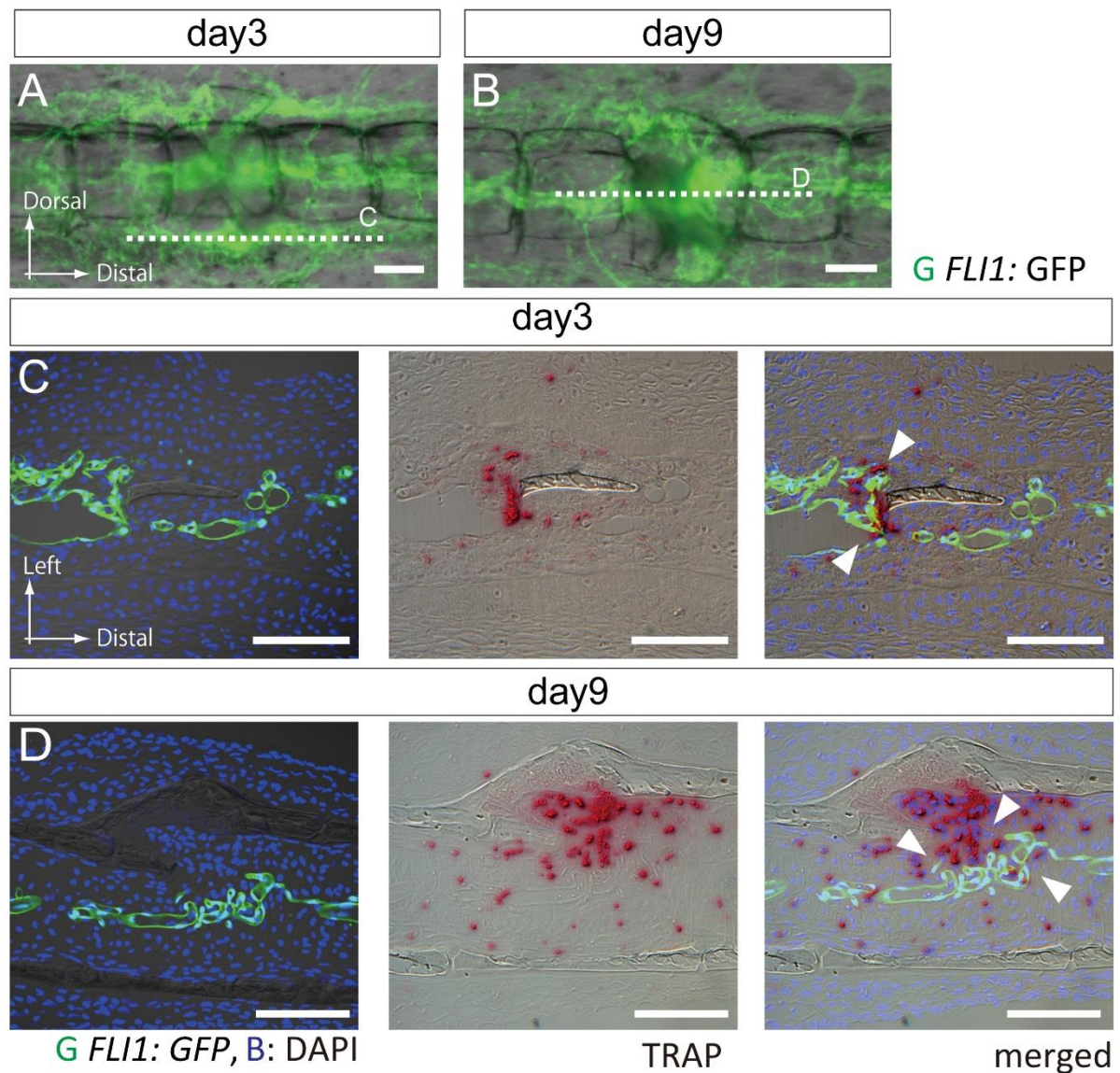
Fig. 2-13 血管周囲の破骨細胞の 3 次元画像解析



- (A) 骨折後 4 日目における Tg (FLI1: GFP, TRAP: DsRed) の蛍光画像。静脈周囲の初期骨芽細胞を共焦点レーザー顕微鏡により撮影し、立体構築を行った。破骨細胞は血管内皮細胞の外側表面で観察されたが、血管内皮細胞で囲まれた血管の内部では観察されなかった。
- (B) 骨折後 16 日目における Tg (FLI1: GFP, TRAP: DsRed) の蛍光画像。血管周囲の後期破骨細胞を共焦点レーザー顕微鏡により撮影し、立体構築を行った。破骨細胞は仮骨の周囲に加え、鰭条の内外の血管周囲で観察された。
- (C) (B) の破線での横断面画像。破骨細胞は血管内皮細胞表面で観察されたが、その局在は骨折した鰭条がある側に偏っていた。

スケールバーはそれぞれ 50 μm (A)、200 μm (B)、100 μm (C)を示す。

Fig. 2-14 血管周囲の破骨細胞の組織解析



(A) 骨折後 3 日目における Tg (FLI1: GFP) の蛍光画像。破線での水平切片を(C)に示す。

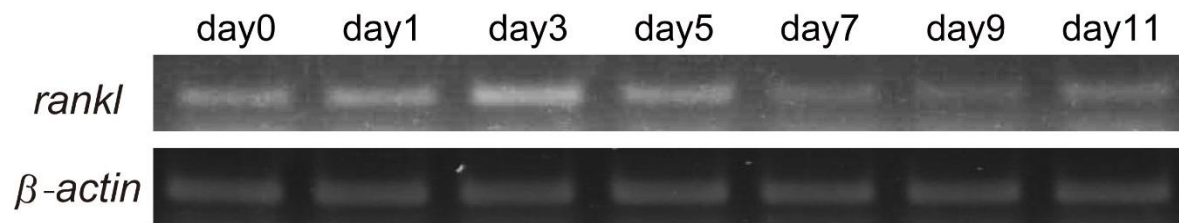
(B) 骨折後 9 日目。破線での水平切片を(D)に示す。

(C) (A)の破線での水平切片。蛍光画像は核を DAPI で染色し青で示した。同一切片で TRAP 活性染色を行い、蛍光画像と重ね合わせたものを右に示している。内在性 TRAP 活性陽性の初期破骨細胞は、FLI1 陽性の血管内皮細胞表面で観察され(矢頭)、血管の内部では見られなかった。

(D) (B)の破線での水平切片。(C)と同様に、蛍光画像、同一切片での TRAP 活性染色、そして、重ね合わせ画像を示している。内在性 TRAP 活性陽性の後期破骨細胞も、FLI1 陽性の血管内皮細胞表面で観察され(矢頭)、血管の内部では見られなかった。

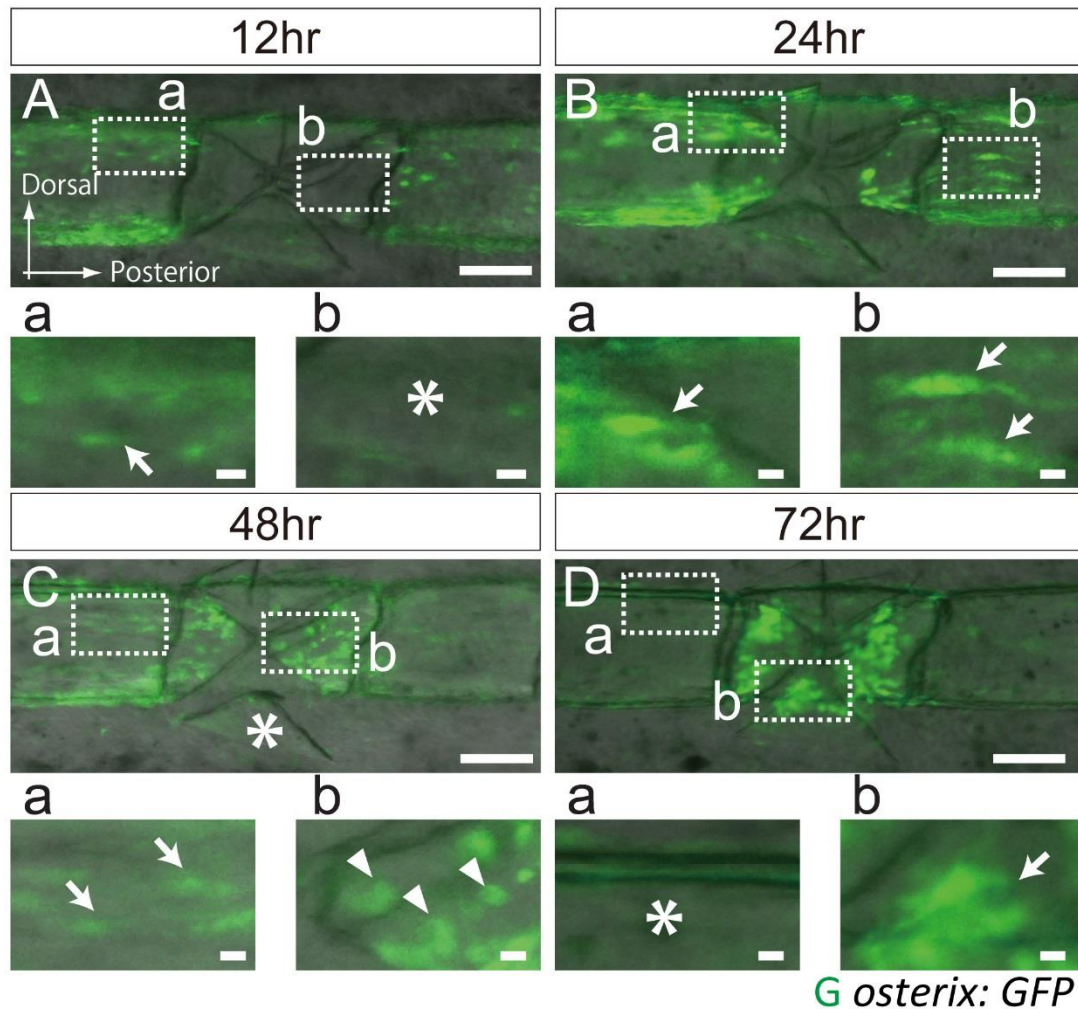
スケールバーはそれぞれ 100 μ m (A-D)を示す。

Fig. 2-15 骨折修復過程での RANKL 発現の半定量 RT-PCR 解析



骨折後 0～11 日目における、半定量 RT-PCR による RANKL 発現変化。RANKL は定常状態でも発現しているが、骨折後、徐々に発現が増加し、骨折後 3 日目で極大となった。その後、RANKL 発現は減少するが、骨折後 9 日目から 11 日目で RANKL 発現は再び増加し、定常状態に近い発現になった。

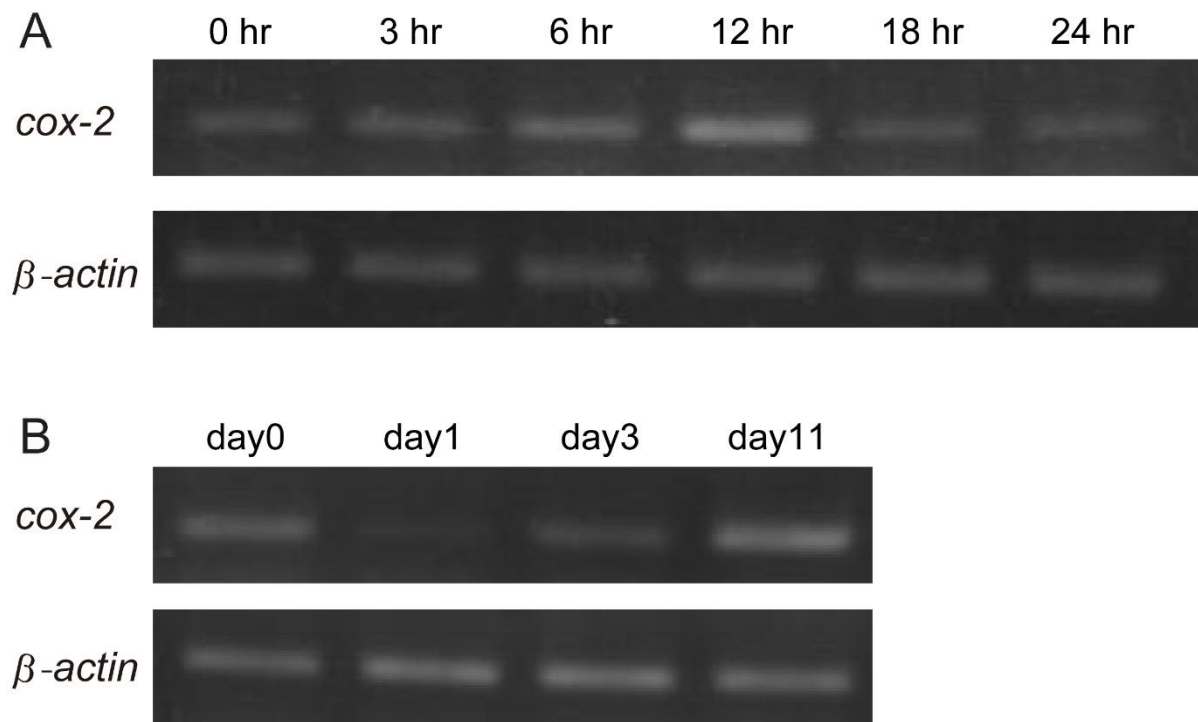
Fig. 2-16 骨折修復初期における骨芽細胞誘導



- (A) 骨折後 12 時間での Tg (osterix: GFP)の蛍光画像。もともと鰭条の表面に局在していた osterix 陽性骨芽細胞は、骨断片状では消失した(アスタリスク)。骨折部に隣接する鰭条では、定常状態と同様に、鰭条表面と縁で骨芽細胞が観察できた(矢印)。
- (B) 骨折後 24 時間。骨折部に隣接する鰭条表面に存在していた骨芽細胞は、骨折部方向に長細く伸びた楕円状の形状になった(矢印)。また、骨折部に隣接する鰭条表面では骨芽細胞が増加していた。
- (C) 骨折後 48 時間。骨折した骨の骨端部分で骨芽細胞が観察された。この部分の骨芽細胞は、定常状態と同じ円形の細胞であった(b, 矢頭)。前後の鰭条表面の骨芽細胞は長細く伸び骨折部に向かい、数は減少していた(a, 矢印)。骨断片状では骨芽細胞は観察できなかった(アスタリスク)。
- (D) 骨折後 72 時間。鰭条から離れた骨断片状にも骨芽細胞が観察された(b, 矢印)。隣接する鰭条では骨芽細胞がほとんど観察されなくなっていた(a, アスタリスク)。

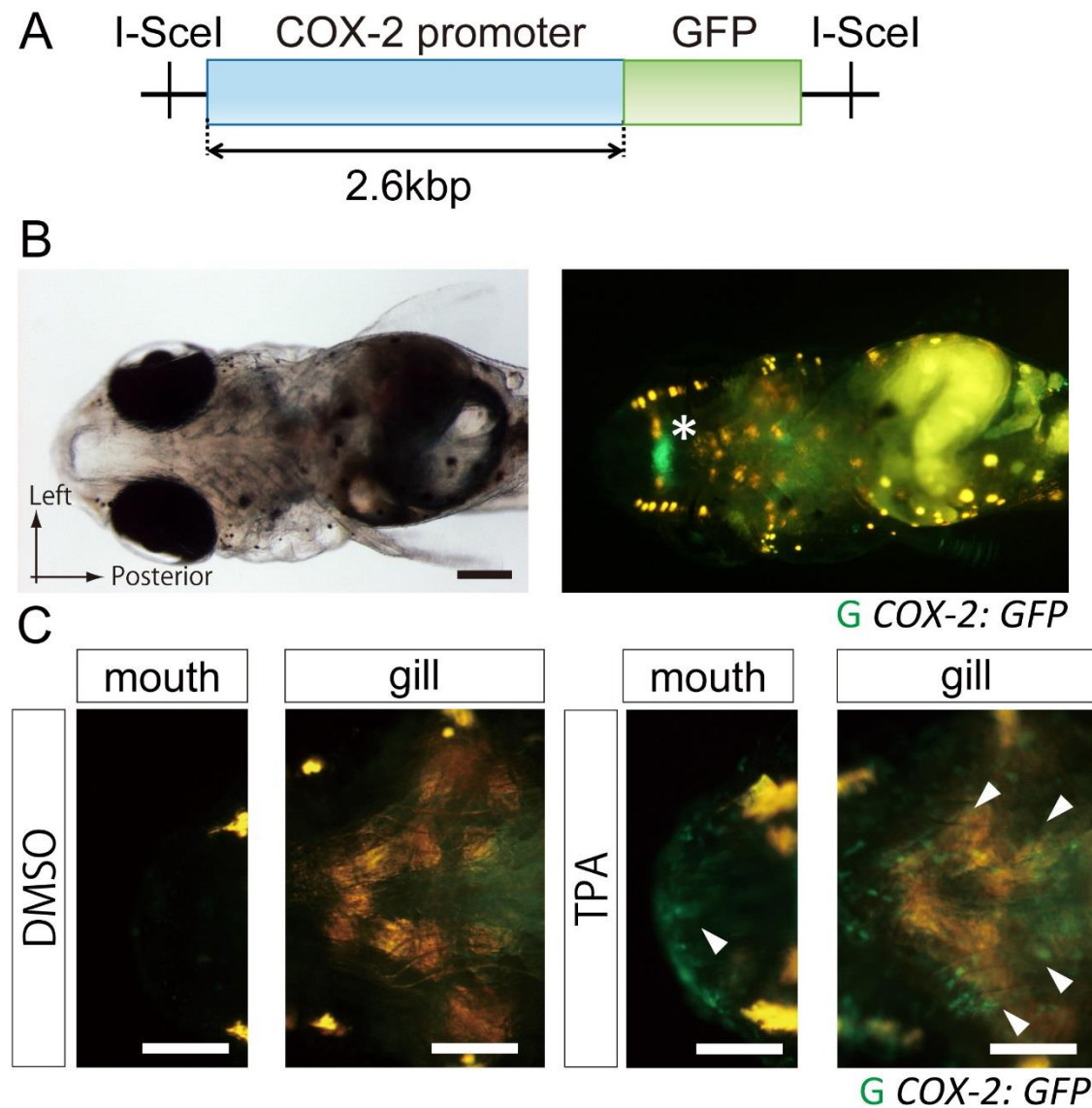
破線部の拡大画像を右に示している。スケールバーはそれぞれ 100 μm (A-D)、10 μm (A-D a, b)を示す。

Fig. 2-17 骨折修復過程での COX-2 発現の半定量 RT-PCR 解析



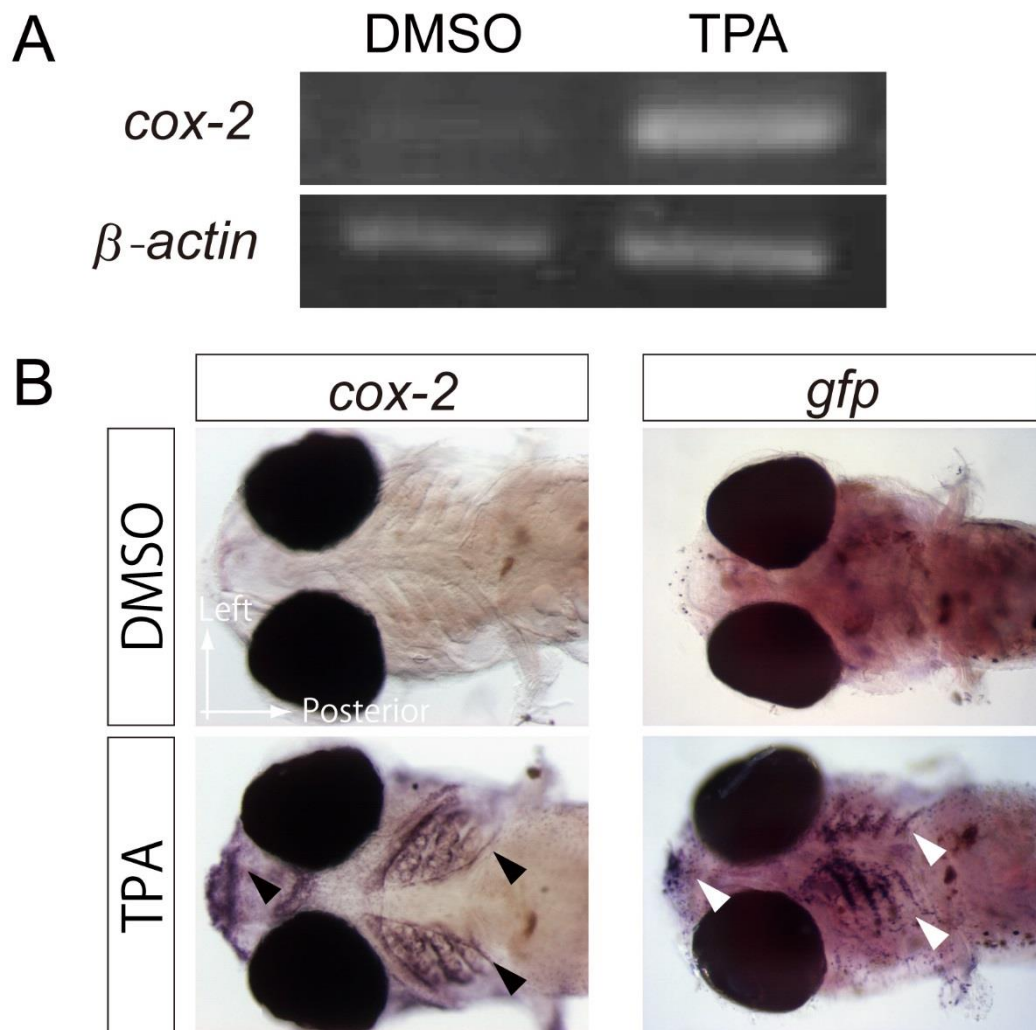
- (A) 0～24 時間における、半定量 RT-PCR による COX-2 発現変化の解析。COX-2 発現は骨折後 12 時間後において一過的に上昇し、骨折後 24 時間までに急激に減少した。
- (B) 0～11 日における、半定量 RT-PCR による COX-2 発現変化の解析。COX-2 は骨折後 1 日目で骨折前より減少したが、骨折後 3 日以降、再び発現が上昇した。

Fig. 2-18 トランスジェニックメダカ Tg (COX-2: GFP)の作製



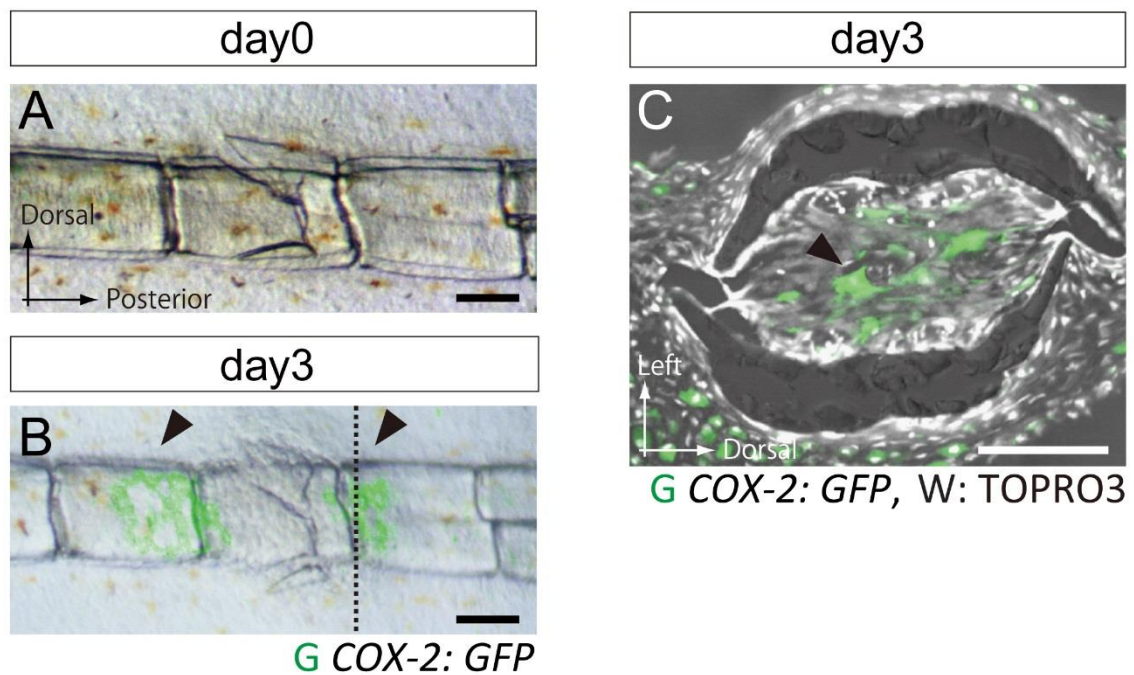
- (A) トランスジェニックメダカ作製のための DNA コンストラクトの模式図。COX-2 遺伝子上流の約 2600bp をプロモーター領域としてクローニングし GFP 配列をつなげた。メダカに組み込む領域は、メガヌクレアーゼ I-SceI 切断領域で挟んだ。
- (B) ふ化後 3 日の Tg (COX-2: GFP) を腹側から観察した蛍光画像。鼻腔に非特異的な GFP 発現が見られた(アスタリスク)。
- (C) ふ化後 3 日の Tg (COX2: GFP) に対する、COX-2 発現活性化剤(TPA)処理。薬剤処理後 12 時間において、口(mouth)と鰓(gill)で GFP 発現誘導が観察できた(矢頭)。
- スケールバーはそれぞれ 200 μ m (B-C)を示す。

Fig. 2-19 COX-2 発現活性化剤処理による COX-2 発現誘導



- (A) COX-2 発現を誘導する薬剤(TPA)を処理したふ化後 3 日目の稚魚における、COX-2 発現の半定量 RT-PCR による発現解析。コントロール群においても定常状態の弱い発現が観察できるが、薬剤処理群において COX-2 発現が著しく増加した。
- (B) COX-2 発現を誘導する薬剤(TPA)を処理したふ化後 3 日目の Tg (COX2: GFP)稚魚における、COX-2 発現と GFP 発現の RNA in situ hybridization による解析。コントロール群において、COX-2 発現は見られないが、薬剤処理群において、口と鰓で COX-2 発現と GFP 発現が検出された。

Fig. 2-20 骨折修復における COX-2 発現誘導解析



- (A) 骨折直後の Tg (COX-2: GFP) の蛍光画像。COX-2 発現を示す GFP 陽性細胞はほとんど見られなかった。
- (B) 骨折後 3 日目。GFP 陽性細胞が骨折部前後で観察された(矢頭)。
- (C) (B) の破線での横断面切片。GFP 陽性細胞は鰭条の中心部の血管周囲で観察された。スケールバーはそれぞれ 100 μm (A-C) を示す。

day3

A Dorsal view of a day3 embryo. COX-2:GFP (green) and ALC (red) are shown. White arrowheads point to the hindbrain region. Scale bar is 100 μm.

