

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	メダカ歯交換機構を用いた骨モデリングにおける破骨細胞と骨芽細胞の相互作用の解析
Title(English)	
著者(和文)	萬徳晃子
Author(English)	Akiko Mantoku
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10090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,桑 昭苑,山口 雄輝,立花 和則
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10090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 学位論文

メダカ歯交換機構を用いた骨モデリングにおける
破骨細胞と骨芽細胞の相互作用の解析

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

萬徳 晃子

指導教官 工藤 明 教授、川上 厚志 准教授

目次

要旨	5
第一章 序論	9
1.1 緒言	9
1.2 骨形成	10
1.2.1 骨	10
1.2.2 骨形成	10
1.2.3 骨組織の改変	11
1.2.4 マクロモデリング	11
1.2.5 ミニモデリング	12
1.2.6 骨リモデリング	13
1.3 骨芽細胞と破骨細胞	13
1.3.1 骨芽細胞	13
1.3.2 破骨細胞の機能	14
1.3.3 破骨細胞の骨吸収能の調節 ―分化と生存の調節―	15
1.3.4 骨モデリングにおける骨芽細胞と破骨細胞	17
1.3.5 骨モデリング研究における問題点	17
1.4 メダカ	18
1.4.1 モデル生物としてのメダカ	18
1.4.2 メダカと骨研究	18
1.4.3 メダカの骨芽細胞	19
1.4.4 メダカの破骨細胞	19
1.5 咽頭歯	20
1.5.1 歯	20
1.5.2 咽頭歯	21
1.5.3 歯交換	21
1.6 本研究の意義	23
第二章 メダカ咽頭歯の歯交換に伴った骨モデリング	24
2.1 背景と目的	25
2.2 材料と方法	26
2.2.1 実験動物と飼育方法	26
2.2.2 試料の固定	27
2.2.3 アリザリンレッド染色(成魚咽頭歯)	27
2.2.4 アリザリンレッド染色(稚魚)	28
2.2.5 骨の生体染色	28
2.2.6 咽頭歯の観察(whole mount)	28

2.2.7 遺伝子のクローニング	29
2.2.8 whole-mount RNA in situ hybridization (WISH 法)	30
2.2.9 樹脂切片の作製.....	32
2.2.10 メチレンブルー染色	32
2.2.11 DAPI 染色	32
2.3 結果.....	33
2.3.1 咽頭歯の構造.....	33
2.3.2 咽頭歯の発生段階.....	34
2.3.3 歯足骨の代謝.....	35
2.3.4 咽頭歯の交換と歯足骨の代謝	36
2.3.5 咽頭歯の代謝.....	37
2.3.6 咽頭歯骨全体の骨モデリングと歯交換.....	38
2.3.7 破骨細胞と骨芽細胞の局在	38
2.4 考察	40
2.4.1 骨モデリングのモデルとしての歯足骨の代謝	40
2.4.2 咽頭歯骨の骨モデリングと歯足骨の骨モデリング	41
2.4.3 骨芽細胞の骨形成能による分類.....	43
2.4.4 歯足骨の代謝と破骨細胞	44
2.5 図表	45
第三章 歯足骨の骨モデリングにおける破骨細胞と骨芽細胞の相互作用.....	57
3.1 背景と目的	58
3.2 材料と方法	59
3.2.1 fosmid を用いた Tg ラインの作製.....	59
3.2.2 TALEN 法による <i>c-fms-a</i> 変異体の作製.....	60
3.2.3 遺伝子のクローニング	61
3.2.4 whole-mount in situ hybridization	61
3.2.5 Von Kossa/TRAP 染色	61
3.2.6 定量解析における統計解析	62
3.2.7 メトロニダゾールによる薬剤処理 (稚魚)	62
3.2.8 メトロニダゾールによる薬剤処理 (成魚)	62
3.2.9 稚魚のライブイメージング	63
3.2.10 半定量 RT-PCR	63
3.2.11 TUNEL 染色(Whole)	64
3.2.12 パラフィン切片の作製	64
3.2.13 TUNEL 染色(切片).....	65
3.2.14 抗体染色	65

