

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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

# 論文要旨

## THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生命情報	専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（理学）
学生氏名： Student's Name	武山 和弘		指導教員（主）： Academic Advisor(main)	工藤 明	
			指導教員（副）： Academic Advisor(sub)	川上 厚志	

### 要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

#### 【背景】

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の解析系として研究されてきた。損傷を起こした骨組織は炎症を起こし、修復を行うための細胞群を呼び寄せる。この中で特に重要なのが、骨芽細胞と破骨細胞である。骨芽細胞は骨基質を分泌し、骨折部を覆うこぶ状の骨である仮骨を形成する。破骨細胞は仮骨を吸収し形を整えることで、正常な骨の輪郭と強度を回復する。これらの細胞は骨折修復だけではなく、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分化機構や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。

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。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される必要があるため、生きたままの解析を行う必要がある。本博士論文研究において、メダカを用いて骨折修復を生きたまま観察する新たな実験系の開発に取り組み、破骨細胞と骨芽細胞の由来と細胞分化を制御するメカニズムについて解析した。

#### 【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。破骨細胞と骨芽細胞を蛍光標識した遺伝子組み換えメダカ(Tg)を用い、骨折修復の過程で破骨細胞と骨芽細胞がどのように働くのかを観察した。その結果、骨芽細胞による仮骨の形成の前後 2 段階で異なる働きを持った破骨細胞が誘導されることを明らかにした。初期の破骨細胞は骨断片の吸収を、後期の破骨細胞は仮骨の吸収を行った。いずれの破骨細胞も、細胞追跡の結果、始めに現れるのは血管周囲で、その後、骨断片または仮骨の周囲に移動した。一方で、骨芽細胞は隣接する骨組織の表面の骨芽細胞が骨折部へ移動することで、仮骨形成を行うことが明らかになった。

これらの細胞分化と遊走を引き起こすメカニズムとして、炎症に注目した。炎症応答生酵素シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)はプロスタグランジン E2 を生産し、骨折修復に必須の働きをすることが報告されている。そこで、COX-2 プロモーター下流で GFP を発現する Tg を作製し、骨折修復過程での発現上昇を生きたまま観察した。その結果、COX-2 発現は骨折修復初期に血管周囲で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-2 の骨折修復における機能】

トランスフォーミング成長因子(TGFβ)骨代謝において骨芽細胞と破骨細胞の両方に作用する因子として注目されてきた。TGFβは炎症性サイトカインの一つとしても知られ、骨折修復にも深く関わっていることが示唆されているが、TGFβの骨折修復における働きはわかっていない。哺乳動物の骨折修復では軟組織を含む重篤な炎症が生ずることがこの一因であり、メダカ骨折修復モデルを用いることで、生体内での TGFβの複雑な作用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 が知られており、メダカにおいてこれらの相同遺伝子の発現解析を行った。その結果、TGFβ-2 のみが特異的に骨形成領域で発現することが明らかになった。さらに、TGFβシグナルを薬剤により阻害したところ、骨芽細胞の分化と遊走と破骨細胞の分化が著しく抑制された。TGFβの活性化に関わるメカニズムとしてマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の発現を解析したところ、TGFβシグナル非依存的に MMP-2 と MT1-MMP が骨形成領域で発現した。以上のことから、TGFβ-2 は MMP を介して骨折部に骨芽細胞を呼び寄せ、骨折部周囲で破骨細胞と骨芽細胞を分化させる働きを持っていることが示唆された。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

## 論文要旨

### THESIS SUMMARY

専攻:	生命情報	専攻
Department of		
学生氏名:	武山 和弘	
Student's Name		

申請学位(専攻分野):	博士	(理学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員(主):	工藤 明	
Academic Advisor(main)		
指導教員(副):	川上 厚志	
Academic Advisor(sub)		

#### 要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Fracture healing research have been performed in mammalian models not only for clinical applications but also for bone development analyses. However, observation of the bony cell behavior in living animals has been difficult in the conventional models. Here in this study, we developed new fracture healing model by using teleost fish, medaka, which transparent caudal fin enable us to observe the healing process in living animals.

We fractured one side of lepidotrichia in a caudal fin ray with lower-level injury of surrounding soft tissues including blood vessels. Using transgenic medaka (Tg) in which osteoclasts and osteoblasts were visualized by GFP and DsRed, respectively, we found that two different types of osteoclasts were induced before and after the osteoblast callus formation. The early-induced osteoclasts resorbed the bone fragments and the late-induced osteoclasts remodel the callus. Both types of osteoclasts differentiated on the surface of blood vessels, whereas osteoblasts migrated to fracture site from adjacent fin ray surface.

Regarding the mechanisms for these cell differentiation and migration, we examined inflammation. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is one of the inflammatory induced enzyme to produce prostaglandin E2 (PGE2), which is general regulator of bone metabolism. We generated Tg in which GFP express under the control of cox-2 promoter and evaluate its expression during fracture healing. As the result, we found that cox-2 expression was detected around blood vessels. Furthermore, loss of function analysis by using chemical inhibitor demonstrated that COX-2 was related to bone remodeling by the late-induced osteoclasts.

Next, we examined the functions of transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) that is one of the inflammation-induced signals during fracture healing. TGF $\beta$  is a well-known cytokine that regulate both of bone formation and bone resorption. However, the function of TGF $\beta$  in the healing during fracture healing was poorly understood, because broad inflammation of soft tissues in mammal models disturb analysis of its specific functions on bone healing. Medaka fracture healing model is suitable to analyze TGF $\beta$  functions from this point of view.

RNA in situ hybridization analysis during medaka fracture healing showed that only *tgfb-2* was expressed in the bone forming region. Furthermore, loss of function analysis by using chemical inhibitor demonstrated that inhibition of TGF $\beta$  signaling repressed migration of osteoblasts and differentiation of osteoblasts and osteoclasts. Interestingly, two specific matrix metalloproteinase (MMP), *mmp-2* and *mt1-mmp*, both of which are reportedly related to TGF $\beta$  activation, expression was induced independently of TGF $\beta$  signaling. Thus, TGF $\beta$ -2 may have functions as chemotactic inducer for migration of osteoblasts and differentiation of osteoblasts and osteoclasts.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).