B Cross view of a day3 embryo. COX-2:GFP (green) and ALC (red) are shown. White arrowheads point to the hindbrain region. Scale bar is 100 μm.

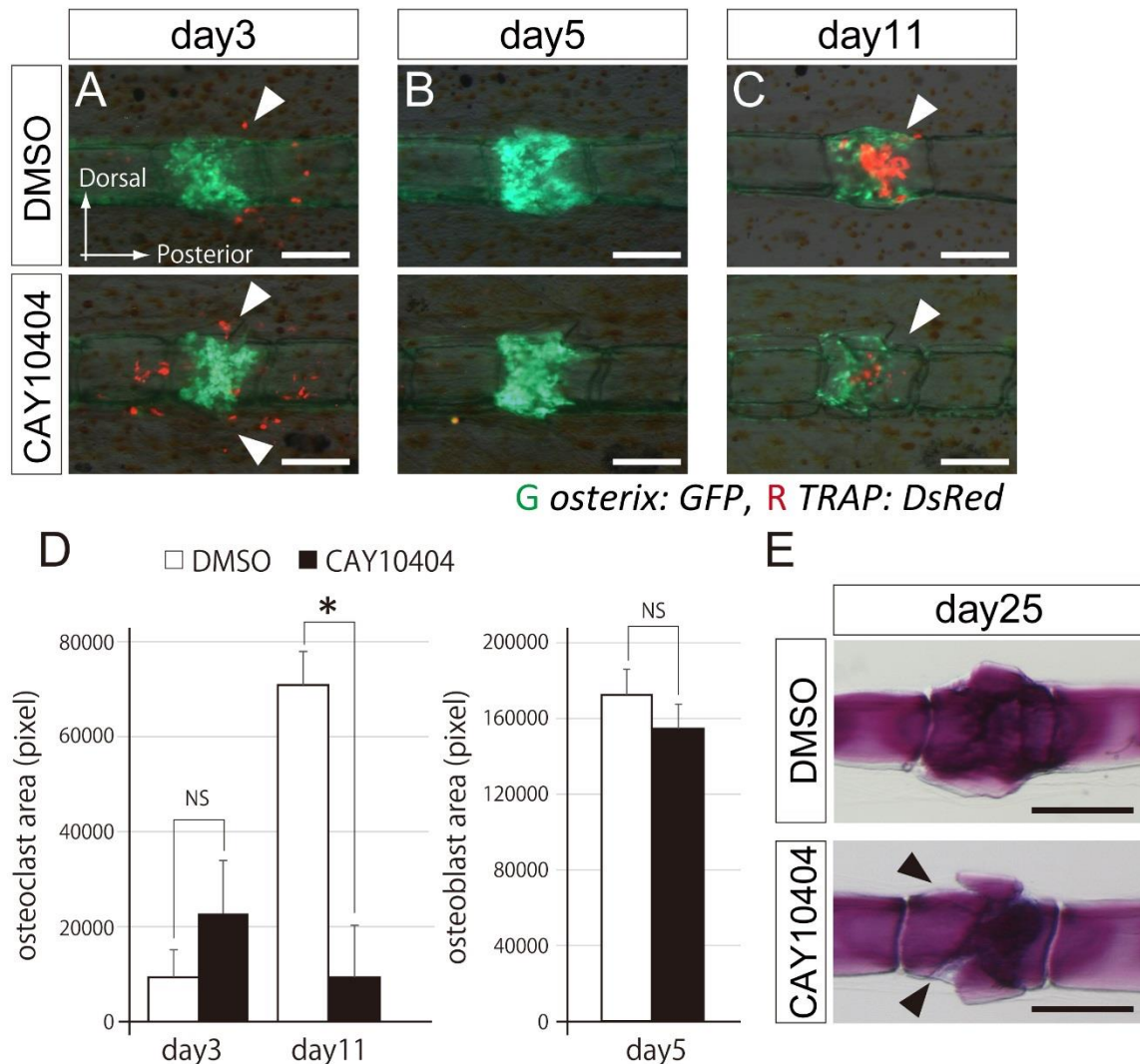
C Dorsal view of a day3 embryo. COX-2:GFP (green) and FLI1:DsRed (red) are shown. White arrowheads point to the hindbrain region. Scale bar is 100 μm.

D Cross view of a day3 embryo. COX-2:GFP (green) and FLI1:DsRed (red) are shown. White arrowheads point to the hindbrain region. Scale bar is 100 μm.

Schematic: I-SceI FLI1 promoter DsRed I-SceI
4.6kbp

- スケールバーはそれぞれ 100 μm (A, C)を示す。

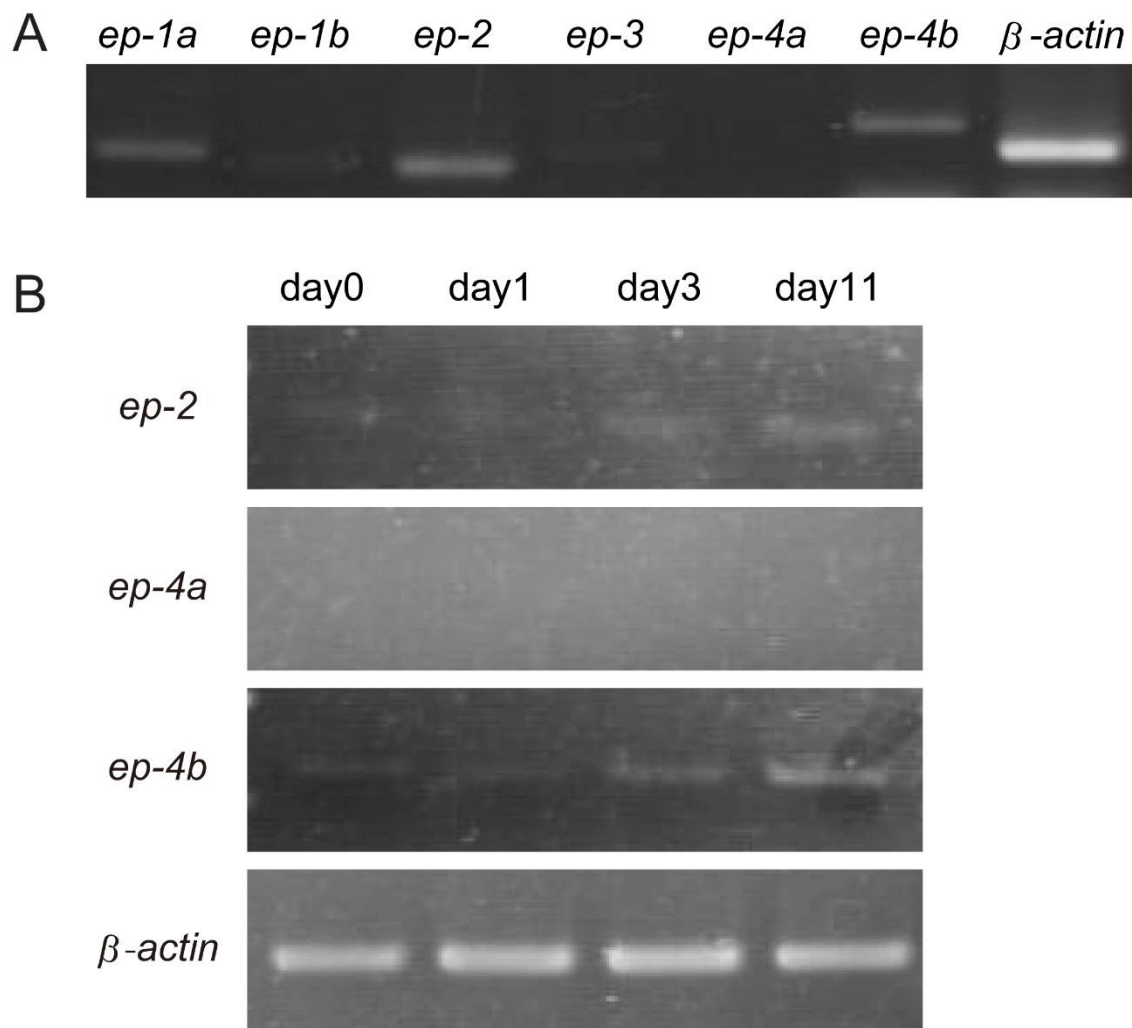
Fig. 2-22 COX-2 活性阻害下での破骨細胞と骨芽細胞の誘導



- (A) 骨折後 3 日目における Tg (osterix: GFP, TRAP: DsRed) の蛍光画像。コントロール群と薬剤処理群ともに初期破骨細胞が誘導された(矢頭)。
- (B) 骨折後 5 日目。コントロール群と薬剤処理群ともに初期破骨細胞は消失した。
- (C) 骨折後 11 日目。コントロール群に比較して、薬剤処理群では後期破骨細胞誘導の著しい減少が見られた(矢頭)。
- (D) 破骨細胞(A, C)と骨芽細胞(B)の領域を定量しグラフにした(破骨細胞: 左, 骨芽細胞: 右)。初期破骨細胞は薬剤処理群で増加する傾向にあったが有意な差は見られなかった。また、骨芽細胞領域にも有意な差は見られなかった。後期破骨細胞領域においてのみ有意な差が見られた。(control: n=3, cay10404: n=4, asterisk: $p < 0.05$)
- (E) 骨折後 25 日目における骨軟骨染色。COX-2 阻害剤処理群は、骨折した骨断片がなめらかにならないまま、いびつな骨折修復が観察された(矢頭)。

スケールバーはそれぞれ 100 μm (A-C, E)を示す。

Fig. 2-23 PGE2 受容体発現の半定量 RT-PCR による解析



- (A) 尾ヒレにおける PGE2 受容体発現の半定量 RT-PCR 解析。定常状態において、EP-1a、EP-1b、EP-2、EP-4a、EP-4b が発現していた。このうち、EP1a、EP2、EP4b が高発現していた。
- (B) 骨折修復過程での EP-2 および EP-4b の発現変化。EP-2 と EP-4a の発現には大きな変化が見られなかったが、EP-4b が修復に伴い発現上昇していた。

第3章 炎症性サイトカイン TGFβの骨折修復における機能

3.1. 序論

3.1.1. 骨代謝における TGFβの働き

トランスフォーミング成長因子β(TGFβ)は炎症に応答して分泌されるサイトカインの一つであり、発生の過程においても、細胞の分化、増殖、遊走を刺激する重要な働きがある。骨代謝においては、骨形成と骨吸収の両方を制御する働きが知られている。特に、骨質に豊富に含まれる潜在型 TGFβは、破骨細胞の骨吸収によって放出され、骨形成を制御すると考えられている(Fig. 3-1A)。そのため、典型的なカップリングファクターの一つとして TGFβは研究されてきた。最近では、TGFβを標的とした骨疾患の創薬研究も行われている。しかしながら、TGFβの働きは広範囲かつ複雑で、生体内での TGFβの正確な働きはよくわかっていない。

in vitro における TGFβの働き

骨芽細胞の培養系において、TGFβは骨芽前駆細胞の増殖と遊走を促進する[71, 72]。但し、TGFβは骨形成タンパク質 2(BMP-2)のように間葉系幹細胞を分化させる能力はなく、骨芽細胞系細胞に限定した働きをもつ[73]。骨形成能に関しては、TGFβにより細胞外マトリックスの分泌が増加し、類骨形成が促進する[74]。一方で、骨芽細胞の最終分化に対しては、TGFβは抑制的に働き、骨の石灰化とオステオカルシン発現を阻害する[75]。骨芽細胞の分化に伴い TGFβ受容体の発現が減少し[76]、TGFβが BMP-2 のアンタゴニストとして働いているためと考えられている[77]。

骨髄由来の培養細胞において、破骨前駆細胞と骨芽細胞系の細胞が共存しているとき、TGFβは骨芽細胞に働きかけ破骨細胞分化を制御する。低濃度の TGFβでは、骨芽細胞由来のオステオプロテグリン(OPG)に対する Receptor activator of NFκB ligand (RANKL)の割合が増加し、さらにマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)の発現が上昇することで破骨

細胞分化を促進する[78]。逆に、高濃度の $\text{TGF}\beta$ では、 RANKL および M-CSF の発現が減少し、 OPG の発現が上昇することで、破骨細胞分化を抑制することが報告されている[78]。

間接的に破骨細胞分化に関与するだけでなく、破骨細胞に対する $\text{TGF}\beta$ の直接的な作用も報告されている。 RANKL および M-CSF の存在下で破骨細胞を培養する実験系において、 $\text{TGF}\beta$ は破骨前駆細胞の RANKL 受容体(RANK)発現を上昇させ、破骨細胞分化を促進する。一方で、成熟破骨細胞は $\text{TGF}\beta$ によって細胞死が引き起こされる[79]。これは、骨吸収により多量の $\text{TGF}\beta$ が放出された際の負のフィードバックとして作用していると考えられている[9]。

以上のような、細胞培養での $\text{TGF}\beta$ の働きは、骨代謝に対して重要な働きを持っていることは確かである。しかし、濃度や培養条件の違いで異なった実験結果も報告されていることから、骨に対する作用を正しく理解することが困難になっている。

in vivo における $\text{TGF}\beta$ の働き

生体内において $\text{TGF}\beta$ の投与は、一般的に骨質周辺での骨形成を誘導する[9]。 BMP 投与が間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導によって異所性骨化を誘導するのに対し、 $\text{TGF}\beta$ 投与は骨芽細胞系細胞の存在する場所でしか骨形成を誘導しない。このため、骨形成に対する $\text{TGF}\beta$ の働きは骨芽細胞系細胞に限られると考えられている。 $\text{TGF}\beta$ はエストロゲン産生の減少している卵巣摘出マウス[80]、または、ビタミン D 不足マウスで減少し[81]、副甲状腺ホルモン(PTH)投与マウスにおいて増加する[82]。このことから、骨代謝の制御因子の多くの働きに $\text{TGF}\beta$ を介した骨代謝制御も関連していることが示唆されている。

$\text{TGF}\beta$ 投与実験とは異なり、骨芽細胞で $\text{TGF}\beta$ を過剰発現させたマウスにおいては、骨のリモデリングの抑制と骨粗鬆症様の表現系が報告されている[83]。また、 $\text{TGF}\beta$ 受容体のリガンド結合部だけを骨芽細胞で過剰発現させ $\text{TGF}\beta$ シグナルを阻害したマウスにおいて、骨吸収の抑制による骨形成の促進が報告されている[84]。このように、少なくとも骨芽細胞におけ

る TGF β の発現と TGF β シグナルが破骨細胞と骨芽細胞の相互作用に参与していると考えられている。

生体内においては、複数の細胞集団が同時に存在し、TGF β の働きは、適用する組織や濃度、実験系の条件によって異なる。そのため、生体内において TGF β が骨代謝を制御する正確なメカニズムはよくわかっていない。

TGF β の 3 つのアイソフォーム

TGF β の働きの理解をより困難にしているのが、複数の TGF β アイソフォームの存在である。哺乳動物においては、3 種類の TGF β (TGF β -1~3) が知られている。これらの受容体は共通しており、I 型受容体と II 型受容体がヘテロ 4 量体を形成し、smad または MAP キナーゼ (MAPK) を介して遺伝子の転写を制御する(Fig. 3-1B)[9]。

TGF β -1 は骨質中に最も多く存在している TGF β であり、骨代謝において最も重要であると考えられている[74]。TGF β -1 の欠損マウスは重篤な感染症で早期胎生致死であり、TGF β -1 欠損マウスが初めて作製された当初は骨格系の表現系は報告されていなかった[85]。このマウスは免疫応答を抑制することで生存し、後に骨の成長と石灰化、骨の強度の減少が見られることが明らかになった[86, 87]。TGF β -2 もまた、遺伝子欠損によって骨格に表現系が現れる。TGF β -2 欠損マウスは、心臓、肺、目、耳など広範囲にわたる発生異常で出生前致死となるが、致死以前に顔面骨や脊椎骨、長骨など多くの骨の奇形が生ずる[88]。これに対し、TGF β -3 の欠損マウスは肺の発生異常によりやはり胚性致死であるが、骨格系組織に対する顕著な表現系が見られない[89]。

骨の発生過程において、TGF β -3 は軟骨形成の際に増殖軟骨細胞で高発現し、徐々に発現が減少する[90]。一方で、TGF β -1 は増殖軟骨細胞と一部の肥大軟骨細胞で発現し、TGF β -2 は成長板全域の肥大軟骨細胞や石灰化軟骨細胞周辺で発現することが報告されている[91]。このように、骨形成において TGF β -1 と TGF β -2 の働きが重要であると考えられるが、それぞれの機能の違いはわかっていない。

3つのTGFβアイソフォームは、共通の受容体を持ち、*in vitro*においてはそれぞれの機能はほとんど違いがないと報告されている[92]。しかしながら、興味深いことに、ノックアウトマウスの表現系や遺伝子発現パターンが異なること、それぞれのアイソフォームが一部でしか相補的に働かないことから、生体内においては3つのTGFβアイソフォームはそれぞれ違った機能を持っていると示唆されている[9]。

骨折修復における TGFβ

骨折修復においては、TGFβ-1は修復の過程で恒常的に発現する一方で、TGFβ-2とTGFβ-3は軟骨性の仮骨が形成する時期に一過的に発現上昇することが、遺伝子発現解析によって報告され、TGFβ-2とTGFβ-3が骨折修復において重要であることが示唆されている[93]。しかしながら、骨折修復過程でのTGFβの組織内での局在は報告されておらず、その正確な役割がわかっていない。また、修復過程でどの細胞が発現しているのかも調べられていない。

3.1.2. TGFβ活性化メカニズム

2つの潜在型 TGFβ

細胞内で作られたTGFβのうち、一部はShort Latent TGFβ complex (SLC)として分泌され、一部は細胞内でTGFβ結合タンパク質(LTBP)と結合し、Large Latent TGFβ complex (LLC)として分泌される(Fig. 3-2)[74]。LLCはLTBPを介して細胞外マトリックスと結合し組織に保持される。骨質に保持されているTGFβの多くはLLCであると考えられる。いずれの潜在型TGFβも、TGFβのlatency associated peptide (LAP)ドメインが切り離され、活性型TGFβが放出されなければ受容体に結合することはできない。

MMPによる潜在型 TGFβの活性化

TGFβもその受容体も生体内では広範囲の細胞が発現しているが、シグナルを受け取る場所には特異性がある。これは、潜在型TGFβ活性化メカニズムに起因する。TGFβ活性化

メカニズムは主に *in vitro* の実験系で研究されてきた。潜在型 TGFβ の活性化メカニズムとして、MMP などタンパク質分解酵素による LAP の分解や、Thrombospondin-1 (TSP-1) やインテグリンなど細胞表面タンパクとの相互作用による LAP 構造変化に伴う、活性型 TGFβ の放出が挙げられる(Fig. 3-2)[94]。また、低 pH 環境が *in vitro* において、潜在型 TGFβ の活性化を引き起こすことも報告されている[95]。このことは、タンパク質分解酵素を分泌するだけでなく、低 pH 環境を作り出す破骨細胞が骨質中の潜在型 TGFβ 活性化に寄与すると考えられている根拠の一つとなっている。

マトリックス中の潜在型 TGFβ は plasmin や elastase、MMP によるマトリックスの分解によって水溶性の LLC として放出される[94]。LLC は TSP-1 を介して直接、活性型 TGFβ に代謝される他、plasmin や elastase、MMP によって LTBP が分解されることで、細胞から直接分泌される潜在型 TGFβ と同じ SLC になる。MMP のうち LTBP の分解に関与するのは、MMP-3 と MMP-9 である[96, 97]。SLC の分解には、plasmin や elastase に加え、MMP が寄与する。MMP のうち SLC の LAP ドメインの分解には、MMP-2 と MMP-9 が直接的に[97]、膜型 MMP-1 (MT1-MMP) はインテグリンとの共同作用により、LAP を分解する[98]。MT1-MMP は、組織内在性 MMP 阻害因子 2 (Tissue inhibitor of MMPs-2: TIMP-2) を介して潜在型 MMP-2 の活性化にも関与している(Fig. 3-3)[99]。

3.1.3. メダカ骨折修復モデルを用いた TGFβ 機能解析の意義と目的

TGFβ 研究の問題点

TGFβ は骨形成と骨吸収両方の働きに関わっており、骨代謝研究において最も重要な因子の一つである。しかしながら、現在知られている発生過程における TGFβ の発現や働きに関する知見は、1990 年～2000 年前後までに行われた研究に基づいており、最近では TGFβ 研究の新しい成果はほとんど得られていない。また、TGFβ は炎症に応答して産生されるサイトカインの一つでもあり、骨組織の損傷である骨折修復においても重要な働きをしていると考えられるが、骨折修復における TGFβ の働きはほとんど解明されていない。この原

因として、TGF β は様々な細胞集団に作用することに加え、骨折に伴う重篤な組織の炎症が、骨修復に特異的な TGF β の作用解析を阻害していることが考えられる。

メダカ骨修復モデルの利点と本研究の目的

前章で述べたように、メダカの尾ヒレは鰭条、上皮、間充織、血管、神経という単純な組織構造を持っている。このことに加え、骨代謝に関わる細胞は骨芽細胞と破骨細胞に限定され、骨細胞や軟骨細胞の関与を考慮する必要がない。また、哺乳動物を用いた骨折修復モデルでは軟組織を含む広範囲な組織損傷により重篤な炎症が起こるが、メダカ骨折修復モデルは、周囲の軟組織がほとんど損傷しない骨組織特異的な細胞応答を、生きたまま観察することができる。このような点で、メダカ骨折修復モデルは、TGF β の機能解析に非常に有用であると考えられる。