3.3 結果.....	65
3.3.1 破骨細胞前駆細胞の局在.....	65
3.3.2 <i>c-fms a</i> の変異体.....	67
3.3.3 骨芽細胞のコンディショナルノックダウン.....	68
3.4 考察.....	70
3.4.1 骨モデリングにおける破骨細胞と骨芽細胞の相互作用	70
3.4.2 破骨の分化調節と osteoblast I.....	71
3.4.3 破骨の骨吸収量の調節と osteoblast II.....	72
3.5 図表.....	73
第四章 総括と展望.....	88
参考文献.....	89
謝辞.....	93

要旨

メダカ歯交換機構を用いた骨モデリングにおける

破骨細胞と骨芽細胞の相互作用の解析

発表者氏名 指導教員名
萬徳晃子 工藤明、川上厚志

【背景と目的】

骨モデリングは骨発生初期における骨形成様式である。骨モデリングは骨面の片側において骨芽細胞が骨基質を添加し、反対側において破骨細胞が骨を吸収することによって成り立っており、これにより骨はその大まかな形を変えずにサイズを変えることが可能になる。一般的に骨モデリングは骨芽細胞と破骨細胞の直接的な相互作用なしに進むとされているが詳しいメカニズムは不明である。その原因の一つに骨モデリングを *in vivo* で解析するために適したモデルが欠如していることが挙げられる。現在骨研究には哺乳類が広く用いられているが、その骨は巨大かつ複雑な構造をしており、骨モデリングのようなダイナミックなマクロ的变化を解析することが困難であるという問題がある。

一方で硬骨魚類であるメダカは骨研究の優れたモデル生物である。メダカは体外発生を行い体が透明であることから骨モデリングの過程を継時的に追うことが容易である。また骨モデリングを司る破骨細胞と骨芽細胞双方のトランスジェニック (Tg) ラインが確立されており、*in vivo* においてこれらの細胞の挙動を観察することができる。特にメダカの破骨細胞は哺乳類と同様に TRAP (Tartrate Resistant Acid Phosphatase; 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ) 陽性細胞であり、細胞融合を通して多核化することが知られている。破骨細胞の分化には、M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) 及び RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) とその受容体の結合を介した刺激が必要であるとされているが、M-CSF のレセプターである *c-fms* を欠損したゼブラフィッシュ個体では破骨細胞数が減少しており、その結果、椎体において大理石病に類似した骨モデリング異常を起こすことが明らかになっている。またメダカの RANKL の過剰発現では骨粗鬆症様の表現型を呈すことから、哺乳類と共通の分化機構が存在すると考えられる。

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

ングにおける骨芽細胞と破骨細胞の相互作用を解析した。

【方法と結果】

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

カルセインとアリザリンコンプレクソンによる二重標識を用いて、歯足骨が歯交換中にどのように代謝されるかを観察した。その結果、歯足骨は常に成熟歯列の **posterior** 側で形成され、**anterior** 側で吸収されることによって、列全体が **posterior** 側に移動することが分かった。歯の生え変わりと歯足骨の代謝との関係を組織切片によって確認したところ、吸収面においては歯足骨が吸収されることで歯が支えを失い脱落し、形成面においては萌出後の歯の直下に歯足骨が形成されることで成熟歯へと成長していた。以上の結果から各咽頭歯はステージ i から III まで絶対的な位置を変化させずに成長するが、歯足骨の代謝により列の中での相対的な位置が **anterior** 側にシフトするということが分かった。(図1)

歯足骨の代謝に骨芽細胞と破骨細胞がどのように関与しているのか調べるために、**TRAP-GFP/osterix-DsRed** ダブル Tg ラインの咽頭歯の組織解析を行った。その結果、**DsRed** 陽性の骨芽細胞は成熟歯列の形成面に特に集中して局在し、**GFP** 陽性の多核破骨細胞は吸収面に局在するという、骨モデリングと同様の特徴を示すことが分かった。また破骨細胞に注目すると、骨が形成されるステージ I より前は破骨細胞の出現は認められず、成熟歯のステージが進むごとに破骨細胞の数は増し、歯の脱落が起こるステージ III では多くの多核破骨細胞が認められることから、歯の成長と破骨細胞の分化、増殖が同調している可能性が示唆された。