さらに、もう一つの骨修復モデルとしてメダカのヒレ再生モデルにおいても、TGF β の働きを検討し比較した。メダカの鰭条内部において潜在型 TGF β が保持されているかは明らかではないが、一般に TGF β は、骨基質中に潜在型として保持されているといわれている。そのため、それらの放出と活性化もまた骨代謝制御に関連する。メダカのヒレは再生能力を有しており、ヒレの切断後数週間で骨組織を含めたすべての組織が再生する[17]。この実験系では、損傷前の組織がすべて失われていることから、骨組織に潜在するかもしれない TGF β の働きを除外して骨修復による影響を考察できると考えた。

本研究では、メダカ骨折修復実験系を、ヒレ再生における骨修復と比較しながら、骨折修復時に分泌される TGF β が骨修復にもたらす働きを明らかにすることを目的とした。

3.2. 結果

3.2.1. 骨修復における TGF β の発現

メダカには、哺乳動物と相同な 4 種類の TGF β アイソフォーム(TGF β -1, TGF β -2, TGF β -3a, TGF β -3b)が存在する。TGF β は、哺乳動物の骨折修復では、仮骨形成期に発現すると報告されているので、骨芽細胞の骨折部への集合とそれに伴う仮骨形成が始まる骨折後 3 日で、RNA in situ hybridization による TGF β の発現解析を行った。その結果、TGF β -2 のみの発現が骨折部で観察できた(Fig. 3-4, 矢印)。その発現パターンは、その後の修復過程での骨芽細胞の局在に類似していた(2 章参照)。TGF β -2 発現は、骨折後 3 日ですでに骨折部を覆っており、この時期にすでに骨芽細胞系の細胞が骨折部に集まっていると考えられた。

さらに、メダカヒレ再生での TGF β 発現も RNA in situ hybridization で検討した。その結果、再生組織の先端に作られる間葉系組織である再生芽部分では、すべての TGF β アイソフォームが発現していたが(Fig. 3-5)、興味深いことに、骨修復部位では TGF β -2 のみの発現が観察された(Fig. 3-5, 矢印)。

どちらの骨修復の系においても、TGF β -2 の発現は鰭条の外側でのみ発現していた。骨折修復の系においては、骨形成は鰭条の外側方向にのみ起こることから(2 章参照)、TGF β -2 の発現領域は骨形成が起こる領域に一致している。以上の結果から、他の 3 つの TGF β アイソフォームではなく、骨形成領域での TGF β -2 の分泌が骨折修復において働いていることが示唆された。

3.2.2. メダカ尾ヒレにおける未熟骨芽細胞の局在

osterix 陽性骨芽細胞は隣接する鰭条の表面からも移動してくるが、骨折後 3 日頃から急激に数が増加することから、osterix を発現しない未熟な骨芽細胞も骨折部に集まっており、骨折部で osterix 陽性に分化していることが示唆されていた(2 章参照)。

そこで、より未熟な骨芽細胞の局在を調べるため、10 型コラーゲン(COLX)プロモーター下流で GFP が発現する Tg (COLX: GFP)を用いた。COLX は、哺乳動物では肥大軟骨細胞マ

一カー遺伝子であるが、メダカにおいては未熟な骨芽細胞が発現していることが報告されている[16]。組織切片を作製し、発現細胞を観察した結果、*osterix* 陽性細胞は鰭条の縁に多く局在し(Fig. 3-6A, 矢頭)、また鰭条の外側表面に点在しているのに対し(Fig. 3-6A, 矢印)、COLX 陽性骨芽細胞は鰭条の内側表面を覆っていた(Fig. 3-6B, 矢頭)。さらに、COLX 陽性骨芽細胞は鰭条の外側表面にも点在しており(Fig. 3-6B, 矢印)、これらは *osterix* と共陽性であると考えられた。これらの結果から、鰭条の内側には COLX 単独陽性の未熟骨芽細胞が、鰭条の縁と外側には COLX と *osterix* 共陽性の骨芽細胞が局在していることが明らかになった(Fig. 3-6C)。

骨折修復における COLX 陽性骨芽細胞と *osterix* 陽性骨芽細胞の局在を比較するため、Tg (COLX: GFP, *osterix*: DsRed)を用いて、組織切片を作製した。骨折部で *osterix* 陽性骨芽細胞が増加し始める骨折後 3 日目において、COLX と *osterix* 共陽性骨芽細胞は骨折した鰭条の骨端部分で観察されたが(Fig. 3-7, 矢頭)、COLX 陽性細胞は骨折部のより広い範囲に局在しており、COLX 単独陽性の未熟骨芽細胞も骨折部で観察できた(Fig. 3-7, 矢印)。さらに、骨形成が行われる骨折後 7 日目において、COLX と *osterix* 共陽性骨芽細胞は骨形成が行われている仮骨外側表面で観察されたが(Fig. 3-7B, 矢頭)、仮骨の内側表面で観察された骨芽細胞のほとんどは COLX 単独陽性の未熟骨芽細胞であった(Fig. 3-7B, 矢印)。

以上の結果から、鰭条表面にいる COLX 陽性の未熟骨芽細胞は骨折部で *osterix* 陽性細胞に分化することが示唆された。骨折後 3 日における COLX 陽性骨芽細胞の局在は TGFβ-2 の局在と類似しており(Fig. 3-4, 矢印)、TGFβ-2 を発現する細胞も骨芽細胞系の細胞であると考えられる。また、*osterix* は骨形成する側でのみ発現することから、骨形成能の獲得には *osterix* 陽性に分化する必要があることが示唆された。

3.3.3. 骨芽細胞の細胞移動と細胞増殖

隣接する鰭条表面の *osterix* 陽性骨芽細胞は骨折部に移動する(2 章参照)。同様に、鰭条表面にいる COLX 陽性細胞が骨折部へ移動するのかどうかを検討した。Tg (COLX: GFP)

のヒレを骨折させ、3 時間に 1 度の頻度で共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、取得画像から動画を作成した(動画データは報文目録 2 を参照)。骨折直後は大部分の COLX 陽性骨芽細胞は円形の形状をしていたが(Fig. 3-8A)、骨折後 24 時間では楕円形の形状に変化した(Fig. 3-8B)。骨折部での COLX 陽性骨芽細胞の数は徐々に増加し、骨の切断によって離れていた細胞の局在も骨折後 48 時間でつながった(Fig. 3-8C)。細胞の移動は引き続き起こり、骨折後 72 時間では骨断片の上にも COLX 陽性骨芽細胞が観察できた(Fig. 3-8D, 矢頭)。osterix 陽性骨芽細胞は骨折後 72 時間で急激に増加したが(2 章参照)、COLX 陽性骨芽細胞の増加は徐々に起こったことから、骨折部へ移動した COLX 陽性細胞が急激に osterix 陽性に分化することが示唆された。

さらに、骨折部における骨芽細胞の増加に細胞増殖が寄与するかどうかを、骨折後 1 日目、3 日目、5 日目において、固定前 7 時間の BrdU 取り込みを行い検証した。最も BrdU を多く取り込んだのは骨折後 1 日目であり、その後 BrdU の取り込みは徐々に減少した(Fig. 3-9)。骨折後 1 日目では、上皮や間充織で BrdU 陽性の細胞が観察でき、骨折部に隣接する鰭条表面の COLX 陽性骨芽細胞の一部でも BrdU の取り込みが観察されたが(Fig. 3-9A, 矢頭)、骨折後 3 日と 5 日において BrdU 陽性の COLX 陽性骨芽細胞は観察できなかった(Fig. 3-9B, C)。

以上の結果から、骨折部での骨芽細胞の増加は隣接する鰭条からの COLX 陽性未熟骨芽細胞の移動と、骨折部での osterix 陽性骨芽細胞への分化によって引き起こされることが示唆された。

3.2.4. TGFβ阻害下での未熟骨芽細胞の遊走と分化

続いて、骨芽細胞の骨折部への遊走と分化に TGFβが作用するかどうかを検討するため、TGFβ受容体のリン酸化を阻害する薬剤(SB431542)を用いて(Fig. 3-1B)、Tg (COLX: GFP, osterix: DsRed)の骨折修復を観察した。骨折直後において、COLX 陽性骨芽細胞は鰭条の内側と外側表面に局在していた(Fig. 3-10A, E)。コントロールにおいて、これらの骨芽細胞は骨折後 3 日で骨折部に集まり(Fig. 3-10B, 矢印)、一部の細胞は osterix 共陽性であった

(Fig. 3-10B, 矢頭)。一方で、阻害剤処理群では、コントロールに比較し COLX 陽性骨芽細胞の骨折部への集合が著しく減少した(Fig. 3-10F, 矢印)。これらの細胞は *osterix* を発現していなかった(Fig. 3-10F, アスタリスク)。骨折後 7 日目においては、コントロールでは仮骨形成が起こっており(Fig. 3-10C, 破線)、大部分の COLX 陽性骨芽細胞が *osterix* を発現していた(Fig. 3-10C, 矢印, 矢頭)。しかしながら、阻害剤処理群において、仮骨形成は認められなかった(Fig. 3-10G, アスタリスク)。骨折部での COLX 陽性細胞は増加していたが(Fig. 3-10G, 矢印)、*osterix* の発現はほとんど観察されなかった(Fig. 3-10G, 矢頭)。仮骨形成が終わった骨折後 11 日目においては、コントロールの COLX および *osterix* 陽性細胞は減少した(Fig. 3-10D)。阻害剤処理群では、COLX と *osterix* の発現がやや増加したが(Fig. 3-10H, 矢印, 矢頭)、依然として骨形成は認められなかった(Fig. 3-10H, アスタリスク)。骨折後 11 日目で阻害剤の処理をやめ、以後は飼育水で飼育したところ、骨折部での COLX 発現は増加したが、*osterix* 陽性骨芽細胞への分化と骨形成は依然として抑制されたままで、少なくとも 9 日間は骨形成が認められなかった(Fig. 3-11)。これは、TGFβ-2 の分泌または活性化が主に骨折修復の初期で起こっており、骨折後 11 日目では十分に TGFβシグナルが働かなかったためと考えられる。

TGFβ阻害剤である SB431542 は副作用として *activin* シグナルを抑制する。ゼブラフィッシュのヒレ再生において SB431542 は、*activin* シグナル抑制により間充織が増殖できず、再生面がギザギザののこぎり状になる表現型(*serrate* 表現型)が報告されている[100]。メダカ骨折修復において *activin* は発現しないが(Fig. 3-12A)、ヒレ再生においては再生芽で発現が認められる(Fig. 3-12B, 矢印)。そこで、まず SB431542 処理によるメダカヒレ再生を観察した(Fig. 3-13)。切断後 3 日において、コントロール群の切断されたヒレは間充織によって覆われ、再生芽を形成した。このとき、鰭条の切断面においては、骨形成が始まっていた(Fig. 3-13D, 矢印)。一方で、阻害剤処理群においては、鰭条の切断面に蓋をするように間充織が集まり(Fig. 3-13I, 矢印)、それに伴って鰭条間領域では間充織が陥没し、*serrate* 表現型が観察された(Fig. 3-13I, アスタリスク)。切断後 11 日目において、コントロール群では、鰭条骨が伸

張し、失われた組織の半分ほどを回復した(Fig. 3-13B, E)。しかしながら、阻害剤処理群において鰭条骨の伸張は見られず、*serrate* 表現型が観察された(Fig. 3-13G, J)。さらに、薬剤処理後 11 日目で、薬剤処理を停止した(Fig. 3-14)。その結果、薬剤処理停止後 3 日で *activin* 阻害によって引き起こされていた *serrate* 表現型は回復した(Fig. 3-14D)。薬剤処理停止後 7 日において端部側への間充織の伸張が見られたが、新たな骨形成は観察できなかった(Fig. 3-14E)。続いて、SB431542 処理下での未熟骨芽細胞遊走と分化を Tg (COLX:GFP, *osterix*: DsRed)を用いて観察した(Fig. 3-15)。コントロール群では、切断後 3 日目において、鰭条の伸張方向に骨芽細胞が局在した(Fig. 3-15B)。切断面付近では COLX と *osterix* を共発現しており、骨形成が観察できた(Fig. 3-15B, 矢印)。また、再生組織での骨芽細胞の局在に伴い、基部側では COLX および *osterix* 発現細胞が減少していた(Fig. 3-15B, アスタリスク)。切断後 11 日目では鰭条骨は伸張し、再生した鰭条骨表面では COLX と *osterix* を共発現する骨芽細胞が多数観察できた(Fig. 3-15C)。一方で、阻害剤処理群においては、切断後 3 日目においても 11 日目においても、端部側での骨芽細胞の局在は観察できず、新たな骨形成も観察できなかった(Fig. 3-15, E, F)。さらに、野生型と同様に薬剤処理後 11 日目で、薬剤処理を停止した(Fig. 3-16)。 *activin* 阻害によって引き起こされていた *serrate* 表現型が回復する阻害剤処理停止後 3 日目において、切断された鰭条の先端部で COLX 陽性未熟骨芽細胞の増加は認められたものの(Fig. 3-16B, 矢印)、 *osterix* 陽性骨芽細胞に分化しなかった(Fig. 3-16B, アスタリスク)。この後、7 日目においても、端部での *osterix* 陽性骨芽細胞は観察できなかった(Fig. 3-16C, アスタリスク)。これらの結果より、ヒレの再生過程での骨芽細胞遊走と分化にも、TGF β シグナルが関与していると示唆され、薬剤処理停止後では十分な TGF β が存在していなかったと考えられる。

さらに、TGF β 阻害剤が細胞増殖に影響したかどうかを検討するために、BrdU の取り込みを行った。その結果、TGF β 阻害剤の処理は、骨折後 1 日での BrdU 取り込みに顕著な影響を与えなかった(Fig. 3-17A, B)。以上のことから、TGF β シグナルは、骨修復において骨芽細

胞の移動と分化に関与しており、TGF β シグナルの活性化は骨修復初期においてのみ起こることが示唆された。

3.2.5. TGF β 阻害下での破骨細胞分化

ここまでの実験結果から、骨修復初期において、骨芽細胞系の細胞が分泌する TGF β -2 が骨形成に関与していることが明らかになった。しかしながら、TGF β は骨形成だけでなく、骨吸収にも関連していることから、破骨細胞に対する TGF β の働きを検討する必要がある。そこで Tg (osterix: GFP, TRAP: DsRed)を用い、TGF β 阻害下での細胞誘導を観察した。その結果、骨折直後には破骨細胞は存在しなかったが(Fig. 3-18A, F)、骨折後 3 日のコントロール群において、初期破骨細胞が誘導され骨断片の吸収を行った(Fig. 3-18B, 矢頭)。一方で、阻害剤処理群においては、初期破骨細胞の誘導が起こらなかった(Fig. 3-18G)。骨折後 7 日目において、コントロール群は骨芽細胞による仮骨形成が観察されたが(Fig. 3-18C, 矢印)、阻害剤処理群ではコントロールに比べ少数の骨芽細胞しか誘導されず、仮骨形成は起こらなかった(Fig. 3-18H, 矢印)。興味深いことに、阻害剤処理群において、この時期に破骨細胞の誘導が観察された(Fig. 3-18H, 矢頭)。骨折後 11 日目にはコントロール群において、後期破骨細胞が仮骨のリモデリングを行っているが(Fig. 3-18D, 矢頭)、阻害剤処理群において、7 日目から遅れて誘導された破骨細胞が骨断片のみを吸収していた(Fig. 3-18I, 矢頭)。骨折後 21 日目において、阻害剤処理群では骨折部での骨芽細胞の増加と仮骨形成は依然として起こらなかった。また、この時、コントロール群、阻害剤処理群ともに破骨細胞はほぼ消失した(Fig. 3-18E, J)。組織を固定し骨軟骨染色を行った結果、阻害剤処理群は完全に骨形成が阻害されており、骨が繋がっていなかったが(Fig. 3-18K, 矢印)、骨折によって生じた骨断片は丸みを帯びておりリモデリングされていた。

破骨細胞分化の必須因子である RANKL の発現は、骨折後 3 日において最大となり(2 章参照)、初期破骨細胞分化に関与していることが示唆されていた。そこで、阻害剤処理群から RNA を抽出し、半定量 RT-PCR によって RANKL 発現を検討した。その結果、TGF β 阻害剤処理により RANKL の発現が著しく低下していることが明らかになった(Fig. 3-19)。以上の

結果から、骨芽細胞系の細胞から分泌された TGF β -2 は、RANKL を介して初期破骨細胞の分化に寄与していると考えられる。

3.2.6. メダカ骨修復における MMP の発現

TGF β は潜在型として分泌されるため、シグナルが伝達されるためには潜在型 TGF β の活性化が起こる必要がある。そこで、活性化を引き起こす因子の一つである MMP に注目し、骨折修復 3 日目における RNA in situ hybridization による発現解析を行った。TGF β 活性化を引き起こす MMP として 4 種類の MMP (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MT1-MMP)が知られている[96-98]。このうち MMP-2 と MT1-MMP が、骨形成領域で発現していた(Fig. 3-20, 矢印)。これらの発現パターンは、TGF β -2 と COLX の発現パターンと類似していた(Fig. 3-4, 3-7, 3-9, 3-10)。一方で、MMP-9 は骨断片付近と鰭条の分節部分で発現していた(Fig. 3-20)。MMP-9 は破骨細胞マーカー遺伝子の 1 つであるので、骨断片付近の発現は破骨細胞での発現であると考えられる。また、骨折修復において、MMP-3 の発現は観察できなかった(Fig. 3-20)。

ヒレ再生モデルにおいても、同様に MMP の発現解析を行った。発現場所や発現細胞の形状は異なるが、すべての MMP は再生芽領域で発現していた(Fig. 3-21)。しかし、骨形成領域で発現が見られたのは、やはり MMP-2 と MT1-MMP のみであった(Fig. 3-21, 矢印)。この発現は TGF β -2 や COLX のものと類似していた(Fig. 3-5, 3-15)。また、ヒレ再生モデルにおいても MMP-9 は鰭条の分節部分で発現しており(Fig. 3-21)、定常状態で節の形成に対して何らかの働きをしていることが示唆された。

3.2.7. TGF β 阻害下での MMP の発現

骨折修復における MMP の発現が TGF β シグナルを活性化させるには、MMP の発現が TGF β シグナル非依存的に起こる必要がある。骨折修復モデルにおいて、TGF β シグナルを阻害して、RNA in situ hybridization による MMP の発現解析を行った。その結果、骨折後 1 日目において、阻害剤処群においてもコントロール群と同様に、MMP-2 と MT1-MMP の発

現が認められた(Fig. 3-22)。一方、骨折後 3 日においては、コントロール群では、骨折部を覆うように MMP-2 と MT1-MMP の発現が見られたが、阻害剤処理群においては、骨の切断部に局限していた(Fig. 3-22)。これは、TGF β 阻害によって骨芽細胞誘導が阻害されていることに起因しており、MMP2 と MT1-MMP を発現する細胞は骨芽細胞系の細胞であることが示唆された。以上の結果から、骨折修復初期において、骨折した骨端部に局在する骨芽細胞系の細胞が MT1-MMP と MMP-2 を、TGF β シグナル非依存的に発現すると考えられた。

3.3. 考察

3.3.1. メダカの骨芽細胞

哺乳動物において COLX は肥大軟骨細胞マーカーであるが、メダカにおいては、未熟な骨芽細胞が COLX を発現することが報告されている[16]。メダカは顔面骨など一部の骨において軟骨組織を介した軟骨性骨化が生じるが、軟骨細胞を介した内軟骨性骨化は起こらず、ほとんどの骨は膜性骨化によって生じる。進化の過程で、骨芽細胞はまず膜性骨化の能力を獲得し、その後、軟骨細胞が派生し、内軟骨性骨化を獲得したと示唆される(1 章参照)。そのため、メダカの骨芽細胞は軟骨細胞の特徴を一部保有しており、哺乳動物の肥大軟骨細胞マーカーが未熟な骨芽細胞で発現していると考えられる。メダカ骨折修復での骨形成過程においても、軟骨様組織が形成され、これを介して骨化が起こることが示唆されており(2 章参照)、未熟な状態の骨芽細胞が骨形成初期に分泌する軟骨様基質が、骨形成に重要な働きをしているのかもしれない。

メダカの尾ヒレにおいて、定常状態でも骨折修復過程においても、COLX 単独陽性の骨芽細胞は鰭条の内側に存在し、*osterix* と共陽性の細胞は鰭条の外側に局在していた。尾ヒレの成長において、鰭条は外側に大きくなると考えられること、骨修復時に骨形成は鰭条の外側方向に起こることから、石灰化組織の形成には *osterix* の発現が必要であることが示唆された。

3.3.2. 骨折修復における TGFβ-2 の働き

メダカにおいて 4 種類存在する TGFβ アイソフォームのうち、骨折修復時に発現するのは TGFβ-2 のみであった。これはヒレ再生においても同様であることから、骨質に保持されているかもしれない潜在型 TGFβ は骨修復に介在しない、あるいは無視できると考えられる。そのため、メダカの骨修復においては骨芽細胞系の細胞から分泌される TGFβ-2 の働きが重要である。

骨折修復モデル、ヒレ再生モデルの両方で、TGFβシグナル阻害により骨修復を抑制した群では、薬剤処理を停止しても、骨修復は行われなかった。このことから、TGFβ-2 の分泌またはシグナルの活性化は骨修復の初期でのみ起こると考えられる。ヒトの骨疾患において、骨折過程で断裂した骨が癒合せず離れたままで骨折修復が終了した症状を偽関節と呼ぶ。偽関節の治療には、周辺にある骨の細胞の再活性化が必要である。これと同様に、TGFβ阻害によって停止した骨修復を再開させるには、骨の細胞を活性化させる必要があると考えられる。実際に、ヒレ再生モデルにおいて骨修復が停止した個体において、骨端を含んで再切断すると、鰭条骨を含んだ完全なヒレ再生が生ずる(データ未掲載)。

3.3.3. 骨芽細胞における TGFβシグナルの働き

未熟骨芽細胞を含む骨芽細胞は、隣接する鰭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[91]。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[93]。本研究の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。

TGFβ阻害剤処理を停止したとき、骨折修復においても、ヒレ再生モデルにおいても、COLX 陽性細胞から *osterix* 陽性細胞への分化と、骨形成は抑制されていたが、COLX 陽性細胞の骨端部への遊走は観察された。初歩の実験結果であるが、骨折修復において阻害剤を低濃度で処理した群ではコントロール群に比べ、*osterix* 陽性の骨芽細胞の数が少なく、その局在が乱れていたため(Fig. 3-23E, F, 矢印)、不十分な仮骨形成が起こった(Fig. 3-23F)。以上のことから、TGFβ-2 の骨芽細胞に対する働きは濃度依存的であり、細胞遊走には低濃度で十分であるが、分化には高濃度の TGFβ-2 が必要であると考えられる。このよ

うなメカニズムで骨折部に特異的な骨芽細胞分化と骨形成を引き起こしていることが示唆された。

3.3.4. 破骨細胞における TGF β シグナルの働き

一方、破骨細胞に対しては、阻害剤を用いた実験から、TGF β -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。

TGF β 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 TGF β 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。

前項の内容と同様に阻害剤を低濃度に処理した場合、この破骨細胞分化は抑制されなかったことから(Fig. 3-23D, 矢頭)、破骨細胞分化に対して TGF β -2 は低濃度で作用することが考えられる。TGF β は RANKL の発現を誘導すること、TGF β と RANKL が協調的に働くことで破骨細胞分化を促進することが、*in vitro* において報告されている[101]。このように、TGF β -2 による破骨細胞分化は RANKL の働きが関与していると考えられる。しかしながら、初歩の実験結果であるが、RANKL 遺伝子を欠損したメダカにおいても、TRAP 陽性の初期破骨細胞と後期破骨細胞の両方が観察された(データ未掲載)。この結果は、RANKL は破骨細胞の成熟に関与しており、RANKL を介さないで分化した未成熟な破骨細胞でも TRAP を発現し、メダカのヒレの骨組織の吸収には十分である可能性を示唆するものであった。

破骨細胞分化のさらに詳細な解析には、破骨前駆細胞の局在を調べる必要がある。破骨前駆細胞マーカーである M-CSF 受容体(c-fms)プロモーター下流で GFP が発現する Tg を用いて、骨折修復における破骨前駆細胞の観察を試みたが、尾ヒレの組織中に TRAP 陰性で c-fms 陽性の破骨前駆細胞様の細胞は観察できなかった(データ未掲載)。魚類においては、色素細胞が M-CSF シグナルによって分化することが知られている[102]。このように、前

駆細胞マーカーや分化メカニズムが、哺乳動物とはやや異なっている可能性があり、破骨細胞の解析にはさらなる実験と検証が必要である。

3.3.5. ヒレ再生における骨修復の意義

遺伝子発現パターンの解析から、TGF β -2 はヒレ再生の骨形成領域でも発現しており、骨折修復と同様に、骨芽細胞の遊走と分化の働きを持っていると考えられる。TGF β 阻害剤である SB431542 は、TGF β superfamily 遺伝子である activin によるシグナルも阻害する。これにより SB431542 処理群では、間充織の増殖に伴う再生芽形成が抑制されることがゼブラフィッシュにおいて報告されている[100]。このような表現型はメダカにおいても同様であった。しかしながら、本研究において SB431542 処理を停止したとき、activin 阻害によって生じた表現型は回復した。このことは、activin 阻害により間充織細胞の増殖が抑制されている間も activin 発現が維持され、分泌されていたことを示唆している。一方で、鰭条骨の再生は薬剤処理停止後も抑制されたままであった。これは、骨折修復モデルと同様に、TGF β シグナルはヒレ再生の初期においてのみ発現し活性化され、正のフィードバックによって鰭条を再生していくためと考えられる。薬剤処理を停止しても、切断後 11 日目では骨芽細胞を分化させ骨形成を引き起こすのに十分な TGF β が切断面付近に存在しなかったことが示唆される。

再生が起こるメカニズムはまだ解明されておらず、魚類や両生類などを用いて研究されている。本研究の結果から、ヒレ再生において、骨組織である鰭条骨の再生が必須であり、鰭条骨の延長に伴って周囲の組織が再生される可能性が示唆された。再生後のヒレの長さは、再生前とほぼ同じ長さになることが知られており、どのようにして再生する鰭条の長さを決定しているのか、そのメカニズムは非常に興味深い。最近レチノイン酸シグナルが、ヒレ再生における骨形成領域と間充織領域のパターニングに関与すると報告された[18]。このような低分子のシグナルと協調して、TGF β -2 は骨形成領域に骨芽細胞を呼び寄せる働きをしていると考えられる。

3.3.6. MMP による位置特異的 TGFβの活性化

MMP ファミリーは TGFβを活性化する因子の一つである。MMP ファミリーの中で、MMP-2 と MT1-MMP が骨折修復およびヒレ再生において、骨形成領域の骨芽細胞系細胞で高発現していた。MMP-2 は潜在型として細胞から分泌されるため、活性化されて初めて機能を発揮する[99]。一方、MT1-MMP は膜型の MMP であり、細胞膜上のインテグリンとの相互作用で TGFβを活性化させる働きも報告されているが[98]、ここで重要なのは、TIMP-2 を介して潜在型 MMP-2 を活性化する働きがあることである(Fig. 3-3)[99]。

TIMP は組織プロテアーゼに対する内在性の阻害因子であり、分泌されたプロテアーゼにより必要以上に体内の組織が分解されないようにしている。TIMP-2 が MT1-MMP の活性ドメインに結合すると不活性型の MT1-MMP となる[99]。これに潜在型 MMP-2 のヒンジ領域が TIMP-2 を介して結合し、複合体を形成する。TIMP-2 対し十分量の MT1-MMP があり、活性型 MT1-MMP が存在するとき、MMP-2 の活性抑制ドメインを分解し活性型 MMP-2 を放出する。

骨折修復モデルとヒレ再生モデルの両方において、メダカの 2 種類の TIMP-2 (TIMP-2a, TIMP-2b)は、やはり骨形成領域で発現しており(Fig. 3-24, 矢印)、発現パターンが類似していることから、発現細胞は TGFβ-2、MMP-2、MT1-MMP と同じであることが示唆された。MT1-MMP は膜型であることから、MT1-MMP を発現する細胞の周囲でのみ、活性型 MMP-2 が存在し、その他の領域では TIMP-2 が MMP-2 と結合し不活性化していると考えられる。このようなメカニズムで、骨形成領域でのみ活性型 TGFβ-2 が生じ、その濃度勾配によって、細胞の遊走と分化を制御していることが示唆された(Fig. 3-25)。

MMP-2 欠損マウスは低体長など、骨格系の表現型が知られている[103]。また、骨折修復においては、リモデリングが抑制されることが報告されている[104]。一方、MT1-MMP は内軟骨性骨化における軟骨細胞の分解に必須とされ、欠損マウスにおいて骨格系の異常な表現型が報告されている[105]。しかしながら、骨折修復での解析は行われていない。また、骨折修復において、これらの機能と TGFβ活性化と関連づけた働きは報告されていない。骨

折修復において、細胞が損傷箇所を認識し、特異的に修復を起こすメカニズムは重要な問題である。今後のさらなる研究により、このメカニズムの一つとして、 $\text{TGF}\beta$ と MMP の働きが明らかになることが期待される。

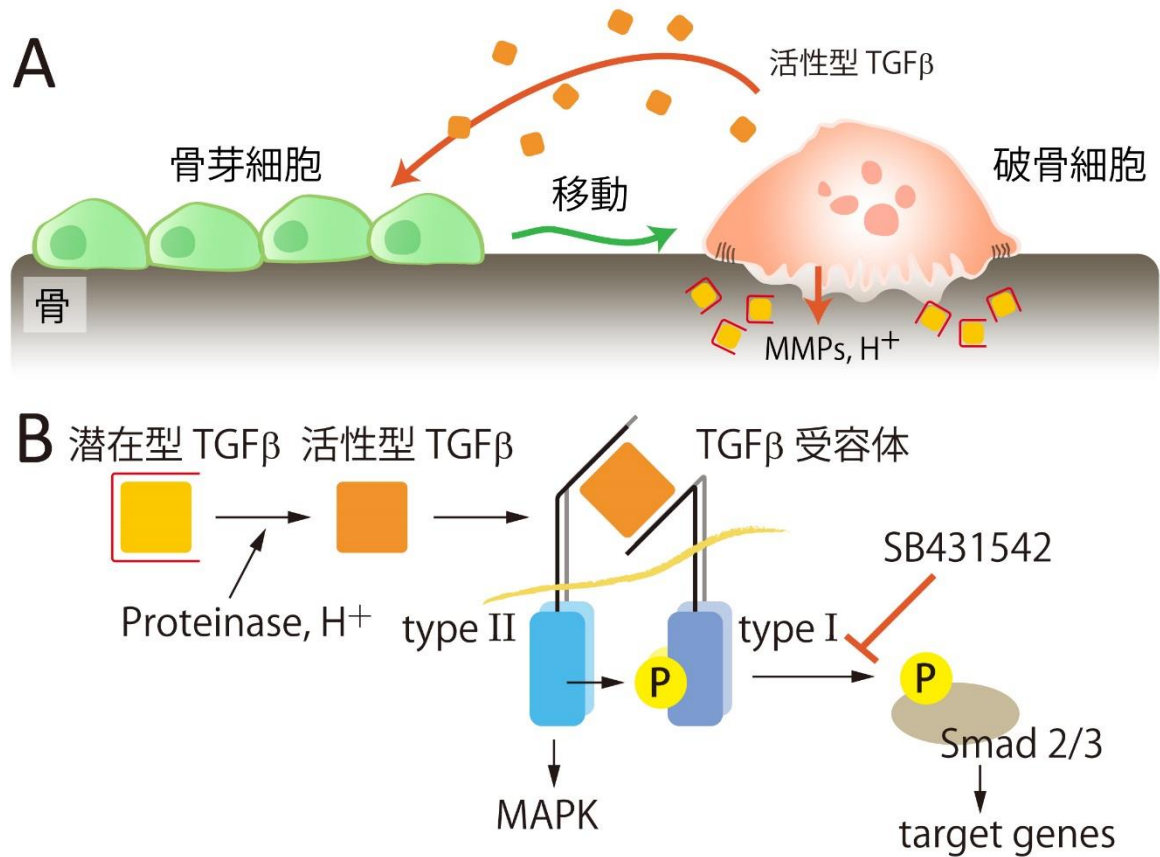
3.4. 結論

TGF β は骨代謝を制御する最も重要な因子の一つであるが、アイソフォームそれぞれの特異的な働きや、骨折修復における機能はわかっていなかった。本研究において、メダカ骨折修復モデルを用いた解析により、骨折修復における TGF β の機能を検討した。その結果、4つのアイソフォームのうち TGF β -2 が特異的に骨修復に関与していることが示された。骨芽細胞系の細胞から分泌される TGF β -2 は、骨芽細胞の遊走と分化、破骨細胞の分化に関与していた。骨形成領域の骨芽細胞系の細胞では、TGF β の活性化に関与する MMP-2 および MT1-MMP が発現していた。これらの MMP が、TGF β を介して、骨芽細胞や破骨細胞が修復箇所を認識するために働いていることが示唆された。

図表

Fig. 3-1 潜在型 TGFβの活性化と TGFβ受容体によるシグナル伝達

文献[1]および[9]をもとに作製。

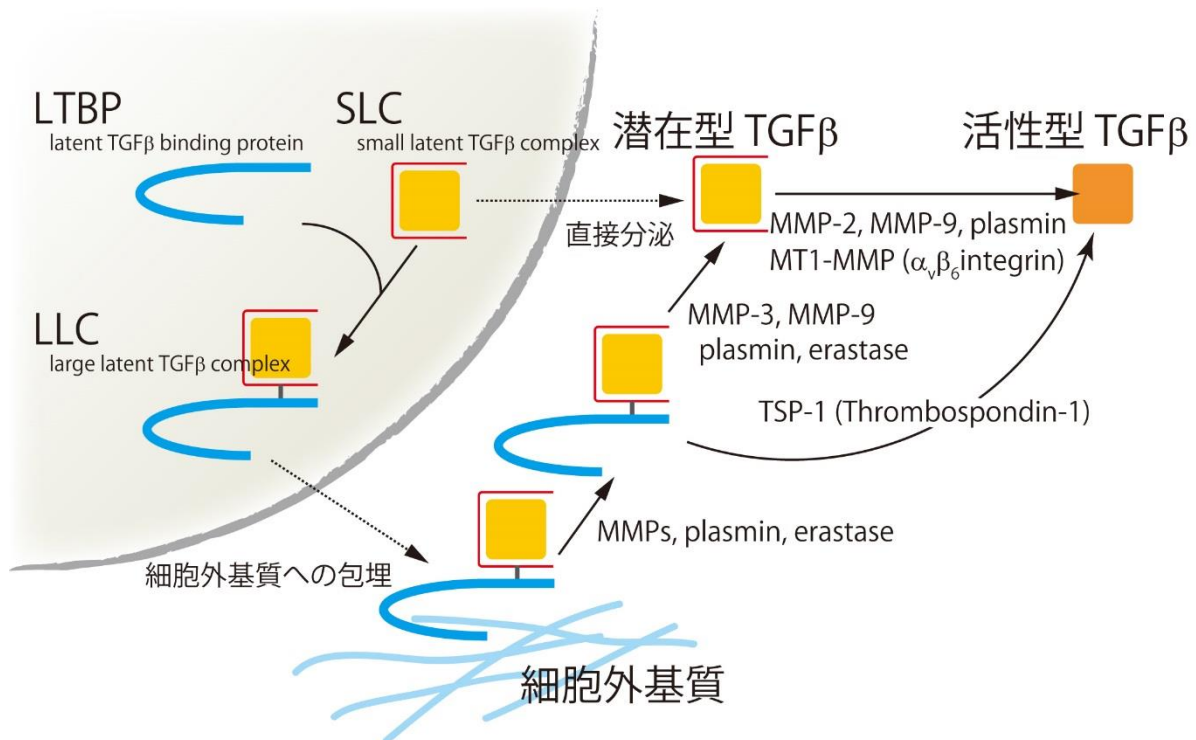


(A) 破骨細胞による活性型 TGFβ放出と骨芽細胞へのシグナル伝達の模式図。骨質中に存在する潜在型 TGFβが破骨細胞のプロテアーゼや酸で分解され放出される。放出された活性型 TGFβは骨芽細胞の増殖と細胞遊走を促進し、破骨細胞が吸収した場所に骨芽細胞が集まり骨形成を行う。

(B) TGFβシグナル伝達の模式図。潜在型 TGFβは活性型になって初めて受容体と結合できる。活性型 TGFβは TGFβI 型受容体とまず結合し、さらに II 型受容体が結合することでヘテロ 4 量体を形成する。II 型受容体は I 型受容体をリン酸化し、I 型受容体は Smad-2 または Smad-3 のリン酸化を介して標的遺伝子の転写を調節する。TGFβ受容体阻害剤 (SB431542)は Smad のリン酸化を阻害する。このほかに、II 型受容体による MAPK を介したシグナル伝達も知られている。

Fig. 3-2 2 種類の潜在型 TGFβ の分泌と活性化

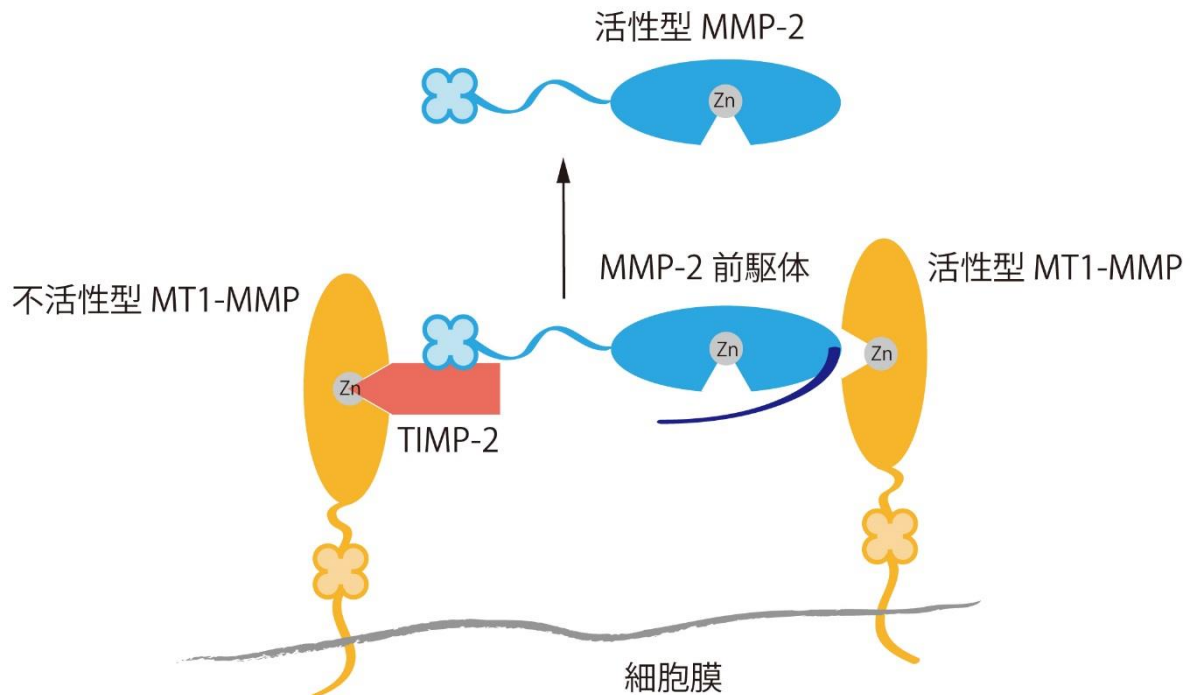
文献[9]をもとに作製



TGFβは細胞内で潜在型 TGFβとして作られる。これは、SLCとして直接細胞外へ分泌されるほか、細胞内でさらに TGFβ結合タンパク質(LTBP)と結合し LLC として分泌され、細胞外基質に保持される。MMP、plasmin、erastin などのタンパク質分解酵素によって細胞外基質から放出された LLC は、MMP-3、MMP-9、plasmin、erastase によって LTBP が分解されると SLC になる。SLC は、MMP-2、MMP-9、plasmin によって代謝され活性型 TGFβとなる。SLC の代謝には MT1-MMP とインテグリン $\alpha_v\beta_6$ の相互作用によっても引き起こされる。また、基質タンパク質である TSP-1 は LLC の構造を変化させ、直接活性型 TGFβが放出される。

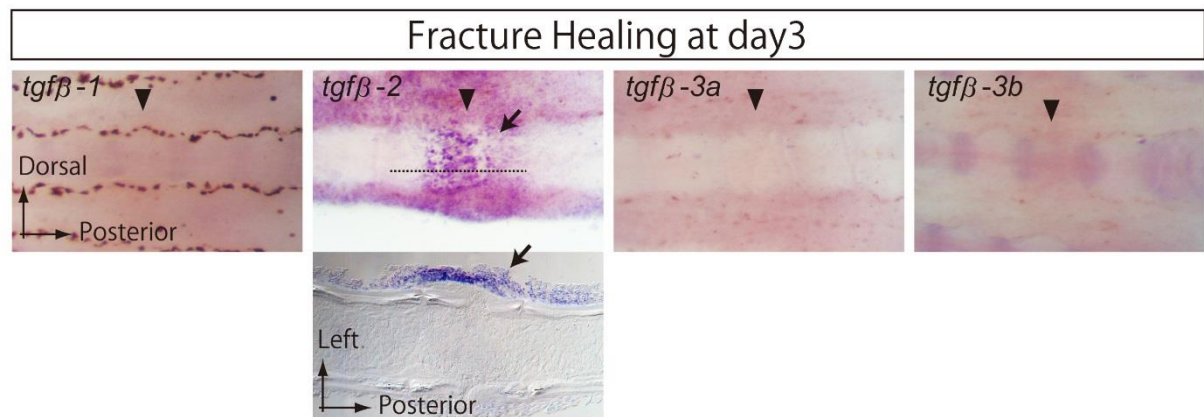
Fig. 3-3 MT1-MMP による TIMP-2 を介した MMP-2 の活性化

文献[99]をもとに作製



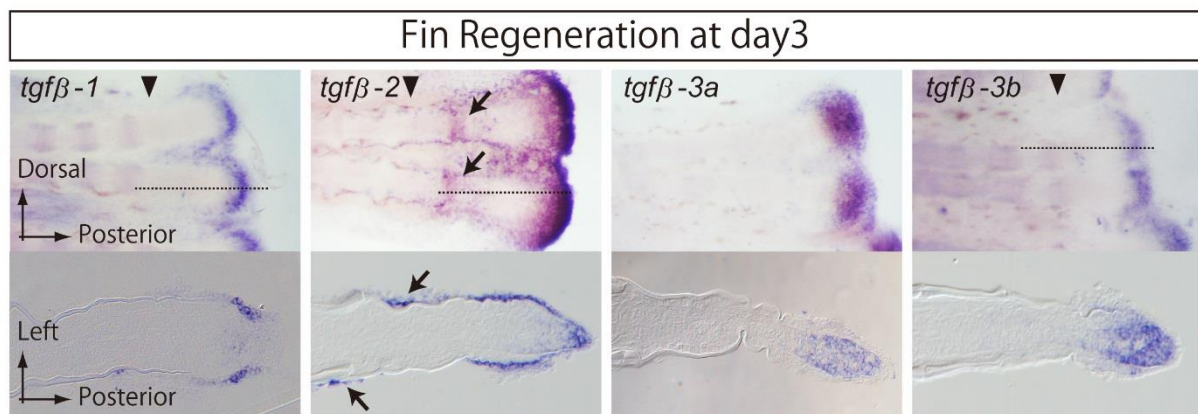
膜型の MMP である MT1-MMP は細胞膜上に局在する。亜鉛を保持している活性中心に組織内因性 MMP 阻害因子 2(TIMP-2)が結合すると、MT1-MMP は不活性型となる。分泌型 MMP である MMP-2 は前駆体として分泌されており、ヒンジ領域を介して、TIMP-2 と MT1-MMP の複合体に結合する。TIMP-2 に対して十分量の活性型 MT1-MMP が存在しているとき、細胞膜上の活性型 MT1-MMP が MMP-2 前駆体の不活性化領域を分解し、活性型 MMP-2 として放出する。

Fig. 3-4 骨折修復過程での TGF β mRNA の発現



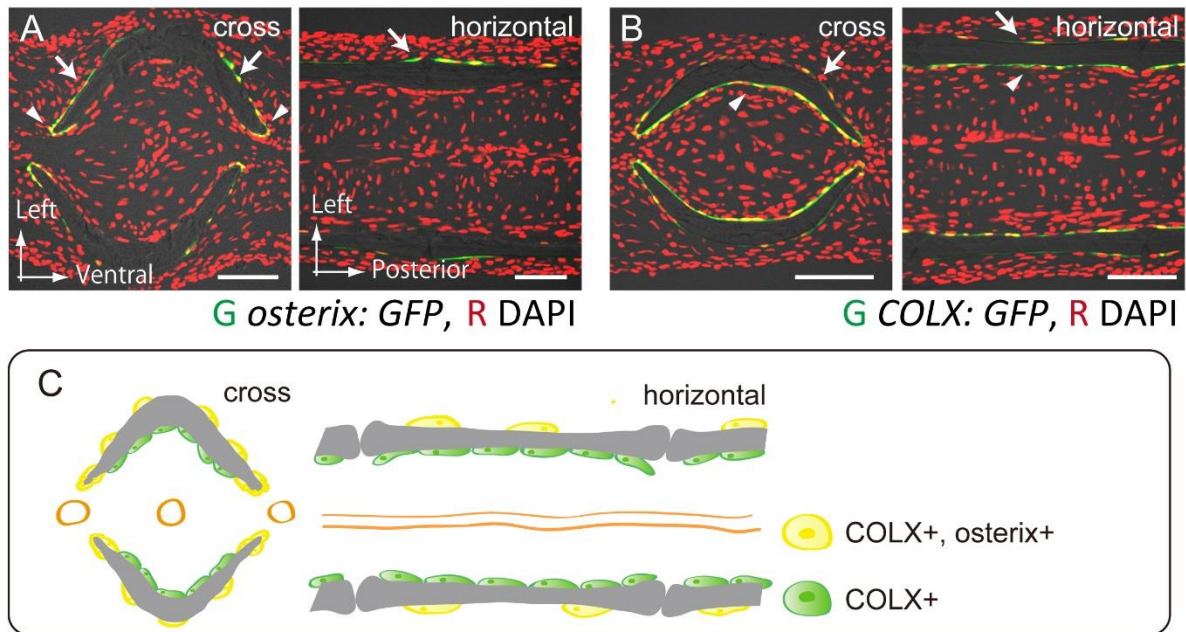
骨折後 3 日目における、4 つのメダカ TGF β アイソフォーム(TGF β -1, TGF β -2, TGF β -3a, TGF β -3b)の RNA in situ hybridization による発現解析。骨折箇所を矢頭で、破線箇所で作製した水平面切片を下に示している。4 つのアイソフォームのうち、TGF β -2 の発現のみが骨折部分で検出された。TGF β -2 は鰭条の外側表面で発現していた(矢印)。

Fig. 3-5 ヒレ再生過程での TGF β mRNA の発現



ヒレ切断後 3 日目における、4 つのメダカ TGF β アイソフォームの RNA in situ hybridization による発現解析。切断面を矢頭、破線箇所で作製した水平切片を下に示している。いずれの TGF β アイソフォームも、再生組織の先端に形成される再生芽において発現が検出されたが、TGF β -2 のみが骨形成領域でも発現していた。骨形成領域での TGF β -2 発現細胞は鰭条の外側表面に局在していた(矢印)。