破骨細胞の分化について調べるために、破骨細胞前駆細胞マーカーである *c-fms-a* プロモーターの下流で

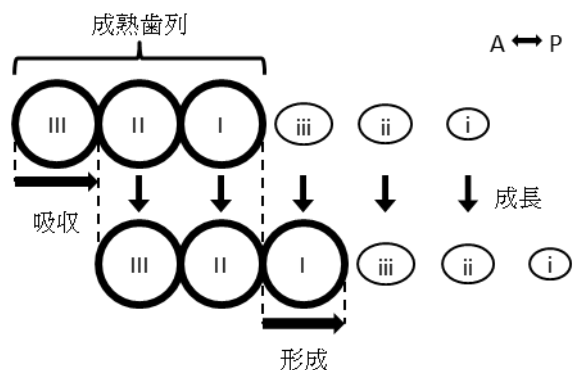


図1: 歯足骨代謝の様子

GFP を発現する Tg ラインを作製し、TRAP-DsRed とのダブル Tg ラインを作製して局在を調べた。その結果 *c-fms-a* 陽性/TRAP 陰性の破骨細胞前駆細胞はステージ i から歯胚に局在しており、歯のステージが進み成熟歯になると *c-fms-a* 陽性/TRAP 陽性の破骨細胞が歯足骨に局在するようになることが分かった。*c-fms-GFP/osterix-DsRed* のダブル Tg ラインを作製し破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞の局在を調べたところ、ステージ I において、形成中の歯足骨で骨芽細胞と GFP 陽性細胞が接触している様子が確認された。

また骨形成と骨吸収のバランスがどのように保たれているのかを調べるために、それぞれの細胞のノックダウン実験を行った。まず、*c-fms-a* 遺伝子を欠損した変異体メダカを TALEN 法によって作製し、破骨細胞のノックダウンを試みた。結果、変異体において TRAP 陽性細胞が減少していた。さらに成熟歯列を構成している歯足骨の列が、野生型では1列なのに対し、変異体では3列に増加していた。しかし、骨芽細胞の数及び骨形成能に大きな差はなかった。

骨芽細胞の骨モデリングにおける役割を調べるために、*ColX-NTR-GFP* Tg メダカを作製し、骨芽細胞のコンディショナルな除去実験を行った。メトロニダゾール処理によって骨芽細胞の除去を試みたところ、骨芽細胞のアポトーシス後に破骨細胞が劇的に減少することが、稚魚のライブイメージング及び成魚の歯足骨における TRAP 染色より明らかになった。

【考察と結論】

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

歯はステージによって歯列中のどの位置に局在するかが決まっているので、適切な位置で吸収を行うということは、すなわち歯の成長ステージに合わせて吸収を行う必要があるということである。破骨細胞前駆細胞である *c-fms-a* 陽性/TRAP 陰性細胞は歯の最も初期のステージであるステージ i から歯胚に局在していた。その後も成長する歯胚中で前駆細胞は維持され、ステージ I の段階で破骨細胞前駆細胞は骨形成中の骨芽細胞と接触していた。その直後から TRAP 陽性の破骨細胞が出現することからも、破骨細胞前駆細胞はこの骨芽細胞から分化の刺激を受けていると考えられる。ステージ III における多核化の仕組みは本研究では明らかにはできなかったが、歯の発生初期から破骨細胞の前駆細胞が存在し、それが歯の成長過程に伴って刺激を受け分化していくことで時空間的に適切な歯足骨の吸収が起こるのだと考えら