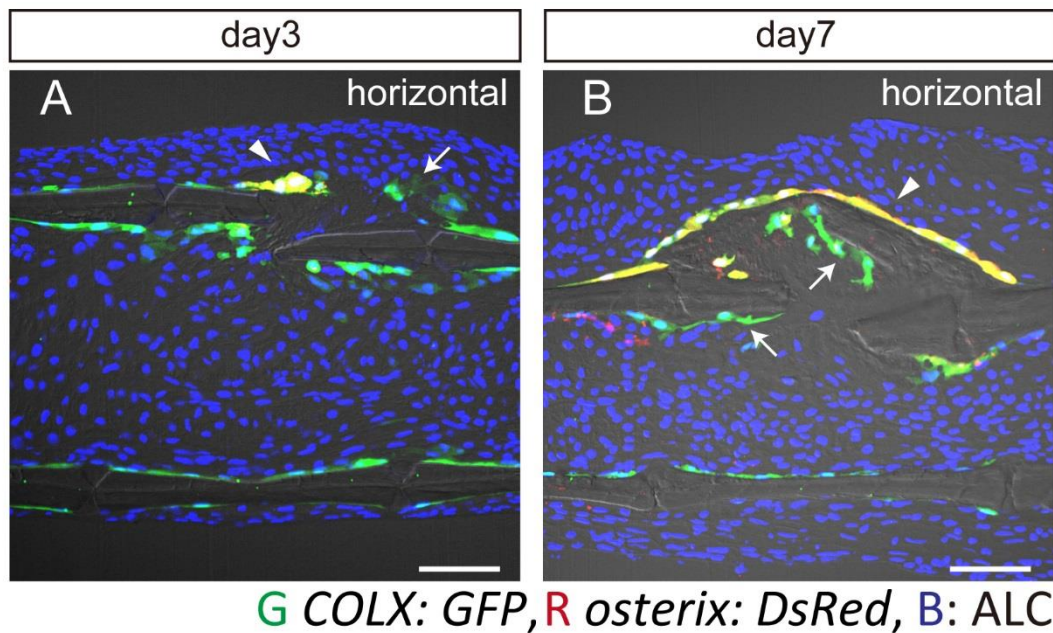
Fig. 3-6 メダカ尾ヒレにおける骨芽細胞の局在



- (A) Tg (*osterix: GFP*)の鰭条の横断面切片(cross)と水平面切片(horizontal)。核を DAPI で染色し、赤で示した。*osterix* 陽性骨芽細胞は鰭条の縁に多く局在し(矢頭)、鰭条の外側表面にも点在していた(矢印)。
- (B) Tg (*COLX: GFP*)の鰭条の横断面切片(cross)と水平面切片(horizontal)。核を DAPI で染色し、赤で示した。*COLX* 陽性細胞は鰭条の内側を覆うように局在していた(矢頭)。また、鰭条の外側表面にも点在していた(矢印)。
- (C) 鰭条における骨芽細胞局在の模式図。鰭条の内側には *COLX* 単独陽性の未熟骨芽細胞が局在し、鰭条の縁と外側表面には *osterix* と *COLX* 共陽性の骨芽細胞が局在している。

スケールバーはそれぞれ 50 μ m (A, B)を示す。

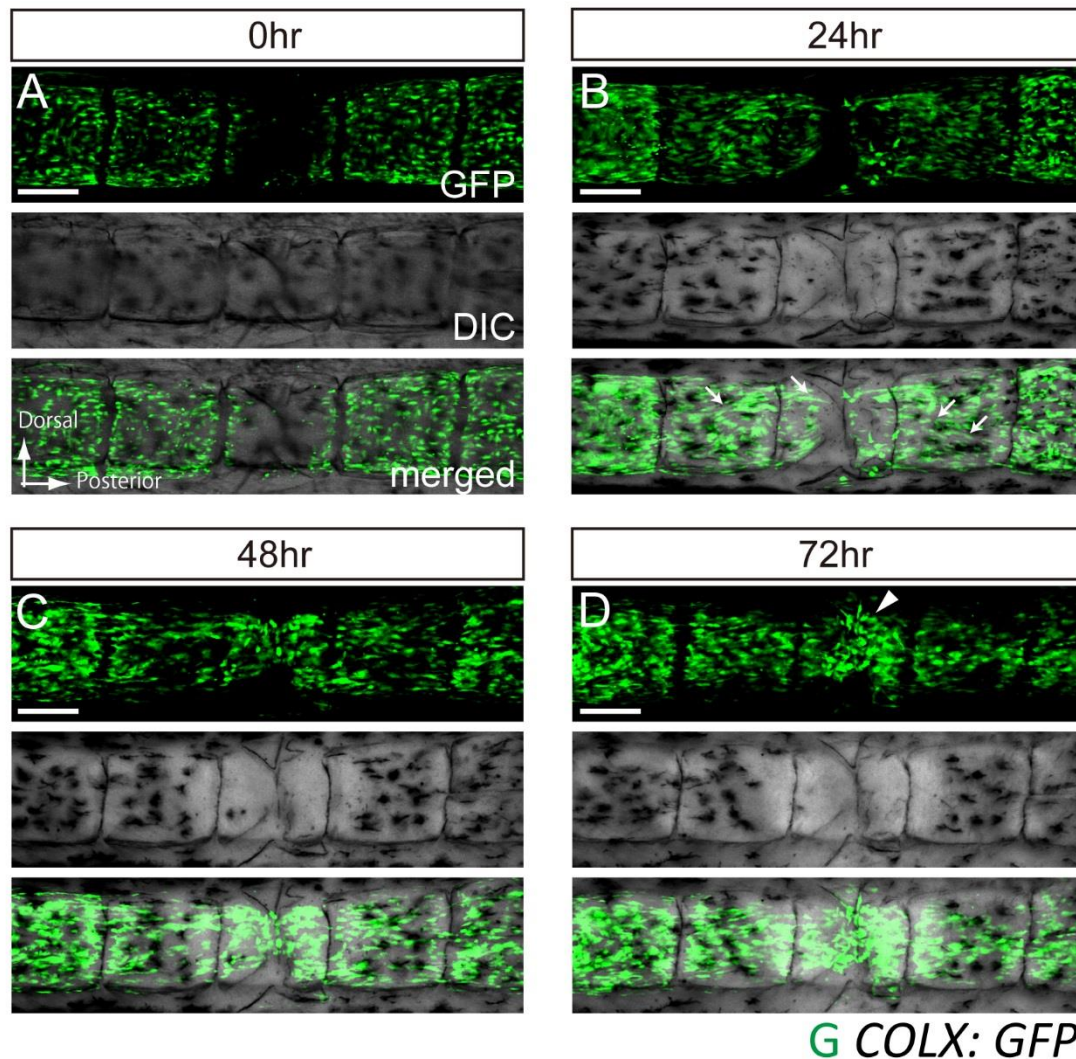
Fig. 3-7 骨折修復過程での骨芽細胞の局在



- (A) 骨折後 3 日目における、Tg (COLX: GFP, osterix: DsRed)の水平面切片。COLX 陽性細胞は、骨折部を円弧状に覆っていた(矢頭, 矢印)。そのうち、骨折した骨端部分では osterix 陽性の細胞が観察できた(矢頭)。
- (B) 骨折後 7 日目における、Tg (COLX: GFP, osterix: DsRed)の水平面切片。仮骨形成が鰭条の外側方向に見られる。COLX と osterix を共発現した細胞は骨形成が生じている仮骨の外側表面に局在した(矢頭)。鰭条の内側で見られたほとんどの骨芽細胞は COLX 単独陽性であった(矢印)。

スケールバーはそれぞれ 50 μm を示す。

Fig. 3-8 骨折部への骨芽細胞の移動

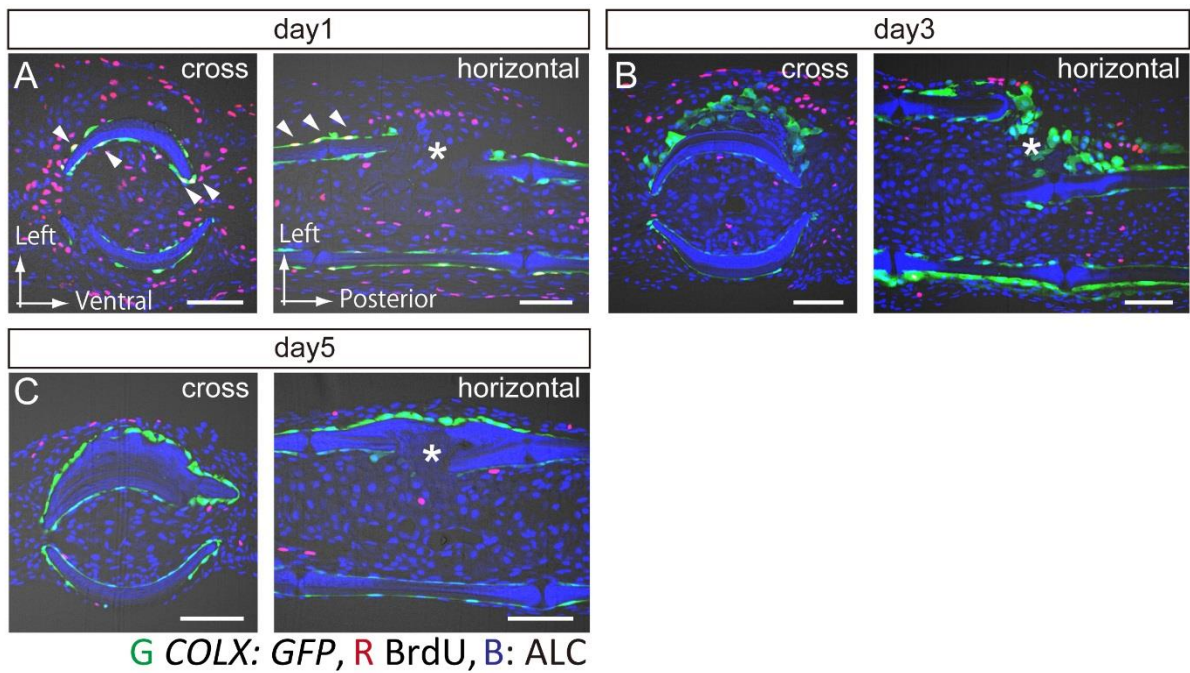


動画データ(報文目録 2 参照)の 4 つの時刻での COLX 陽性骨芽細胞の局在。

- (A) 骨折後 0 時間。COLX 陽性骨芽細胞は鰭条の外側表面と内側表面に局在していた。また、それらは丸い形状をしていた。
- (B) 骨折後 24 時間。骨折部に近い COLX 陽性細胞の形状は骨折部に向かい細長く伸びていた。
- (C) 骨折後 48 時間。骨折部での骨芽細胞の数は徐々に増加した。また、骨折部の骨芽細胞の形状は丸い形に戻っていた。
- (D) 骨折後 72 時間。骨折部での骨芽細胞の数は徐々に増加した。移動してきた骨芽細胞は、骨断片上にも存在していた(矢頭)。

スケールバーはそれぞれ 100 μm を示す。

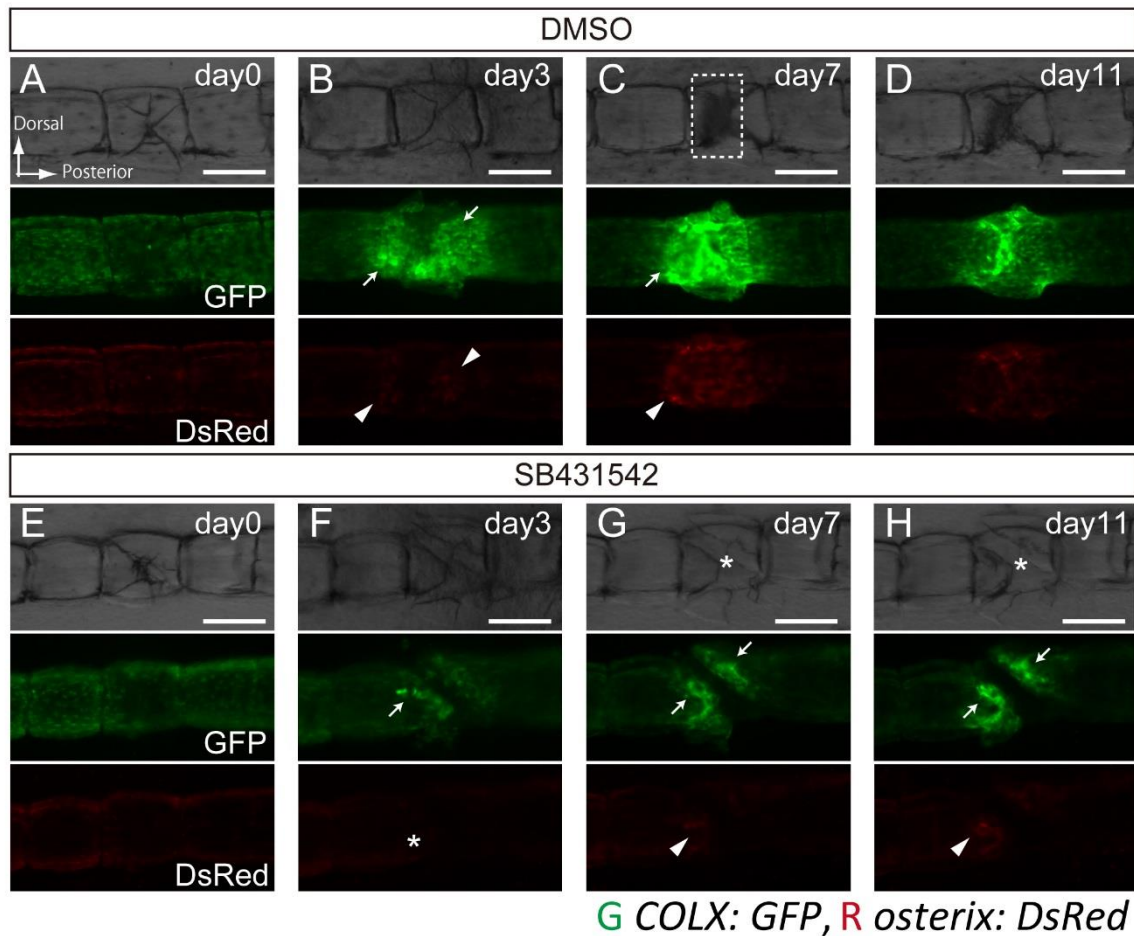
Fig. 3-9 骨折修復過程での細胞増殖



骨折修復過程での Tg (COLX: GFP) の BrdU 取り込み。BrdU を抗体染色で検出し、赤で示した。アスタリスクで骨折箇所を示している。

- (A) 骨折後 1 日目。BrdU 陽性細胞は、上皮や間充織などで多く見られ、骨表面の細胞で BrdU を取り込んでいる細胞は少数であった。BrdU を取り込んでいる COLX 陽性細胞も検出されたが(矢頭)、骨折箇所では見られなかった。
- (B) 骨折後 3 日目。BrdU 陽性細胞の数は 1 日目に比べ減少した。上皮や間充織の細胞で BrdU を取り込む細胞も見られたが、BrdU を取り込む COLX 陽性細胞は検出されなかった。
- (C) 骨折後 5 日目。BrdU 陽性細胞は骨折組織でほとんど検出されなかった。
- スケールバーはそれぞれ 50 μm を示す。

Fig. 3-10 TGF β 阻害下での未熟骨芽細胞遊走と分化の解析

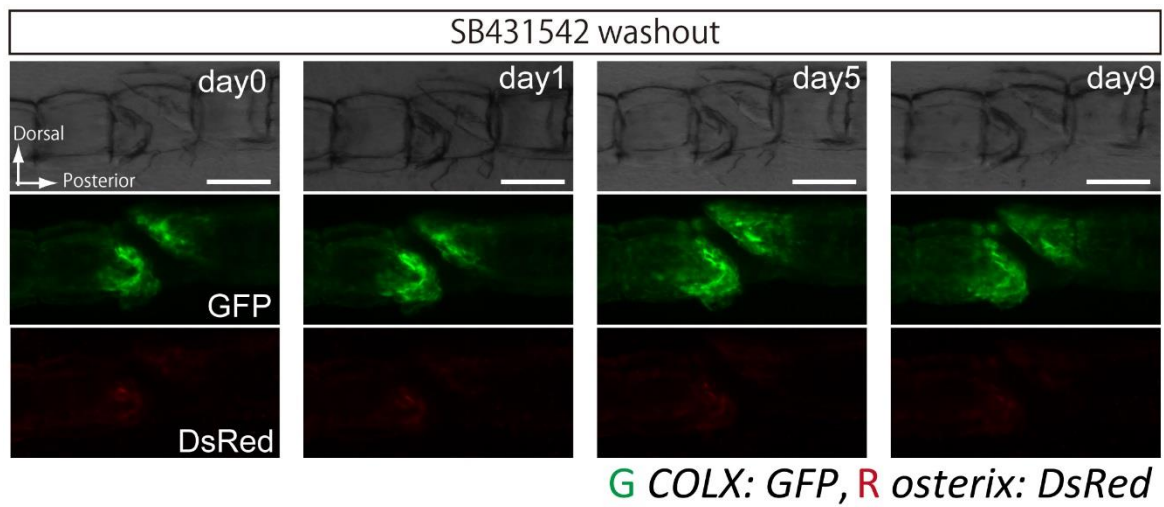


(A-D) コントロール群での Tg (COLX: GFP, osterix: DsRed)の蛍光画像。0 日目において、COLX 単独陽性細胞は鰭条内部を覆うように局在していた。一方で、COLX と osterix の共陽性細胞は鰭条外側に点在していた。骨折後 3 日目において、骨折部において COLX 陽性細胞の数が増加し(B, 矢印)、一部の細胞は osterix を発現していた(B, 矢頭)。骨折後 7 日目において、新たに形成された仮骨が観察できた(破線)。骨折部における COLX 陽性細胞がさらに増加し(C, 矢印)、ほとんどが osterix 陽性であった(C, 矢頭)。骨芽細胞の数は骨折後 11 日目において減少していた。

(E-H) 阻害剤処理群における蛍光画像。0 日目では、コントロール群と違いは見られなかったが、骨折後 3 日目において、骨折部での COLX 陽性細胞が減少していた。わずかな COLX 陽性骨芽細胞は骨折した骨端部分に局在していたが(F, 矢印)、それらは osterix 陰性であった(F, アスタリスク)。骨折後 7 日目において、骨端部分での COLX 陽性細胞は増加し(G, 矢印)、一部は osterix 陽性になったが(G, 矢頭)、新たな骨形成は観察できなかった(アスタリスク)。骨折後 11 日目において、COLX 陽性細胞と osterix 陽性細胞は引き続き増加していたが(H, 矢印, 矢頭)、新たな骨形成は見られなかった。

スケールバーはそれぞれ 100 μ m を示す。

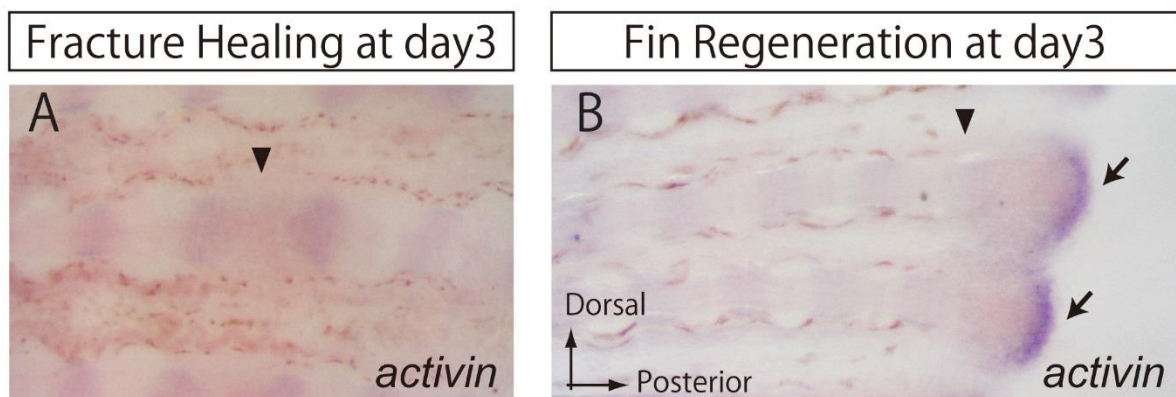
Fig. 3-11 TGFβ阻害停止後の未熟骨芽細胞の遊走と分化



骨折後 11 日目で薬剤処理を停止した Tg (COLX: GFP, osterix: DsRed) の蛍光画像。薬剤処理後 9 日たっても、COLX 発現も osterix 発現も大きな変化は見られず。新たな骨形成は観察されなかった。

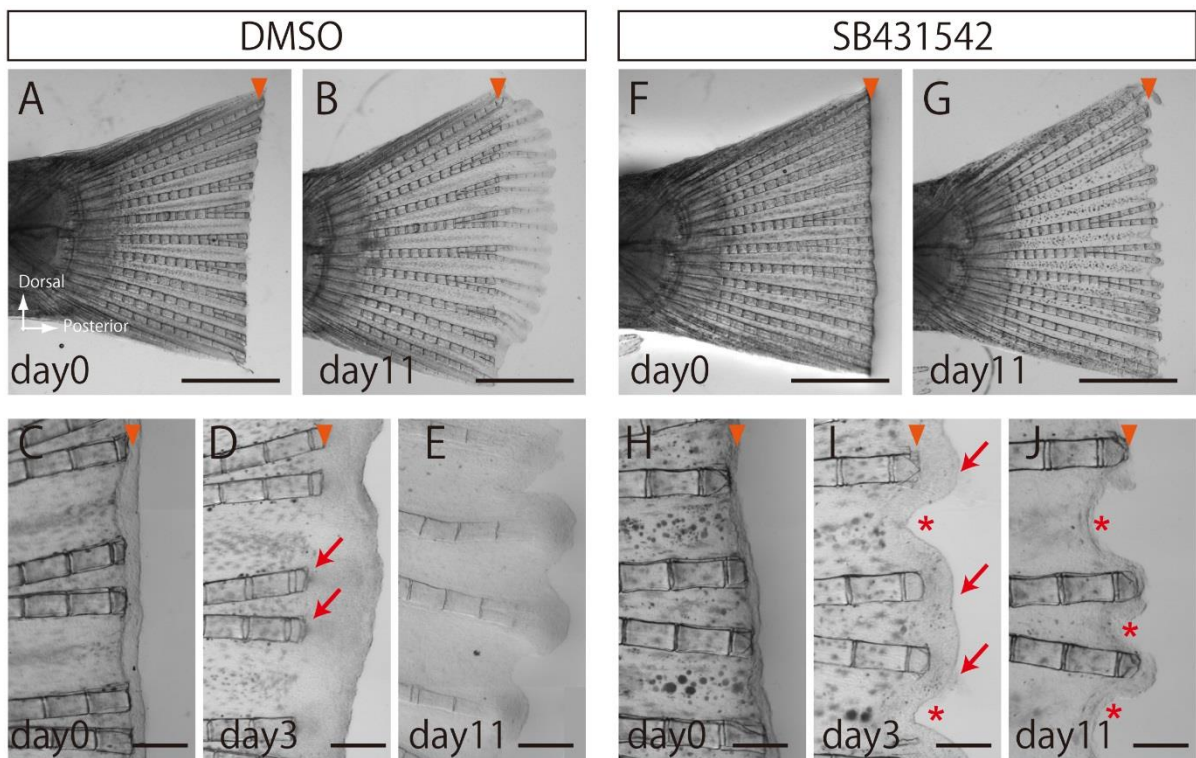
スケールバーはそれぞれ 100 μm を示す。

Fig. 3-12 骨折修復とヒレ再生における activin mRNA の発現



- (A) 骨折修復 3 日目における activin の RNA in situ hybridization による発現解析。骨折修復では activin の発現は検出できなかった。
- (B) ヒレ再生 3 日目における activin の RNA in situ hybridization による発現解析。再生芽において activin の発現が検出された(矢印)。

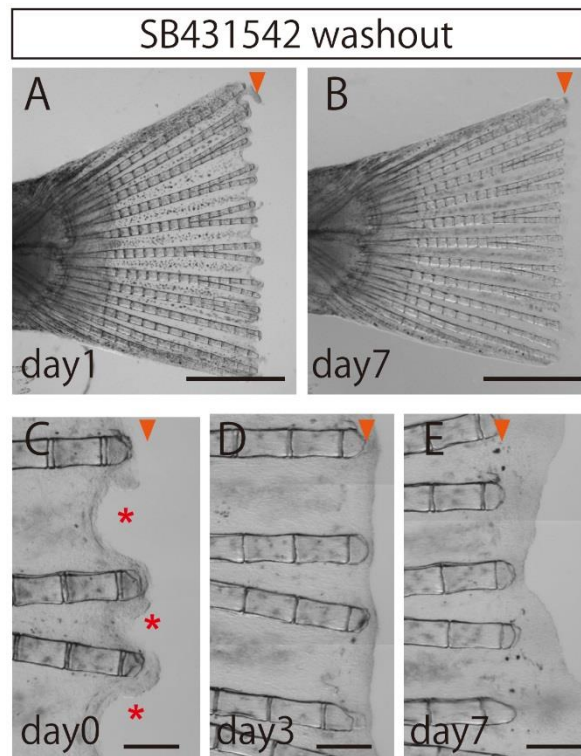
Fig. 3-13 activin 阻害によるメダカヒレののこぎり状再生



- (A-B) コントロール群における、切断直後のヒレと切断後 11 日目のヒレ。切断後 11 日目においてヒレの再生が起こっていた。
- (C-E) コントロール群における、切断直後、3 日目、11 日目の拡大画像。切断後 3 日目において、切断面から間充織が伸び、再生芽が形成された。鰭条の切断面からは、新たに形成された骨組織が観察された(D, 矢印)。再生された鰭条は徐々に伸張し、切断後 11 日目において、失われた組織の半分程度を回復した。
- (F-G) 阻害剤処理群における、切断直後のヒレと切断後 11 日目のヒレ。切断後 11 日目において、ヒレの再生が起こらず、のこぎり状のギザギザの形状になった。
- (H-J) 阻害剤処理群における、切断直後、3 日目、11 日目の拡大画像。切断後 3 日目において、切断面の鰭条に蓋をするように間充織が覆っていた(I, 矢印)。それに伴い、鰭条間領域の間充織は陥没し(I, アスタリスク)、のこぎり状のギザギザの形状になった。切断後 11 日目において、鰭条間領域の陥没はより顕著になった(J, アスタリスク)。このとき、新たな骨組織の形成は確認できなかった。

矢頭で切断面を示している。スケールバーはそれぞれ 100 μm を示す。

Fig. 3-14 activin 阻害停止後のヒレ再生の回復

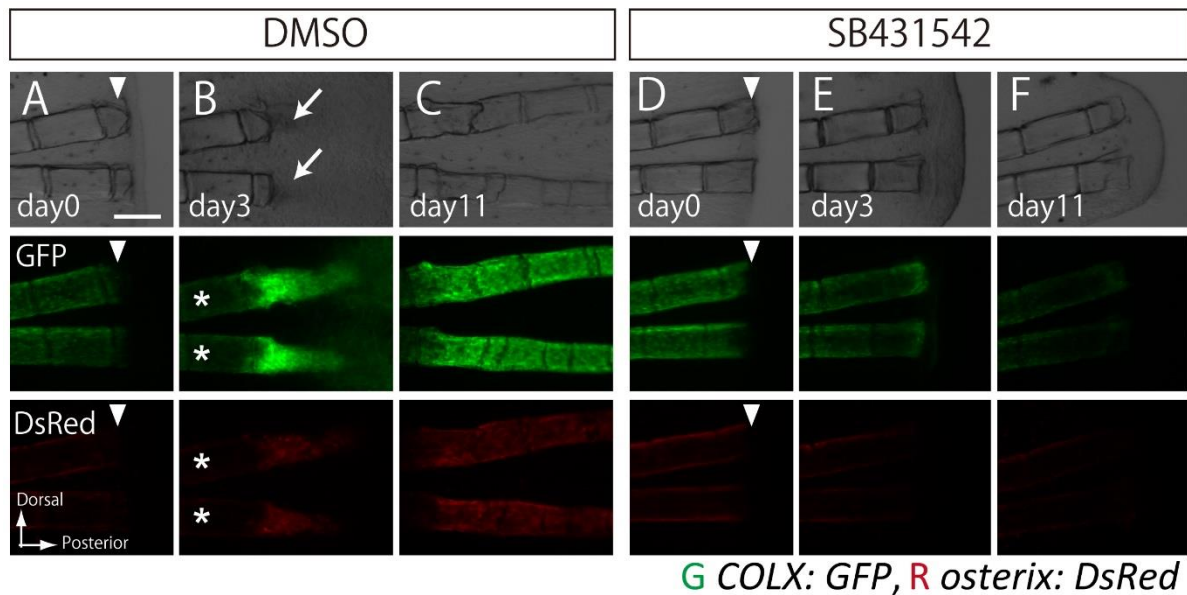


(A-B) 薬剤処理停止直後と薬剤処理停止後7日目のヒレ。薬剤処理停止7日目において、それまであったのこぎり状のギザギザの形状は正常に回復したが、鰭条の伸張は観察されなかった。

(C-E) 薬剤処理停止直後、3日目、7日目の拡大画像。薬剤処理停止直後の鰭条間領域の陥没は(C, アスタリスク)、薬剤処理停止3日目において間充織によって埋められ、それまであったのこぎり状のギザギザの形状は正常に回復した。薬剤処理後7日目において、部分的な間充織の伸張は観察できるが、鰭条の伸張と、新たな骨形成は観察できなかった。

矢頭で切断面を示している。スケールバーはそれぞれ 100 μm を示す。

Fig. 3-15 TGFβ阻害下でのヒレ再生

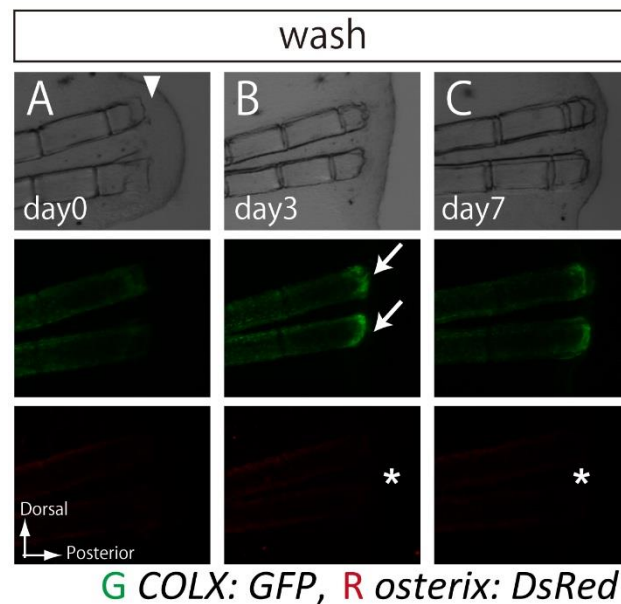


(A-C) コントロール群での Tg (COLX: GFP, osterix: DsRed)の蛍光画像。切断直後において、COLX 単独陽性の未熟骨芽細胞は鰭条の内側に、COLX と osterix 共陽性の骨芽細胞は鰭条の縁と外側表面に局在していた。切断後 3 日目において、切断面の端部側で COLX 陽性細胞が鰭条の伸張方向に局在していた。この中で、切断面に近い側の COLX 陽性細胞は osterix 共陽性であり、新たな骨組織の形成が観察された (B, 矢印)。切断面よりも基部側の骨芽細胞は減少していた (B, アスタリスク)。骨折後 11 日目において、切断面付近では鰭条が再生されていた。

(D-F) 阻害剤処理群での蛍光画像。切断直後の COLX および osterix の発現はコントロール群と大きな変化は見られない。コントロール群では新たな骨組織の形成が起こっている切断後 3 日目において、新たな骨形成は観察されず、11 日目においても同様に骨形成は観察されなかった。また、COLX 発現および osterix 発現は徐々に減少していた。

矢頭で切断面を示した。スケールバーはそれぞれ 100 μm を示す。

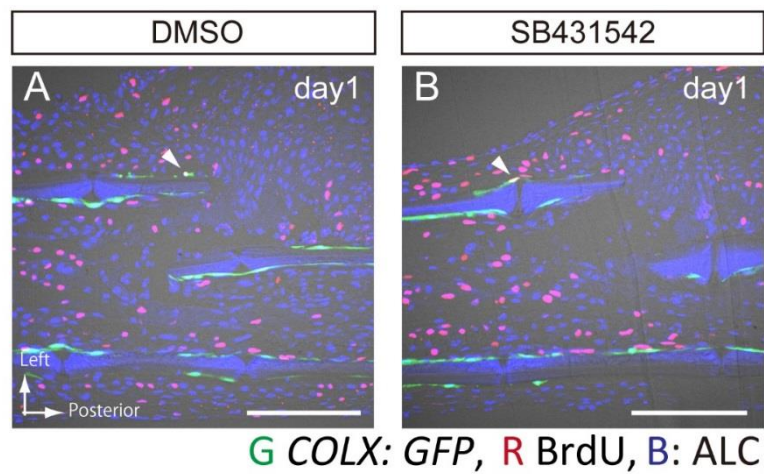
Fig. 3-16 TGF β 阻害停止後のヒレ再生における未熟骨芽細胞の遊走と分化



(A-C) 薬剤処理停止後の Tg (COLX: GFP, osterix: DsRed)の蛍光画像。薬剤処理停止直後は COLX の発現も osterix の発現もわずかししか観察できないが、薬剤処理停止後 3 日目において、切断面の骨端で COLX の発現が増加していた(B, 矢頭)。しかしながら、osterix の発現は観察できず(B, アスタリスク)、新たな骨形成も起こっていなかった。薬剤処理停止後 7 日目においても大きな変化はなく、依然として osterix 発現細胞は観察できなかった(C, アスタリスク)。

矢頭で切断面を示した。スケールバーはそれぞれ 100 μ m を示す。

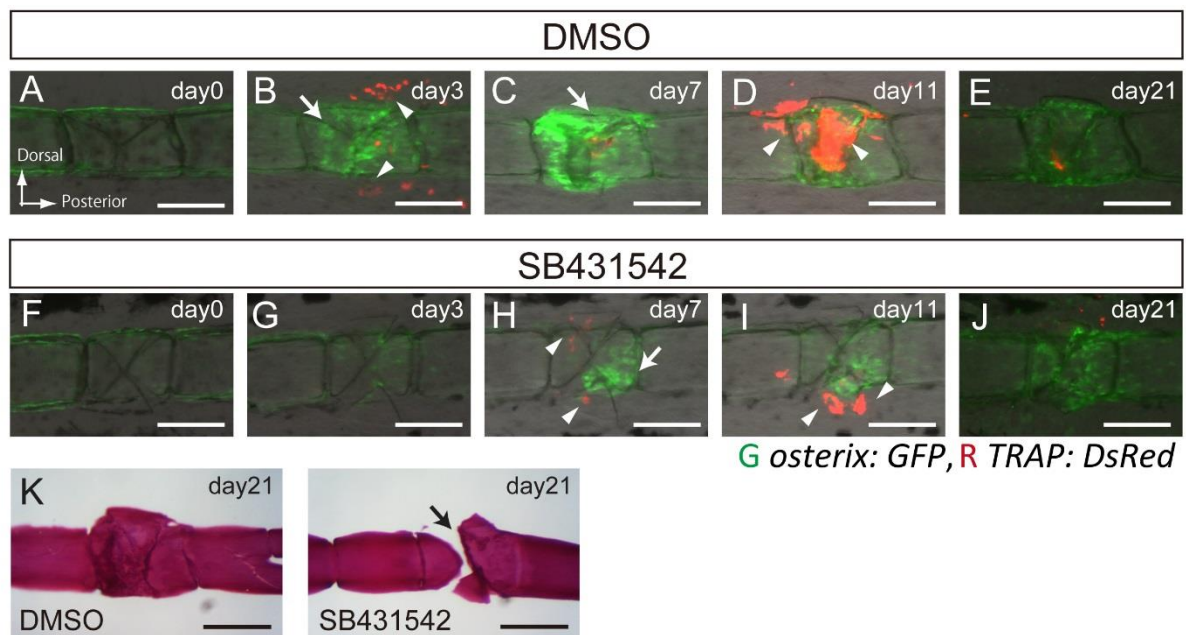
Fig. 3-17 TGFβ阻害下での細胞増殖



(A-B) 骨折修復過程での Tg (COLX: GFP) の BrdU 取り込み。BrdU を抗体染色で検出し、赤で示した。コントロール群と TGFβ阻害剤処理群いずれにおいても、骨折後 1 日目において BrdU 取り込みが検出された。いずれの群でも、少数の COLX 陽性骨芽細胞が骨形成領域と離れた位置で、BrdU を取り込んでいた。

スケールバーはそれぞれ 50 μm を示す。

Fig. 3-18 TGF β 阻害下での破骨細胞と骨芽細胞の誘導



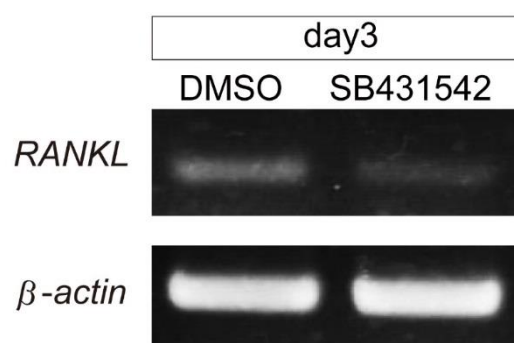
(A-E) コントロール群での Tg (osterix: GFP, TRAP: DsRed)の蛍光画像。0 日目において、破骨細胞は観察されないが、骨折後 3 日目において、骨断片周囲に初期破骨細胞が誘導される(B, 矢頭)。この時、骨芽細胞は骨折部で増加し始めた(B, 矢印)。骨折後 7 日目において、骨芽細胞が仮骨を覆い、骨形成を行っていた(C, 矢印)。骨芽細胞の数は徐々に減少し、骨折後 11 日目では、後期破骨細胞による仮骨のリモデリングが観察された(D, 矢頭)。後期破骨細胞は、骨折後 21 日目ではほぼ消失していた。

(F-G) 阻害剤処理群における蛍光画像。0 日目では、コントロール群との違いは見られなかったが、骨折後 3 日目において、骨折部での骨芽細胞がコントロールに比べ減少していることに加え、初期破骨細胞誘導が起こらなかった。骨芽細胞は徐々に増加し、骨折後 7 日目において骨端付近で観察できた(H, 矢印)。また、この時、破骨細胞が骨断片周辺で観察できた(H, 矢頭)。破骨細胞は徐々に増加し、骨折後 11 日目において、骨断片を吸収していた(I, 矢頭)。破骨細胞の数は徐々に減少し、骨折後 21 日目ではほぼ消失していた。骨折後 21 日目においても、骨折部での骨芽細胞は少ないままで、新たな骨形成も観察できなかった。

(K) 骨折後 21 日目における骨軟骨染色画像。コントロール群では、骨折部はつながり、仮骨は丸みを帯びている。一方で、阻害剤処理群では、骨形成が起こらず、骨折した骨は繋がっていないかった(矢印)。この時、骨折による骨断片は、丸みを帯びていた。

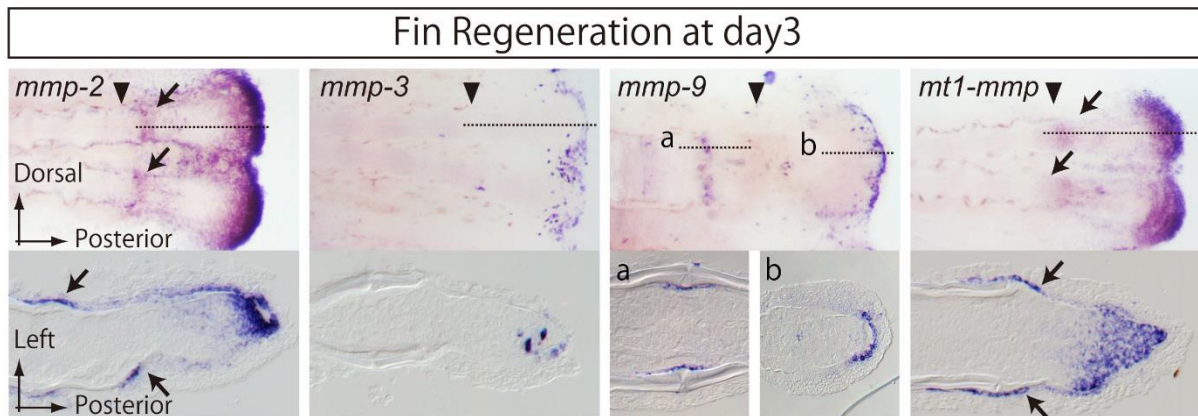
スケールバーはそれぞれ 100 μ m を示す。

Fig. 3-19 TGF β 阻害下での RANKL 発現の半定量 RT-PCR による解析



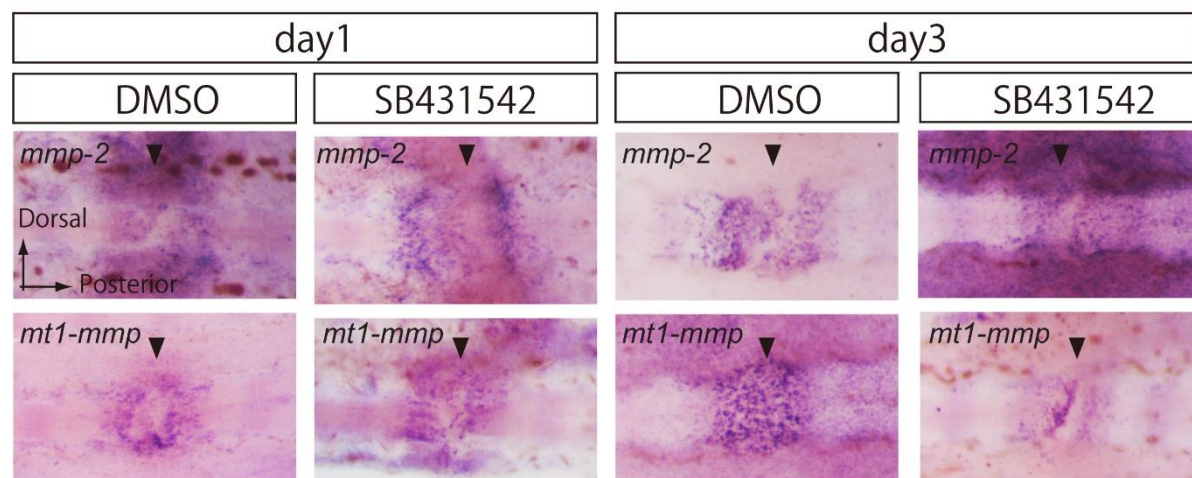
骨折後 3 日目における、RANKL 発現の比較。阻害剤処理群において、コントロール群に比べ RANKL 発現が著しく減少していた。

Fig. 3-21 ヒレ再生過程での MMP mRNA 発現



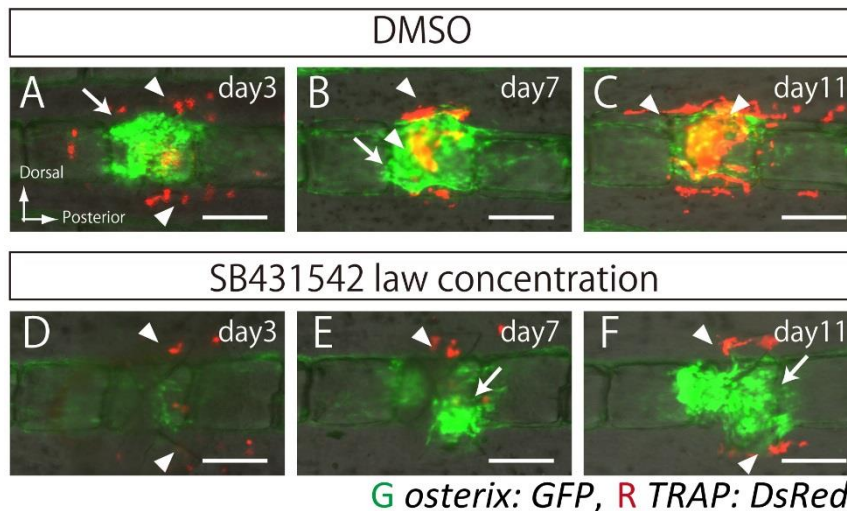
ヒレ切断後 3 日目における、TGFβ活性化に関わる 4 つの MMP(MMP-2, MMP-3, MMP-9, MT1-MMP)の RNA in situ hybridization による発現解析。切断面を矢頭で示し、破線箇所で作製した水平面切片を下に示している。いずれの MMP も再生芽において発現が検出されたが、このうち MMP-2 と MT1-MMP のみが骨形成領域の鰭条外側表面で発現していた。また、MMP-9 の発現が鰭条の節で観察できた。

Fig. 3-22 TGF β 阻害下での MMP mRNA 発現



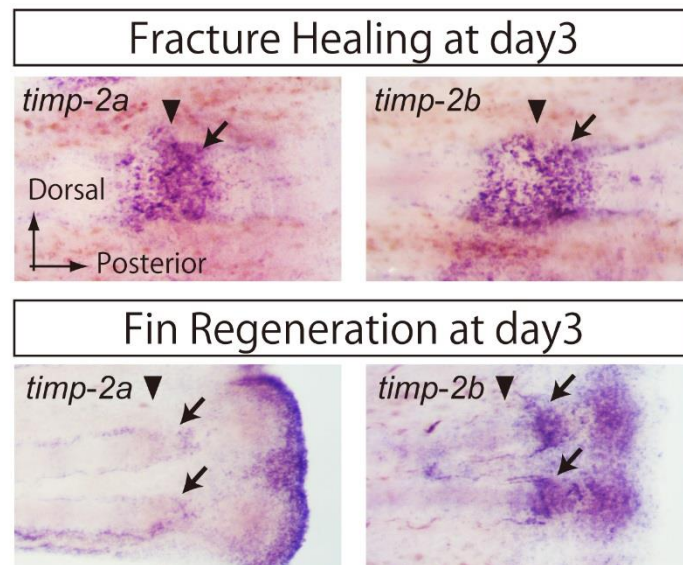
骨折修復 1 日目と 3 日目における、TGF β 阻害下での MMP-2 と MT1-MMP の RNA in situ hybridization による発現解析。骨折後 1 日目において、コントロール群と阻害剤処理群いずれにおいても、MMP-2 と MT1-MMP の発現が骨折した鰭条の骨端部で検出できた。骨折後 3 日目においては、コントロール群において、MMP-2 と MT1-MMP 発現細胞は骨折部を覆っていた。一方で、阻害剤処理群においては、MMP-2 と MT1-MMP の発現は骨折した鰭条の骨端部でのみ検出された。

Fig. 3-23 低濃度 TGF β 阻害剤処理での破骨細胞と骨芽細胞の誘導



- (A-C) コントロール群における Tg (osterix: GFP, TRAP: DsRed)の蛍光画像。骨折後 3 日目において、骨折部における osterix 陽性骨芽細胞が増加し始めた(A, 矢印)。初期破骨細胞は骨断片に集まっていた(A, 矢頭)。骨折後 7 日目において、骨芽細胞により仮骨が形成し(B, 矢印)、鰭条の内外からは後期破骨細胞が誘導され始めていた(B, 矢頭)。骨折後 11 日目において、仮骨を形成した骨芽細胞は減少し、後期破骨細胞が仮骨を覆っていた(C, 矢頭)。
- (D-F) 阻害剤低濃度処理群における、蛍光画像。骨折後 3 日目において、コントロールに比べ osterix 陽性骨芽細胞誘導が著しく減少していた。初期破骨細胞は骨断片に集まっていた(D, 矢頭)。骨折後 7 日目において、骨折部の一部において osterix 陽性骨芽細胞が誘導され、骨形成を行っていた(E, 矢印)。骨芽細胞の数はコントロールに比べ少なく、骨折部全体を覆う局在は見られなかった。この時、一部の初期破骨細胞が骨断片に残っていた(E, 矢頭)。骨折後 11 日目において、骨芽細胞の数は増加したが、骨折部全体を覆う細胞局在は観察できず、骨折部でくびれたようないびつな仮骨を形成していた(F, 矢印)。後期破骨細胞は、骨断片周囲に集まり骨吸収を行っていた(F, 矢頭)。