れる。また骨芽細胞除去実験の結果から、骨芽細胞が産生する因子が破骨細胞の吸収活性を調節していると考えられる。

以上のことから歯足骨において、骨芽細胞は破骨細胞の分化及び吸収活性を調節することで骨モデリングを制御することが示唆された。

【報文目録】

Akiko Mantoku, Masahiro Chatani, Kazushi Aono, Keiji Inohaya, Akira Kudo. (2015) Osteoblast and osteoclast behaviors in bone modeling of pharyngeal bones in medaka tooth replacement. *Developmental Biology* doi:10.1016/j.ydbio.2015.12.002

【参考論文】

Masahiro Chatani, Akiko Mantoku, Kazuhiro Takeyama, Dawud Abduweli, Yasutaka Sugamori, Kazuhiro Aoki, Keiichi Ohya, Hiromi Suzuki, Satoko Uchida, Toru Sakimura, Yasushi Kono, Fumiaki Tanigaki, Masaki Shirakawa, Yoshiro Takano & Akira Kudo. (2015) Microgravity promotes osteoclast activity in medaka fish reared at the international space station. *Scientific Report* 5, doi:10.1038/srep14172

第一章 序論

1.1 緒言

「建物の骨組み」や「企画の骨子」など、骨を使った表現というのは物事の基本構造を表す時に使用されることが多い。骨の主要な役割の一つは体の構造の中心に存在してその基本的形状を決めるというものであるため、これはまさに的を射た表現であるように思える。

一言に骨と言っても、生体内で骨格を形成する一つ一つの骨は大きさや形状が多種多様で、それぞれがその機能に適した形態と特性を有している¹。頭蓋骨は脳を覆って保護するために扁平で風船のような形をしているが、足を構成する大腿骨は長い直線状をしており、関節部は滑らかに動くように半球状になっている。肋骨はちょうど臓器を包むために弧を描き、脊椎骨は背の可動性を増すために分節性を持って規則正しく配置している。人に関していえば成人の骨格は 206 本の骨から成り、それが胎生期中に体の正しい位置で、正しい形に発生する。また一度発生した後も、骨は個体の成長や外的環境の変化に伴って生体内で少しずつ形を変えていく。先ほど例に出した建築物について考えてみると、設計した骨組みを構成するパーツを図面通りに作り、それを組み立てていく作業が如何に労力を伴うものか容易に想像できるだろう。ましてや一度建設が完了してしまった建物の主構造を、その建物の機能を維持したままに環境の変化に応じて作り変えることなど不可能に近い。一方、生体内においてはこれらのダイナミックな形づくりや形の変化がたった数種類の細胞によって自動的かつ持続的に行われているということは驚くべき事実であり、まさに生命の神秘と言っても過言ではない。

本章では骨の形態形成に関して、いくつかの非常に良くデザインされた仕組みやそれを司る細胞について説明し、本研究で着目した骨モデリングにおける破骨細胞と骨芽細胞の相互作用についての理解を深めることを目的とする。

1.2 骨形成

1.2.1 骨

骨は約 67%の無機性基質と 33%の有機性基質から成る石灰化結合組織である²。骨の有機成分の 80%以上は type I collagen 等のコラーゲン性タンパク質から成り、そのほかにもオステオカルシン、オステオポンチンなどの非コラーゲン性タンパク、さらには種々の増殖因子や血清タンパク質も含んでいる。これらの有機物は骨の無機成分であるハイドロキシアパタイト結晶の間に分布している。

骨を他の内臓と区別する特性として硬さが挙げられ、心臓や肺などの骨以外の内臓を軟組織と呼ぶのに対し、骨は硬組織と呼ばれる。骨の生体内における役割は、ハイドロキシアパタイトの構成成分であるカルシウムや、骨基質内に閉じ込められたサイトカイン及び成長因子などの貯蔵、造血、運動器としての機能のほかに、その硬さを利用して内臓を保護し、重力を始めとした外部から与えられるメカニカルストレスに拮抗して体を支える役割を持っている³。