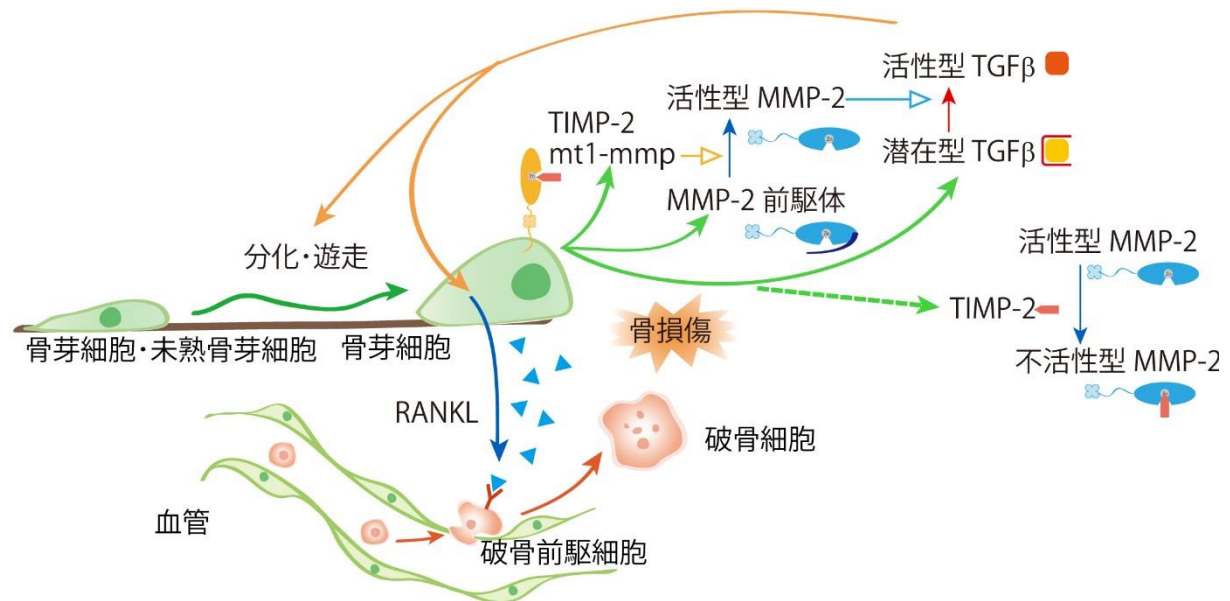
Fig. 3-24 骨折修復およびヒレ再生における TIMP-2 mRNA の発現



骨折修復 3 日目および、ヒレ切断 3 日目における、2 つのメダカ TIMP-2 (TIMP-2a, TIMP-2b) の RNA in situ hybridization による発現解析。骨折部位またはヒレ切断面を矢頭で示している。骨折修復においてもヒレ再生においても、TIMP-2a と TIMP-2b は骨形成領域で発現していた(矢印)。ヒレ再生モデルにおいては、再生芽部分でも発現が検出された。

Fig. 3-25 MMP による位置特異的 TGF β の活性化と細胞誘導

本章の結果をもとに作製



骨損傷の起こった箇所では、骨芽細胞が TGF β -2、MT1-MMP、MMP-2、TIMP-2 を発現する。膜型の MMP である MT1-MMP は TIMP-2 を介して、損傷部位での活性型 MMP-2 濃度を増大させる。骨折部から離れた場所では TIMP-2 の働きで MMP-2 は不活性化する。骨折部の活性型 MMP-2 は潜在型 TGF β -2 を活性型 TGF β -2 に代謝し、これにより活性型 TGF β の濃度勾配が生じる。TGF β -2 のシグナルを受けた骨芽細胞は骨折部に向かい移動し、分化する。また、TGF β シグナルにより RANKL 発現が促進され、骨折部に近くの血管周囲で破骨細胞の分化が起こる。

第 4 章 結言

骨は、われわれ脊椎動物を象徴する器官であり、骨格としての働きだけでなく、様々な生理現象に関与している。そのため、骨の疾患は重要な問題として研究されている。骨代謝に関わる細胞はすべて骨の疾患に関与しており、細胞制御メカニズムの解析は骨の疾患研究に大いに役に立つと考えられる。

真骨魚類に属するメダカは、発生生物学の実験モデルとして昔から利用されている。魚類を用いた研究では、細胞を生きたまま観察ができること、そして、組織形成が観察できるという利点がある。本博士論文研究では、このようなメダカの利点を利用して、骨代謝研究に取り組んだ。

第 2 章において、メダカを用いた骨折修復を生きたまま解析する系を確立した。骨芽細胞と破骨細胞に注目し、細胞の由来や分化を明らかにすることに成功し、この実験系が骨代謝研究の実験系として有用であることを示した。この実験系を用い、第 3 章において、骨代謝の重要な制御因子の一つである $TGF\beta$ の機能解析を行った。その結果、 $TGF\beta$ アイソフォームの一つである $TGF\beta$ -2 の特異的な働きが示された。さらに、これまで知られていなかった、 MMP による特異的細胞誘導制御メカニズムを示唆する結果を得た。

メダカとヒトは違う動物であるが、多くの相同な遺伝子が存在し、類似した生命現象に支配されている。メダカを用いて明らかになった本論文での研究成果が、今後の科学の発展の礎の一つとなれば幸いである。

第 5 章 実験手法

5.1. 実験動物と飼育方法

実験動物はメダカ(*Oryzias Latipes*)の近郊系系統 Cab を用いた。成魚および幼魚の飼育水は、活性炭フィルターで塩素除去をした水道水を用いた。飼育装置は濾過槽のついた循環系を使用し、照明は明 14 時間、暗 10 時間の周期、水温はヒーターで 28°C に保つことで一年中、採卵できる状態に保った。給餌は一日 2~3 回とし、成魚にはブラインシュリンプ、おとひめ B1(日清飼料)、幼魚にはスーパー鮎ゴールド 0 (オリエンタル酵母工業株式会社)を与えた。メダカ胚は採卵後、28°C の恒温器におき、適宜顕微鏡下で観察した[106]。

5.2. 尾ヒレの骨折

専用のガラス針を作製し、尾ヒレの骨組織である鰭条の片側を顕微鏡下で骨折させた。鰭条を骨折する際、血管などその他の組織は傷つけずに、骨組織単独の破壊を行った(Fig. 2-5C)。骨折箇所は一度目の枝分かれから 2 つめの部分とした。ガラス針は、マイクロインジェクション用ガラスキャピラリー (GD1, Narishige)を、ガラスキャピラリー作成器 (PC-10, Narishige)を用いて HEATER LEVEL 58.5 で引き延ばし、先端部をおよそ 30 μm に削り作製した。実験には 3~6 ヶ月齢の成魚を使用し、28°C の恒温器の中に静置した水槽の中で飼育した。

5.3. 尾ヒレの再生

メスを用いて枝分かれから先端方向に節二つ分の位置でヒレを切断した。実験には 3~6 ヶ月齢の成魚を使用し、28°C の恒温器の中に静置した水槽の中で飼育した。

5.4. 阻害剤と活性化剤の処理

COX-2 発現活性化剤処理

12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA, Cayman)を 1 mg/ml の濃度で DMSO に溶解し、TPA ストック溶液として-20°C で保存した。ふ化後 3 日の稚魚を、TPA ストック溶液を 50

ng/ml で溶かした飼育水中で 1 時間静置した。薬剤処理後、4% PFA で固定し in situ hybridization または cDNA 合成を行った。Tg (COX-2: GFP)を用いた観察に関しては、GFP の発現誘導を観察するため、5 ng/ml で TPA 処理し、12 時間後に蛍光顕微鏡で観察を行った。

cox2 阻害剤処理

CAY10404 (Cayman)を 100 mM の濃度で DMSO に溶かし、CAY10404 ストック溶液として -20°C で保存した。CAY10404 ストック溶液を 10 μ M の濃度で飼育水に溶かし、骨折した成魚を飼育した。薬剤処理は骨折の一日前から行い、水替えおよび給餌は 1 日 1 回行った。

TGF β 阻害剤処理

SB431542 (Cayman)を 100mM の濃度で DMSO に溶かし、SB431542 ストック溶液として -20°C で保存した。SB431542 ストック溶液を、10 μ M または 1 μ M の濃度で飼育水に溶かし、骨折またはヒレを切断した成魚を飼育した。薬剤処理は骨折またはヒレ切断の一日前から行い、水替えおよび給餌は 1 日 1 回行った。特に断りがない限り 10 μ M 処理の結果を実験結果に示す

5.5. 遺伝子のクローニング

DNA 組み換え実験は一般的な方法を用い、詳細はここでは記述しない。メダカ cDNA ライブラリーは、稚魚、成魚頭部、または成魚尾ヒレをホモジェナイズし、ISOGEN (Nippon Gene)を用いて total RNA を精製した後、cDNA synthesis kit (TAKARA)を用いて cDNA 合成し、遺伝子のクローニングのテンプレート DNA として使用した。それぞれの操作は、kit 付属のプロトコールに従った。

遺伝子の断片をクローニングするためのプライマー設計は Ensemble genome browser を参考に行った。使用したプライマーは表に示す (Table 5-1)。ヒト、マウス、ゼブラフィッシュなどの塩基配列を基に、メダカにおける目的遺伝子のアミノ酸配列の相同性を確かめた。設

計したプライマーを用いて、PCR を行い目的の配列を増幅した。PCR は、94°C 3 分変性の後、(94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分)を 25 回繰り返す、72°C で 3 分熱処理した。適宜、アニーリング温度、サイクル数等の条件は調整した。クローニングには、pBSK+ vector、PCR4 TOPO cloning kit、PCRII TOPO cloning kit、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen)のいずれかを用いた。

5.6. 塩基配列の決定

シーケンサーは CEQ2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter)、ABI sequencer (Applied Biosystem)を使用した。シーケンス反応はダイターミネーター法を用いた。M13 プロモーター下流に目的の遺伝子が導入されているプラスミド 1 µg に対し、5x buffer (ABI)、M13 primer 1µl、BigDye (ABI) 1µl を加え、H₂O で 10µl とし PCR を行った。PCR は 96°C で 1 分間変性した後、(96°C 30 秒、50°C 15 秒、60°C 4 分)の条件で 25 回行った。得られたサンプルは、IPA 沈殿により回収し、75% IPA で洗浄した後、Hidi formamide (ABI) 12µl に溶解し、シーケンサーで配列を解析した。得られた塩基配列は、配列解析ソフト(Genetics)を用いて、各塩基配列断片の連結処理および塩基配列からアミノ酸配列への変換を行い、解析した。

5.7. 半定量 RT-PCR

目的の組織をホモジェナイズし、遺伝子のクローニングと同様の方法で cDNA 合成を行った。テンプレートの RNA は分光光度計で定量して、約 2 µg を使用した。逆転写には cDNA synthesis kit (Takara)を用い、random 6mer による cDNA 合成を行った。作製した cDNA は各サイクル数で medaka βactin プライマーを用いて濃度を調整した。プライマーは Ensembl genome browser、または、すでに報告されている論文を参考に、配列中に複数のエキソンを含むように作製した([Table 5-1](#))。PCR は、94°C 3 分変性の後、(94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分)を 20~30 回繰り返す、72°C で 3 分熱処理した。アニーリング温度、サイクル数等の条件は適宜調整した。

5.8. トランスジェニックメダカの作製

pEGFP-1 vector (Contech)および pDsRed express (Contech)を、HindIII と AflII 制限酵素カットし、pBSKI2 vector (Amagen)にマルチクローニングサイトを含んだ EGFP または DsRed を導入した vector を作製した。次に、遺伝子上流域をメダカゲノムより制限酵素認識サイトを付加したプライマーで PCR レクローニングした(Table 5-1)。続いて、付加した制限酵素で配列を切り出し、上述した pBSKI2 vector に導入することで DNA コンストラクトを作製した。COX-2 は遺伝子上流約 3 kbp を(Fig. 2-18A)、FLI1 は遺伝子上流約 4.6 kbp をクローニングした(Fig. 2-21B)。

精製した DNA コンストラクトは 15 ng/ μ l になるようにオートクレーブ水で希釈し、さらに I-SceI 酵素を 10 倍希釈になるように加え、0.1% フェノールレッド(Sigma)で着色して 1 細胞期の受精卵にインジェクションした。インジェクション用の針は GD-1 キャピラリー入りガラス管(Narishige)を、ガラス針作成器(PC-1, Narishige)を用いて、HEATER LEVEL 59.0 で熱し作成した。作製した針に調製した DNA 溶液を入れ、マニピュレーターに装着した。1 細胞期の受精卵を、溝を施した 1%アガロースゲルインジェクション台に設置し、ピストンの空気圧で胚盤にインジェクションを行った。その後、蛍光顕微鏡を用いて、一部の細胞で蛍光を発する個体を選び、飼育し、次世代ですべての細胞のゲノムに組換え遺伝子を含む個体を得た。

5.9. 樹脂切片の作製

成魚尾ヒレ、RNA in situ hybridization で発色を行ったサンプル、BrdU 染色を行ったサンプルを PBS 緩衝 4%パラホルムアルデヒド(4% PFA/PBS)で 4°C 一晚、または、室温 2 時間の条件で固定した。

サンプルを、PBST で室温 5 分間の条件で 4 回洗浄した後、25%、50%、75% EtOH/PBST に置換し、100% EtOH で室温 10 分間の条件で 2 回洗浄し、100% EtOH で室温 3 時間処理し脱水を行った。なお、抗体染色を行わないで、直に蛍光検出を行うサンプルは EtOH 脱水の過程を省略した。脱水後、樹脂溶液(Technovit 8100, Kulzer)に置換し、サンプルが沈

むまで静置した後、再び Technovit 8100 で室温 3 時間静置した。ただし、RNA in situ hybridization を行ったサンプルに関しては室温 5 分間のみ静置した。その後、専用の容器に、重合剤 Hater (Kulzer) 50 μ l と Technovit 8100 1.5ml を混合した包埋液を加え、その中にサンプルを入れフィルムで空気を遮断した後、4°C で一晩静置した。サンプルが固まった後、Technovit 3040 (Kulzer) と Histoblock (Kulzer) を用いてサンプルを抜き取り、水気を取り室温で 3 時間以上静置した。

サンプルを適当な大きさにトリミングした後、厚さ 4~5 μ m で切片にした (Yamato Rom380)。切片は水上で伸ばし、スライドガラス上に固定した。切片をよく乾かし、組織染色などを行った。蛍光染色の際は、グリセロール包埋液 (25mg /ml DABCO, 50%グリセロール) を用いカバーガラスで封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いて観察した。また、有色染色の際には、オイキット (富士理化工業) を用いて切片を封入し、正立顕微鏡 (Zeiss) で観察した。一部のグリセロール包埋液で封入したサンプルは、洗瓶を用い水で洗浄しカバーガラスをはがし、さらに有色染色を行った。

5.10. 組織切片の染色

TRAP 染色

破骨細胞に特異的な酵素である TRAP の活性を赤色で検出する染色方法。切片に TRAP 染色液 (1.5 mM naphthol AS-MX phosphate, 0.5 mM Fast Red Violet LB salt, 20 mM L(+)-tartrate in 0.1M acetate buffer pH 5.2) を数滴垂らし、遮光した湿箱の中に室温で 1 時間静置した。発色が確認されたら dH₂O で洗浄した。

ALP 染色

アルカリホスファターゼ活性を紫色で検出する染色方法。切片に ALP 染色液 (0.1 M Tris-HCl pH9.5, 0.1 M MgCl₂, 0.5 M NaCl, NBT, BCIP) を数滴垂らし、遮光した湿箱の中に室温で 20 分静置した。発色が確認されたら dH₂O で洗浄した。

核染色

蛍光で核を観察する染色方法。0.1~1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI 溶液、または、2.5 μM TOPRO3 溶液を切片に数滴垂らし、遮光した湿箱の中に入れ 30 分間室温で静置した。その後、 dH_2O で洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡での DAPI の観察には 405 nm、TOPRO3 の観察には 655 nm の励起波長を使用した。

メチレンブルー染色

核を青色に染める染色方法。5N KOH を 100ml あたり一滴添加した、0.1% メチレンブルー溶液を切片にマウントし 15 秒ほど静置し dH_2O で洗浄した。

抗体染色

抗体を用いて切片中のタンパク質を検出する方法。切片をトリプシン溶液(0.1% 塩化カルシウム, 0.01% トリプシン)で 37°C 10 分間処理し、PBS で洗浄した。ブロッキング溶液(2% 子ヒツジ血清, 2% ウシ血清アルブミン)で常温 30 分間ブロッキングし、ブロッキング溶液で 1000 倍希釈した抗 GFP ヤギ抗体(Clontech)と抗 DsRed ウサギ抗体(Clontech)で 4°C 一晚処理した。PBS で洗浄した後、ブロッキング液で 1000 倍希釈した抗ヤギ alexa488 付加抗体と抗ウサギ cy3 付加抗体で 4°C 一晚処理した。PBS で洗浄した後、カバーガラスで包埋した。

5.11. Whole-mount BrdU 染色

50 mM の濃度で BrdU (Sigma)を DMSO に溶かし、-20°C で保存した。BrdU ストック溶液を 50 μM BrdU の濃度で飼育水に溶かし、骨折した成魚を固定の 7.5 時間前から処理した。7 時間経過後、飼育水で 30 分間洗浄し、ヒレを切り取り 4% PFA/PBS で 4°C 一晚固定した。PBS 緩衝 0.1% TritonX (PBSx)で洗浄し、MeOH 希釈系列で脱水を行った後、100% MeOH で 4°C 一晚静置した。MeOH 希釈系列で親水化し PBSx に戻した後、ProK 溶液(10 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K, PBSx)で常温 20 分処理し、PBSx で洗浄した後、再び 4% PFA で常温 20 分固定した。

続いて、0.1% TritonX で 1 回洗浄し、塩酸処理溶液(1N HCl, 0.1% TritonX)で 2 回洗浄し、塩酸処理溶液で 37°C 30 分間処理した後、PBSx でただちに洗浄した。ブロッキング溶液(1% ウシ血清アルブミン, PBSx)でブロッキングした後、抗 BrdU ウサギ抗体(Gentex)と抗 GFP ヤギ抗体(clontech)で 4°C 一晩処理した。PBSx で洗浄した後、抗ウサギ cy3 付加抗体と抗ヤギ alexa488 付加抗体で 4°C 一晩処理した。PBSx で洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡で染色を確認してから切片作製を行った。

5.12. 骨の生体染色

ALC 溶液(0.5% Alizarin complexon/ 2% KOH)、または、カルセイン溶液(0.5% カルセイン/ 2% NaOH)を 100 倍の希釈率で飼育水に溶かし、観察の前日に成魚を一晩溶液中で飼育した。観察前に飼育水で 3 時間の洗浄を行った。共焦点レーザー顕微鏡での ALC の観察には、588 nm および 655 nm、カルセインの観察には 488 nm の励起波長を使用した。

5.13. 骨染色

サンプルを 4% PFA/PBS で 4°C 一晩固定した後、PBS 緩衝 0.1% Tween20 (PBST)洗浄し、アルシアンブルー染色液 (0.1% Alcian blue, 70% EtOH, 30% 酢酸)で室温一晩染色した。EtOH 希釈系列を用いて洗浄し親水化した後、H₂O で室温 30 分 2 回洗浄した。その後、トリプシン溶液(0.1%トリプシン, 30% 飽和ホウ酸ナトリウム)を加え、室温で一晩酵素反応を行った。続いて、0.5% KOH に置換し、室温一晩浸透した後、アリザリンレッド染色液 (4% EtOH 飽和 Alizarin Red, 0.5% KOH)に置換し、さらに室温で一晩染色を行った。0.5% KOH 水溶液で溶液が無色透明になるまで繰り返し洗浄し、観察液(50% グリセロール, 0.5% KOH)に置換し、観察を行った。

5.14. 共焦点レーザー顕微鏡による生体の 3D イメージング

成魚を、トリカイン溶液(0.002% 3-amino benzoic acidethylester)で麻酔し、すぐに 1.5% アガロースゲル(Nacalai)を薄層したシャーレに寝かせ、尾ひれに 70°C で融解させ 40°C 程度まで温度を下げた 1.5% 低温融解アガロースゲル(SealPlaque GTG Agarose, Cambrex)を滴

下し包埋した。魚が乾かないようにプレート上をトリカイン溶液で浸し、観察には水深レンズつけた共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, Olympus)を用いた。2~3 μ m の厚さで Z 軸方向に連続的な画像を取得した。取得した画像の立体構築には Fluorender [107]を使用した。

骨芽細胞のタイムラプスイメージング

Tg (osterix: GFP)、および、Tg (COLX: GFP)を使用し、3 時間毎 3 日の間、骨折部位における骨芽細胞の生体観察を行った。サンプルは観察のたびに麻酔をかけ、観察終了後に飼育水に戻した。Photoshop (Adobe)による位置補正を行った後、得られた連続画像から ImageJ により動画を作成した。

5.15. 電子顕微鏡解析

下記の方法で取得した実験データを東京医科歯科大学 高野吉郎 博士より提供して頂いた。

Tg (TRAP: GFP)を用いて、初期破骨細胞または後期破骨細胞を蛍光顕微鏡下で確認した後、0.1M カコジル酸緩衝 4% PFA (pH 7.4)を用い 4°C で一晩固定した。正立顕微鏡で GFP 陽性細胞の位置を確認した後、グルタルアルデヒド固定液(2.5%グルタルアルデヒド 0.1M カコジル酸緩衝)で一晩固定し、さらに酸化オスミウム液(1% 酸化オスミウム, 0.1M カコジル酸緩衝液, 1.5% フェロシアン化カリウム)を用い 4°C で 2 時間処理した。その後、EtOH 希釈系列を用いて、アセトンに置換しエポン樹脂(Taab)に包埋した。超薄切片は酢酸鉛と酸化ウラニウム水溶液で染色し、透過型電子顕微鏡(T-7100, Hitachi)で観察した。

5.16. Whole mount RNA in situ hybridization

プローブの合成

始めにプローブに用いる目的遺伝子断片を cDNA 中から PCR によって増幅し(Table 5-1)、RNA polymerase のプロモーターを有するプラスミドベクターにサブクローンした。次にサブクローニングしたプラスミドを制限酵素により直線化し、フェノール抽出後、エタノール沈殿処

理を行い鋳型 DNA とした。5x transfer buffer、10x DTT、10x dig labeling mix (Roche)に鋳型 DNA 2 µg、1U RNase Inhibitor (Takara)、RNA polymerase (T7 RNA polymerase, T3 RNA polymerase, SP6 RNA polymerase, Takara)、RNase free water (Takara)を全量 20 µl になるように加え、37°C で 2 時間反応させ、RNA プローブを合成した。反応物を EtOH 沈殿により精製し、50 µl の DEPC 処理水と 50 µl のホルムアミド加え、-20°C で保存した。

前処理抗体の作製

メダカ胚 200 個程度と、成魚のヒレ 5 匹分程度を集め、4% PFA/PBS で 4°C 一晩固定した。胚は殻をピンセットで剥き、ヒレはそのまま PBST で洗浄し、抗体反応液(抗 dig アルカリホスファターゼ付加抗体(Roche)10 µl, 子ヒツジ血清 200 µl, 2%ウシ血清アルブミン 1 ml, PBST 8.8 ml)を加え、室温 5 時間、4°C 一晩処理した。上清を集め 4°C で保存した。

RNA in situ hybridization

サンプルを 4% PFA/PBS を用い 4°C 一晩固定した。PBST で洗浄し MeOH 希釈系列で脱水した後、100% MeOH を用い -20°C で 一晩静置した。MeOH 希釈系列を用いて親水化し PBST に戻した後、ProK 溶液(10 µg/ml Proteinase K, PBST)を用いて 37°C で 10 分処理した。PBST で洗浄した後、4%PFA/PBS で 20 分間固定した。PBST で洗浄した後、0.1M トリエタノールアミン溶液(pH 8.0)で 2 回洗浄し、アセチル化反応液(0.25% 無水酢酸, 0.1M トリエタノールアミン溶液)で室温 10 分間処理し、PBST で洗浄した。

さらに、ハイブリダイゼーションバッファー(50% formamide, 5×SSC, 50 µg/ml Heparin, 0.1% Tween-20, 5 mg/ml torula RNA)を用い 55°C で 1 時間処理し、プローブを含むハイブリダイゼーション溶液を用い 55°C で 一晩処理した。ハイブリダイゼーション溶液は、プローブをハイブリダイゼーションバッファーで 100 倍希釈し、80°C で 10 分間処理し、氷上で 5 分冷却して調製した。

続いて、55°C のウォッシュバッファー (50% formamide, 5×SSC, 50 µg/ml Heparin, 0.1% Tween-20, 2x SSC)で 1 回リンスし、ウォッシュバッファーを用い 55°C で 30 分間の洗浄を 2

回行った後、2x SSC を用い 55°C で 15 分間洗浄し、0.1x SSC を用い 55°C で 30 分間の洗浄を 3 回行い、最後に PBST を用い室温で 2 回洗浄した。