1.2.2 骨形成

多くの脊椎動物、とくに哺乳類において、骨は胎生期に形成が始まる。胎生期における初期の骨発生は、膜性骨化または内軟骨性骨化のどちらかの様式によって行われる¹。膜性骨化は頭蓋骨や顎骨を始めとした骨に、内軟骨性骨化は四肢骨を始めとした長管骨、椎骨や骨盤、肋骨に起こる。膜性骨化では、血管のよく発達した間葉組織内に局在する間葉系幹細胞が骨芽細胞へと分化し、類骨の元となるコラーゲンなどの骨性基質を組織内に定着させて骨形成を開始するのに対し、内軟骨性骨化においては、まず組織内に軟骨細胞が凝集して軟骨による骨の原型を作ることから始まる。この軟骨による型は、後に下記のプロセスを経て骨芽細胞によって石灰化組織に置き換えられる。まず、硝子軟骨による型を作っていた軟骨細胞が肥大軟骨細胞へと分化し、肥大軟骨細胞が分泌する VEGF などの因子によって血管が組織内に誘導される。この血管の周囲には間葉系幹細胞が多数付着しており、この幹細胞はこ

の後骨芽細胞へと分化して骨基質を分泌し、石灰化骨を形成する。同時に、血管と共に侵入してきた破骨細胞により石灰化軟骨は削られるため、軟骨は硬骨へと置き換わる。

1.2.3 骨組織の改変

骨は硬く、静的な組織であると考えられがちであるが、膜性骨化及び内軟骨性骨化によって一度骨組織が発生した後も、骨モデリング及び骨リモデリングを介して生涯を通して作り変えられる動的な組織である。骨モデリングは、肉眼的な骨の形態変化を伴うマクロモデリングと、骨の内部組織において起こる、外面的な変化を伴わないミニモデリングとに分類される¹。

1.2.4 マクロモデリング

Frost は骨の成長時の形態変化をモデリングと述べ⁴、特に骨の成長期において、骨がその基本構造を変えずに肉眼で判別できるほどに大きさを変えることをマクロモデリングと呼んだ⁵ (図 1.1)。マクロモデリングにおいては骨面の片側において骨芽細胞が骨基質を添加し、反対側において破骨細胞が骨を吸収する^{4,6}。これは骨面で広く起こり、骨の複雑な変化を含む。例えば頭蓋骨では、球形を保つために同じ骨面内でも場所によって骨形成及び吸収の速度は一定ではないと考えられる¹ (図 1.2)。また、長管骨の骨端部のような複雑な形状を持った部分では、より複雑な骨形成及び骨吸収のパターンを描くと考えられている⁷。後で詳しく論じるが、このような複雑な骨形成、吸収がどのように制御されているのかは不明である。

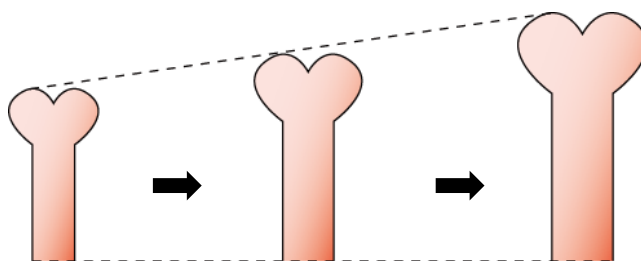


図 1.1 大腿骨におけるマクロモデリングの過程

大腿骨関節部における骨モデリングの模式図¹。骨格の成長により、骨は基本的形状を変えずに大きくなる。このような成長過程を骨モデリング、特にマクロモデリングという。

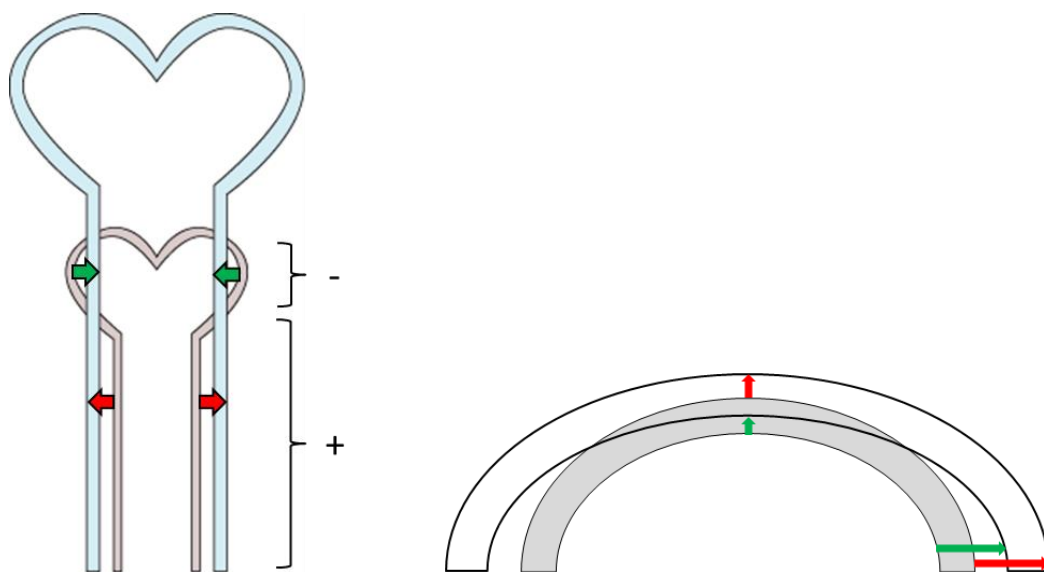


図 1.2. 骨モデリングの模式図

(左図) 長管骨における骨モデリング¹。成長前の骨をピンク、成長後の骨を水色で表している。緑矢印は破骨細胞性骨吸収面(－)における吸収方向、赤矢印は骨形成面(＋)における形成方向を表す。一つの骨面において吸収面と形成面が存在することがわかる。(右図) 頭蓋扁平骨における骨モデリング。辺縁部では骨の吸収(緑矢印)と形成(赤矢印)が中心部よりも早く進む。

1.2.5 ミニモデリング

Wolff は「骨は力学的環境に併せて形成または吸収を行い、その強度を維持するのに適した形に調整される」という Wolff の法則を提唱した¹。ミニモデリングはこの Wolff の法則に則って Frost が提唱した骨形態形成様式の仮説の一つであり、力学的負荷に伴った骨梁の移動などの際に起こる光学顕微鏡レベルの骨組織の形態変化のことを指す⁵。骨梁は骨髓腔内に存在する、海綿骨によって構成された網目状の構造のことを言う。骨梁の機能は骨に外力に対する抵抗性を与えるものであると考えられている。Frost はこのミニモデリングは個体の生涯を通して起こるだろうと仮説を唱えたが、Kobayashi らの臨床実験により、実際に成人の腸骨海綿骨でこのミニモデリングが起こっていることが証明された^{8,9}。ミニモデリングはマクロモデリングと同じように、片面での骨形成と反対面での骨吸収によって起こるとされている。ミニモデリングに関する報告は少なく、マクロモデリング同様、その細胞学的、分子学的な制御については

不明である。

1.2.6 骨リモデリング

骨リモデリングは個体の生育期が終わり成体となった後に起こる改変様式で、骨に受けた微小損傷を回復し、骨組織の恒常性を保つために行われるものである⁹。骨リモデリングは基本多細胞単位 BMU (basic multicellular unit) と呼ばれる微小な構造内で行われる。リモデリングはその骨形成の過程が休止状態から活性化、吸収、逆転、形成、休止の順序をたどることによって起こる¹。通常骨面の約 80% は休止状態にあるが、活性化が起こると破骨細胞が骨面に誘導される。その後吸収期に移り、破骨細胞が骨吸収を開始する。吸収期の終了後、破骨細胞は骨基質から離れ、マクロファージが吸収窩に残存した有機物などを分解し、引き続く骨形成のための環境を整える。形成過程では吸収された骨基質を補うように骨芽細胞が活発に骨吸収を行う。これにより、骨リモデリング前と後ではマクロ的観点でも微小的な観点から見てもその構造に変化は起こらないが、骨はこれによって絶えず作り変えられて修復され、恒常性が維持されることになる。