ブロッキング溶液 (2% 子ヒツジ血清、0.2% ウシ血清アルブミン)を用い室温で 2 時間ブロッキングし、ブロッキング液で 4 倍希釈した前処理 AP 抗体を用い 4°C で一晩処理した。PBST で室温 15 分間の条件で 6 回洗浄し、AP 染色液(100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH9.5, 0.1% Tween-20)で室温 10 分の条件で 2 回洗浄した後、発色溶液 (NBT 4μl, BCIP 3 μl, AP buffer 1ml)で処理した。室温で遮光して、発色するまで振盪器にのせ発色を待った。発色後、PBST で洗浄し、4% PFA/PBS で室温 20 分固定し、PBST で洗浄した後、4°C で保存した。

図表

Table 5-1 使用した primer

遺伝子のクローニング

目的領域	プライマー配列(5'-3') (左: Forward, 右: Reverse)
<i>cox-2</i>	TAATCCGTGTTGCTCATGGCC, TGACATCTGCTAGGCGAGAGC
<i>gfp</i>	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG, TTAATTGTACAGCTCGTCCATGCC
<i>tgfβ-1</i>	GTAAGACGGTGGACCAGGAG, GGACAAGCTCTCGACCTTGT
<i>tgfβ-2</i>	CCTCAGCAAGCTTCGCATCC, GGAGAGCTGCTCAACACGTG
<i>tgfβ-3a</i>	CTCAGCAAACCTCCGACTAAC, TCCAGAACCTCGTTTTTCATT
<i>tgfβ-3b</i>	ATTGAGGAGCTCGGAAGAGA, CATGAGGATGAGGTGAGGGT
<i>activin</i>	TTGGTTGTTGATGCCTCTCC, ACTCCTCCACGATCATGTTC
<i>mmp-2</i>	GTCCACAAGACAGCTGCAAC, TCTGCAGCTCATCAGCTCTG
<i>mmp-3</i>	AGACCTAATGAAGCAGCCCA, AAGGATGGAGTTGGCTCTCA
<i>mmp-9</i>	CTGCTCTCCCAGCTGTTATT, GAAATTTGCTGACCCGTATG
<i>mt1-mmp</i>	ATGAAGCTGAAGCTGACGGT, CTGTCTTTGGGTCTTCGTTG
<i>timp-2a</i>	TTCATCGACAGCAGCCTGAG, CGTCAAGCTGTGAATTTGGC
<i>timp-2b</i>	TCGTTCTCTGACATCTGGAG, TTGCAGTCACAGCTCGACTC

半定量 RT-PCR

目的領域	プライマー配列(5'-3') (左: Forward, 右: Reverse)
<i>rankl</i>	TGTTCCAGTATTTCTACCGT, TCAGTTGCCAGCTTTATGG
<i>β-actin</i> [108]	CAGACACGTATTTGCCTCTG, CAAGTCGGAACACATGTGCA
<i>cox-2</i>	TAATCCGTGTTGCTCATGGCC, TGTGTGATCGAGATGTCAGC
<i>ep-1a</i> [108]	TTCTGCTTCCAGGGGGACCCA, AGATCCGTGGCTTTGGTGCCA
<i>ep-1b</i> [108]	TTACCAAACCGCTGCCACATA, CAGCTTCAGTACGCTGACTGT
<i>ep-2</i> [108]	GCTGCAGGCATCTTCGGCAAC, CGATCGGTTTGCTCACAGTGA
<i>ep-3</i> [108]	GACAGCAAAGTGCCAGGAAAC, CAGAGTCCTGCTGTTATTAGC
<i>ep-4a</i> [108]	AGTTGGCCGGATTCACTCTG, GACATCCTGCGCACAAAGCG
<i>ep-4b</i> [108]	GCAGCGCTCTCTCTTCTTGG, GGTCTTCATTGATCAGTGAGG

遺伝子発現制御領域のクローニング

目的領域	プライマー配列(5'-3') (上: Forward, 下: Reverse)
2.6 bp <i>cox-2</i> upstream region	(KpnI: GGTACC)-ACAGCTATCCATCAGCCACTG GCTCCTGAGTTTGATCTTTTGC-(ApaI: GGGCCC)
4.6 bp <i>flil</i> upstream region	(XhoI: CTCGAG)-TGTGTCCTGAATGTCCTGAC TTTGCGCAAATTTTCGCGGACC-(KpnI: GGTACC)

第 6 章 参考文献

- [1] 日本骨代謝学会. 骨ペディア 骨疾患・骨代謝 キーワード事典. 2015.
- [2] 須田 立雄 小英, 高橋 榮明, 田中 栄, 中村 浩彰, 森 諭史. 新骨の科学; 2007.
- [3] 松本歯科大学大学院硬組織研究グループ. Hard Tissue 硬組織研究ハンドブック; 2005.
- [4] エドウィン H. コルバート, マイケル モラレス, 田隅 本生 監訳. 脊椎動物の進化 第四版; 1991.
- [5] A.S. ローマー T.S.パーソンズ, 平光 厲司 訳. 脊椎動物のからだ その比較解剖学 第五版; 1977.
- [6] 川本信之. 魚類生理. 恒星社厚生閣版 1970.
- [7] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108: 17-29.
- [8] Nishimura R, Wakabayashi M, Hata K, Matsubara T, Honma S, 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 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* 2012;287: 33179-90.
- [9] John P. Bilezikian LGR, T. John Martin. *Principle of Bone Biology*; 2008.
- [10] Cao L, Moriishi T, Miyazaki T, Iimura T, Hamagaki M, Nakane A, Tamamura Y, Komori T, Yamaguchi A. Comparative morphology of the osteocyte lacunocanalicular system in various vertebrates. *J. Bone Miner. Metab.* 2011;29: 662-70.
- [11] Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H, Takahashi N. Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 2003;144: 5441-9.
- [12] Munns CF, Rauch F, Travers R, Glorieux FH. Effects of intravenous pamidronate treatment in infants with osteogenesis imperfecta: clinical and histomorphometric outcome. *J. Bone Miner. Res.* 2005;20: 1235-43.
- [13] Chatani M, Takano Y, Kudo A. Osteoclasts in bone modeling, as revealed by in vivo imaging, are essential for organogenesis in fish. *Dev. Biol.* 2011;360: 96-109.
- [14] Inohaya K, Takano Y, Kudo A. Production of Wnt4b by floor plate cells is essential for the segmental patterning of the vertebral column in medaka. *Development* 2010;137: 1807-13.
- [15] Inohaya K, Takano Y, Kudo A. The teleost intervertebral region acts as a growth center of the centrum: in vivo visualization of osteoblasts and their progenitors in transgenic fish. *Dev. Dyn.* 2007;236: 3031-46.
- [16] Renn J, Buttner A, To TT, Chan SJ, Winkler C. A col10a1:nlGFP transgenic line displays putative osteoblast precursors at the medaka notochordal sheath prior to mineralization. *Dev. Biol.* 2013;381: 134-43.

- [17] Katogi R, Nakatani Y, Shin-i T, Kohara Y, Inohaya K, Kudo A. Large-scale analysis of the genes involved in fin regeneration and blastema formation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 2004;121: 861-72.
- [18] Blum N, Begemann G. Osteoblast de- and redifferentiation are controlled by a dynamic response to retinoic acid during zebrafish fin regeneration. *Development* 2015;142: 2894-903.
- [19] Geurtzen K, Knopf F, Wehner D, Huitema LF, Schulte-Merker S, Weidinger G. Mature osteoblasts dedifferentiate in response to traumatic bone injury in the zebrafish fin and skull. *Development* 2014;141: 2225-34.
- [20] Sousa S, Afonso N, Bensimon-Brito A, Fonseca M, Simoes M, Leon J, Roehl H, Cancela ML, Jacinto A. Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development* 2011;138: 3897-905.
- [21] Nemoto Y, Higuchi K, Baba O, Kudo A, Takano Y. Multinucleate osteoclasts in medaka as evidence of active bone remodeling. *Bone* 2007;40: 399-408.
- [22] To TT, Witten PE, Renn J, Bhattacharya D, Huysseune A, Winkler C. Rankl-induced osteoclastogenesis leads to loss of mineralization in a medaka osteoporosis model. *Development* 2011;139: 141-50.
- [23] Kikuta J, Wada Y, Kowada T, Wang Z, Sun-Wada GH, Nishiyama I, Mizukami S, Maiya N, Yasuda H, Kumanogoh A, Kikuchi K, Germain RN, Ishii M. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J. Clin. Invest.* 2013;123: 866-73.
- [24] Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2008;19: 459-66.
- [25] Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992;200: 165-70.
- [26] Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 2007;38 Suppl 4: S3-6.
- [27] Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell. Biochem.* 2003;88: 873-84.
- [28] Rumi MN, Deol GS, Singapuri KP, Pellegrini VD, Jr. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J. Orthop. Res.* 2005;23: 34-40.
- [29] Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury* 2005;36 Suppl 3: S13-9.
- [30] Colnot C, Huang S, Helms J. Analyzing the cellular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;350: 557-61.
- [31] Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N. Engl. J. Med.* 2005;352: 1959-66.

- [32] Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G, Kronenberg HM. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 2010;19: 329-44.
- [33] Pignolo RJ, Kassem M. Circulating osteogenic cells: implications for injury, repair, and regeneration. *J. Bone Miner. Res.* 2011;26: 1685-93.
- [34] Hutmacher DW, Sittinger M. Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2003;9 Suppl 1: S45-64.
- [35] Tarkka T, Sipola A, Jamsa T, Soini Y, Yla-Herttuala S, Tuukkanen J, Hautala T. Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *The journal of gene medicine* 2003;5: 560-6.
- [36] Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho AM, Gearhart B, Cooper GM, Huard J. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 2005;20: 2017-27.
- [37] Reed AA, Joyner CJ, Brownlow HC, Simpson AH. Human atrophic fracture non-unions are not avascular. *J. Orthop. Res.* 2002;20: 593-9.
- [38] Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. The vascularity of atrophic non-unions. *Injury* 2002;33: 145-50.
- [39] Harry LE, Sandison A, Paleolog E, McCarthy I, Pearse MF, Nanchahal J. THE EFFECT OF MUSCLE AND FASCIOCUTANEOUS FLAPS ON ANGIOGENESIS IN OPEN TIBIAL FRACTURES. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 2005;87-B: 307.
- [40] Ulrich-Vinther M, Andreassen TT. Osteoprotegerin treatment impairs remodeling and apparent material properties of callus tissue without influencing structural fracture strength. *Calcif. Tissue Int.* 2005;76: 280-6.
- [41] Ulrich-Vinther M, Schwarz EM, Pedersen FS, Soballe K, Andreassen TT. Gene therapy with human osteoprotegerin decreases callus remodeling with limited effects on biomechanical properties. *Bone* 2005;37: 751-8.
- [42] Lisa M. Flick JMW, Michael Ulrich-Vinther, Faruk Abuzzahab, Xinping Zhang, William C. Dougall, Dirk Anderson, Regis J. O'Keefe, Edward M. Schwarz. Effects of receptor activator of NFkB (RANK) signaling blockade on fracture healing. *J. Orthop. Res.* 2003;21: 676-684.
- [43] Rubin C, Judex S, Hadjiargyrou M. Skeletal adaptation to mechanical stimuli in the absence of formation or resorption of bone. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2002;2: 264-7.
- [44] Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003;22: 6267-76.
- [45] van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Lowik CW. SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16: 319-27.

- [46] Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *The Journal of Biological Chemistry* 2008;283: 5866-75.
- [47] Caetano-Lopes J, Lopes A, Rodrigues A, Fernandes D, Perpetuo IP, Monjardino T, Lucas R, Monteiro J, Konttinen YT, Canhao H, Fonseca JE. Upregulation of inflammatory genes and downregulation of sclerostin gene expression are key elements in the early phase of fragility fracture healing. *PloS one* 2011;6: e16947.
- [48] Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 2001;16: 1004-14.
- [49] Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 2002;17: 963-76.
- [50] Kang YJ, Mbonye UR, DeLong CJ, Wada M, Smith WL. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog. Lipid Res.* 2007;46: 108-25.
- [51] Cok SJ, Morrison AR. The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. *J. Biol. Chem.* 2001;276: 23179-85.
- [52] Huang ZF, Massey JB, Via DP. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 2000;59: 187-94.
- [53] Mbonye UR, Wada M, Rieke CJ, Tang HY, Dewitt DL, Smith WL. The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281: 35770-8.
- [54] Kobayashi T, Narumiya S. Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69: 557-73.
- [55] Li M, Healy DR, Li Y, Simmons HA, Crawford DT, Ke HZ, Pan LC, Brown TA, Thompson DD. Osteopenia and impaired fracture healing in aged EP4 receptor knockout mice. *Bone* 2005;37: 46-54.
- [56] Becerra J, Montes GS, Bexiga SR, Junqueira LC. Structure of the tail fin in teleosts. *Cell Tissue Res.* 1983;230: 127-37.
- [57] Mari-Beffa M, Murciano C. Dermoskeleton morphogenesis in zebrafish fins. *Dev. Dyn.* 2010;239: 2779-94.
- [58] Witten PE, Huysseune A. A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2009;84: 315-46.

- [59] Ogino Y, Hirakawa I, Inohaya K, Sumiya E, Miyagawa S, Denslow N, Yamada G, Tatarazako N, Iguchi T. Bmp7 and Lef1 are the downstream effectors of androgen signaling in androgen-induced sex characteristics development in medaka. *Endocrinology* 2014;155: 449-62.
- [60] Notini AJ, McManus JF, Moore A, Bouxsein M, Jimenez M, Chiu WS, Glatt V, Kream BE, Handelsman DJ, Morris HA, Zajac JD, Davey RA. Osteoblast deletion of exon 3 of the androgen receptor gene results in trabecular bone loss in adult male mice. *J. Bone Miner. Res.* 2007;22: 347-56.
- [61] Ota N, Takaishi H, Kosaki N, Takito J, Yoda M, Tohmonda T, Kimura T, Okada Y, Yasuda H, Kawaguchi H, Matsumoto M, Chiba K, Ikegami H, Toyama Y. Accelerated cartilage resorption by chondroclasts during bone fracture healing in osteoprotegerin-deficient mice. *Endocrinology* 2009;150: 4823-34.
- [62] Knowles HJ, Moskovsky L, Thompson MS, Grunhen J, Cheng X, Kashima TG, Athanasou NA. Chondroclasts are mature osteoclasts which are capable of cartilage matrix resorption. *Virchows Arch.* 2012;461: 205-10.
- [63] Flick LM, Weaver JM, Ulrich-Vinther M, Abuzzahab F, Zhang X, Dougall WC, Anderson D, O'Keefe RJ, Schwarz EM. Effects of receptor activator of NFkappaB (RANK) signaling blockade on fracture healing. *J. Orthop. Res.* 2003;21: 676-84.
- [64] Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Muller R, Wu AC, Van Rooijen N, Sweet MJ, Hume DA, Raggatt LJ, Pettit AR. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J. Bone Miner. Res.* 2011;26: 1517-32.
- [65] Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987;236: 1229-37.
- [66] Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344: 254-7.
- [67] Niida S Fau - Kondo T, Kondo T Fau - Hiratsuka S, Hiratsuka S Fau - Hayashi S-I, Hayashi S Fau - Amizuka N, Amizuka N Fau - Noda T, Noda T Fau - Ikeda K, Ikeda K Fau - Shibuya M, Shibuya M. VEGF receptor 1 signaling is essential for osteoclast development and bone marrow formation in colony-stimulating factor 1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005.
- [68] McGowan NW, Walker EJ, Macpherson H, Ralston SH, Helfrich MH. Cytokine-activated endothelium recruits osteoclast precursors. *Endocrinology* 2001;142: 1678-81.
- [69] Okada T, Akikusa S, Okuno H, Kodaka M. Bone marrow metastatic myeloma cells promote osteoclastogenesis through RANKL on endothelial cells. *Clin. Exp. Metastasis* 2003;20: 639-46.
- [70] Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo JT, Takahashi N, Nagai K. Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J. Immunol.* 2004;172: 2504-10.

- [71] Hughes FJ, Aubin JE, Heersche JN. Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone Miner.* 1992;19: 63-74.
- [72] Chen TL, Bates RL. Recombinant human transforming growth factor beta 1 modulates bone remodeling in a mineralizing bone organ culture. *J. Bone Miner. Res.* 1993;8: 423-34.
- [73] Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* 1994;127: 1755-66.
- [74] Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr. Rev.* 2005;26: 743-74.
- [75] Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, Sabatini M, Dallas S, Feng JQ, Ghosh-Choudhury N, Wozney J, Mundy GR. Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* 1994;9: 855-63.
- [76] Gebken J, Feydt A, Brinckmann J, Notbohm H, Muller PK, Batge B. Ligand-induced downregulation of receptors for TGF-beta in human osteoblast-like cells from adult donors. *J. Endocrinol.* 1999;161: 503-10.
- [77] Spinella-Jaegle S, Roman-Roman S, Faucheu C, Dunn FW, Kawai S, Gallea S, Stiot V, Blanchet AM, Courtois B, Baron R, Rawadi G. Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation. *Bone* 2001;29: 323-30.
- [78] Karst M, Gorny G, Galvin RJ, Oursler MJ. Roles of stromal cell RANKL, OPG, and M-CSF expression in biphasic TGF-beta regulation of osteoclast differentiation. *J. Cell. Physiol.* 2004;200: 99-106.
- [79] Hughes DE, Dai A, Tiffie JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat. Med.* 1996;2: 1132-6.
- [80] Finkelman RD, Bell NH, Strong DD, Demers LM, Baylink DJ. Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor beta in rat bone: implications for estrogen deficiency-associated bone loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89: 12190-3.
- [81] Finkelman RD, Linkhart TA, Mohan S, Lau KH, Baylink DJ, Bell NH. Vitamin D deficiency causes a selective reduction in deposition of transforming growth factor beta in rat bone: possible mechanism for impaired osteoinduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991;88: 3657-60.
- [82] Pfeilschifter J, Laukhuf F, Muller-Beckmann B, Blum WF, Pfister T, Ziegler R. Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *J. Clin. Invest.* 1995;96: 767-74.
- [83] Erlebacher A, Derynck R. Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J. Cell Biol.* 1996;132: 195-210.

- [84] Filvaroff E, Erlebacher A, Ye J, Gitelman SE, Lotz J, Heilman M, Derynck R. Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development* 1999;126: 4267-79.
- [85] Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359: 693-9.
- [86] Geiser AG, Zeng QQ, Sato M, Helvering LM, Hirano T, Turner CH. Decreased bone mass and bone elasticity in mice lacking the transforming growth factor-beta1 gene. *Bone* 1998;23: 87-93.
- [87] Atti E, Gomez S, Wahl SM, Mendelsohn R, Paschalis E, Boskey AL. Effects of transforming growth factor-beta deficiency on bone development: a Fourier transform-infrared imaging analysis. *Bone* 2002;31: 675-84.
- [88] Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 1997;124: 2659-70.
- [89] Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, Groffen J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat. Genet.* 1995;11: 415-21.
- [90] Pelton RW, Dickinson ME, Moses HL, Hogan BL. In situ hybridization analysis of TGF beta 3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGF beta 1 and beta 2. *Development* 1990;110: 609-20.
- [91] Horner A, Kemp P, Summers C, Bord S, Bishop NJ, Kelsall AW, Coleman N, Compston JE. Expression and distribution of transforming growth factor-beta isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone* 1998;23: 95-102.
- [92] Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr. Rev.* 1994;15: 27-39.
- [93] Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 2002;17: 513-20.
- [94] Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* 2003;116: 217-24.
- [95] Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell Biol.* 1988;106: 1659-65.
- [96] Maeda S, Dean DD, Gomez R, Schwartz Z, Boyan BD. The first stage of transforming growth factor beta1 activation is release of the large latent complex from the extracellular matrix of growth plate chondrocytes by matrix vesicle stromelysin-1 (MMP-3). *Calcif. Tissue Int.* 2002;70: 54-65.

- [97] Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J. Biol. Chem.* 2002;277: 21352-60.
- [98] Mu D, Cambier S, Fjellbirkeland L, Baron JL, Munger JS, Kawakatsu H, Sheppard D, Broaddus VC, Nishimura SL. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J. Cell Biol.* 2002;157: 493-507.
- [99] Lu KV, Jong KA, Rajasekaran AK, Cloughesy TF, Mischel PS. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Lab. Invest.* 2004;84: 8-20.
- [100] Jazwinska A, Badakov R, Keating MT. Activin-betaA signaling is required for zebrafish fin regeneration. *Curr. Biol.* 2007;17: 1390-5.
- [101] Fuller K, Lean JM, Bayley KE, Wani MR, Chambers TJ. A role for TGFbeta(1) in osteoclast differentiation and survival. *J. Cell Sci.* 2000;113 (Pt 13): 2445-53.
- [102] Parichy DM, Ransom DG, Paw B, Zon LI, Johnson SL. An orthologue of the kit-related gene *fms* is required for development of neural crest-derived xanthophores and a subpopulation of adult melanocytes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 2000;127: 3031-44.
- [103] Mosig RA, Dowling O, DiFeo A, Ramirez MC, Parker IC, Abe E, Diouri J, Aqeel AA, Wylie JD, Oblander SA, Madri J, Bianco P, Apte SS, Zaidi M, Doty SB, Majeska RJ, Schaffler MB, Martignetti JA. Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16: 1113-23.
- [104] Lieu S, Hansen E, Dedini R, Behonick D, Werb Z, Miclau T, Marcucio R, Colnot C. Impaired remodeling phase of fracture repair in the absence of matrix metalloproteinase-2. *Disease models & mechanisms* 2011;4: 203-11.
- [105] Holmbeck K, Bianco P, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H. MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: a critical process in skeletal growth. *J. Cell Biol.* 2003;163: 661-71.
- [106] Iwamatsu T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 2004;121: 605-18.
- [107] Wan Y, Otsuna H, Chien CB, Hansen C. An interactive visualization tool for multi-channel confocal microscopy data in neurobiology research. *IEEE transactions on visualization and computer graphics* 2009;15: 1489-96.
- [108] Fujimori C, Ogiwara K, Hagiwara A, Rajapakse S, Kimura A, Takahashi T. Expression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin receptor EP4b mRNA in the ovary of the medaka fish, *Oryzias latipes*: possible involvement in ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010;332: 67-77.

第7章 謝辞

私が生物学に興味を持つきっかけとなったのが、高校時代に読んだ動物行動学者コンラート・ローレンツの著書『ソロモンの指環』でした。動物と会話ができるようになるという、旧約聖書のソロモン王の指輪になぞらえて、動物行動学という観点から動物を考察した本です。彼はヒトも動物であり、自身を知る学問である生物学は非常に重要であると考えていたそうです。しかし、当時の私には生物学が役に立つ学問だとは思えませんでした。転機となったのは、何百万人に一人という稀少疾患の治療法開発を、生物学の観点から試みる医師の講演を聴いたことでした。そこで、これからの医学には生物学的な観点が不可欠だということを知りました。生物学はまだまだ新しい学問ですが、それを発展させることで人の役に立つ研究をすることが、私が生物学の道に進んだ理由でした。

単なる発生生物学研究ではなく、人の役に立つことを目標とした病理研究をやりたいという私の希望に添って、適切なテーマに取り組ませていただき、学士、修士、博士と6年間にわたり研究をご指導頂きました工藤明先生に心より感謝いたします。また、実験・研究の基礎を指導して下さった茶谷昌宏先生、電子顕微鏡解析をしていただき、組織学的なご助言を下さいました東京医科歯科大学の高野吉郎先生にお礼申し上げます。

さらに、共同研究でお世話になった、日本航空宇宙開発機構、日本宇宙フォーラム、三菱重工、千代田化工の皆様。学生生活を支援して下さい、生命事務、情報生命教育院の皆様。共に研究室で過ごした、工藤・川上研究室の先生方、卒業生、学生の皆様、秘書である松崎由紀子様。温かく見守ってくれた家族。多くの人達のおかげで、ようやくいま博士としてのスタートラインに立つことができました。縁あって、私はまだしばらくの間、実験者として生物学研究に関わっていくことになりますが、実験することだけが博士のあり方ではないと思っています。後進のためにも博士としての能力や経験が多くのことに役立つことを社会に示していきたいです。

今後の人生のあらゆる局面において、東京工業大学の博士として恥ずかしくない社会への貢献ができるように努力し続けることをここに宣言し、研究生活を通して関わったすべての人、そして、私たちの理解を深めてくれた実験動物たちへの、私からの謝辞といたします。

平成 28 年 1 月 武山 和弘