以上に述べたとおり、骨の初期発生、ボディプラン完成後の成長や環境への適応、組織の細かな修復は、膜性骨化及び内軟骨性骨化、または骨モデリング及び骨リモデリングによって制御される。次節ではこれらのシステムを司る、骨芽細胞と破骨細胞について詳しく述べる。

1.3 骨芽細胞と破骨細胞

1.3.1 骨芽細胞

骨芽細胞は骨形成を司る細胞である。骨表面に広く並んで分布し、Type I collagen などの骨基質の有機成分の大部分を分泌している¹。その機能は骨基質の分泌のみにとどまらず、IGF や BMP, TGF- β などのサイトカインを産生して骨基質中に蓄えることや、骨の石灰化部位の決定、後述の破骨細胞の分化や誘導にも重要な役割を果たす。

骨芽細胞は間葉系幹細胞に由来する細胞である。間葉系幹細胞は組織中に豊富に存在する細胞であり、軟骨細胞や筋芽細胞、脂肪細胞に分化する³。間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化には転写因子 Runx2 及び Osterix が関与している。Runx2 は骨芽細胞前駆細胞で発現する転写因子であり、Osterix の上流で発現する。組織中に多数存在する間葉系幹細胞がどのようにして骨芽細胞系への分化を決定するかについては不明な点が多いが、骨形成誘導タンパク質である BMP は未分化間葉系細胞の筋芽細胞への分化を抑制すると共に、BMP → Smad → Runx2 というカスケードを通して骨芽細胞への分化を促すということがわかっている¹⁰。またメカニカルストレスが豊富に与えられると骨芽細胞に、ストレスが弱い場所であれば脂肪細胞に分化するという報告¹¹などにも見て取れるように、骨形成においては周りの環境から必要なタイミングで与えられるシグナルによって、組織中の間葉系幹細胞から骨芽細胞が供給されるような仕組みになっていると考えられる。

1.3.2 破骨細胞の機能

破骨細胞は骨吸収を司る多核の細胞である³。破骨細胞の細胞膜は明帯、波状縁、血管側細胞膜の3種類に区分される(図 1.3)。明帯は骨基質との接着に関与する部位で、その細胞膜にはインテグリン $\alpha_v \beta_3$ が局在しており、オステオポンチンなどを介して骨基質に接着すると考えられている。また、明帯にはアクチンフィラメントが網目状に発達しており、アクチンリングを形成している。アクチンリングの内部には波状縁と呼ばれる、細胞膜が細胞質側に陥入してできるひだ状の構造が形成される。破骨細胞は波状縁によって骨吸収を行うことにより、吸収窩と呼ばれる骨吸収を効率的に行うための環境を構成する。波状縁上には液胞型プロトン ATPase が発現し、細胞質で産生されたプロトン(H^+)を骨基質側に放出することによって吸収窩内が pH3~4 の酸性環境に保たれる。これにより骨の無機質であるハイドロキシアパタイトは分解される。そして、波状縁から分泌されたカテプシン K、MMP9 などのプロテアーゼによってコラーゲンなどの骨の有機質が分解される。このようにして吸収窩内で分解された骨はトランス

サイトーシスによって波状縁とは反対側にある血管側細胞膜から排出される。

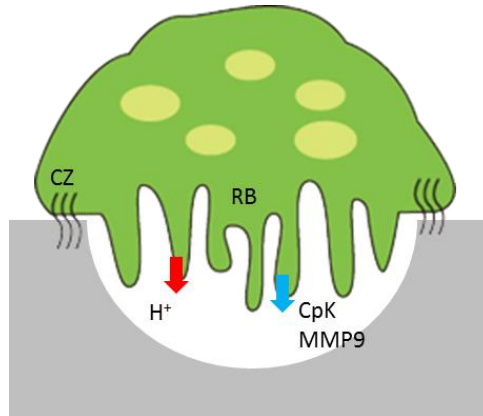


図 1.3 破骨細胞の形態

破骨細胞は明帯(CZ)によって骨基質に接着する。明帯の内側はひだ上の波状縁(RB)が形成され、そこからプロトン(H^+)が放出され吸収窩内が酸性に保たれる。また波状縁からはカテプシン K(CpK) 及び MMP9 などのプロテアーゼが分泌され、骨の有機質が分解される¹。

1.3.3 破骨細胞の骨吸収能の調節 ―分化と生存の調節―

上記であげたような破骨細胞の骨吸収能は、主に前駆細胞からの分化、分化後の細胞の機能及び生存によって調節される¹。本節では、本研究に大きなかわりのある破骨細胞の分化調節及び生存調節に触れる。

破骨細胞の分化については *in vitro*, *in vivo* の両方で広く研究がなされている。破骨細胞はその由来を単球・マクロファージに置く血球系細胞である^{12,13}。破骨細胞の分化に関わるシグナルは多数報告されているが、分化に必須の因子として骨芽細胞に由来する M-CSF と RANKL が挙げられる。M-CSF 及び RANKL のノックアウトマウスは重篤な大理石病を呈し、出生直後の骨組織に破骨細胞が認められないなどの破骨細胞分化について著しい障害を示す^{14,15}。破骨細胞前駆細胞は M-CSF の受容体 c-fms を発現しており、骨芽細胞及び骨髄ストローマ細胞が産生する M-CSF が受容体に結合することで、前駆細胞は分化及び増殖を行う¹⁶。また RANKL は膜型のリガンドで骨芽細胞の細胞膜上に発現している¹。破骨細胞前駆細胞

胞は RANKL を発現する骨芽細胞に接触し、受容体である RANK にリガンドを結合させることで分化及び増殖のシグナルを受け取る。

破骨細胞前駆細胞は M-CSF 及び RANKL の刺激を受けた後、c-fos, NFATc1 などの転写因子が発現することで単核の破骨細胞となる¹⁷。単核の破骨細胞は、その後細胞融合により多核の成熟破骨細胞になり、活発に骨吸収を行うようになる。

単核の破骨細胞への分化とは異なり、多核破骨細胞への分化機構、特に細胞融合がどのように誘導され、完了するのかについては不明な部分が多い。現在、破骨細胞の多核化におけるマスター遺伝子として考えられているのは DC-STAMP である。DC-STAMP は破骨細胞の膜状に存在する受容体で、DC-STAMP 欠損マウスには多核の破骨細胞が認められない¹⁸。その発現は Vitamin E によって促進されることが明らかになっているが¹⁹、その他の DC-STAMP の発現調節機構や、DC-STAMP シグナルによって破骨細胞がどのように細胞膜構造を変化させるのかは不明である。

破骨細胞の骨吸収能力は、このような多核細胞への分化による調節のみでなく、細胞の生存によっても調整される。破骨細胞は細胞分裂能を持たず、一度分化が終了すると短期間で死滅し、その際の細胞死はアポトーシスによって起こることが明らかになっている¹。上記で破骨細胞の分化に重要であると述べた RANKL 及び M-CSF は、破骨細胞のアポトーシスに対して抑制的に働く^{1,20}。

以上に述べたように、破骨細胞の分化、増殖、生存は骨芽細胞によって産生されるサイトカインに左右されている部分が多い。このことから骨芽細胞の存在は、破骨細胞の分化及び生存を始めとした様々な生理状態に大きな影響を及ぼすものと考えられる。現に、破骨細胞を効率的に培養するためには骨芽細胞との共培養が必須である³。また Runx2 のノックアウトマウスでは、多核の破骨細胞数が大きく減少することから²¹、*in vitro*, *in vivo* 両方において、骨芽細胞は破骨細胞の骨吸収能の調節という重要な役割を持っていると言える。

1.3.4 骨モデリングにおける骨芽細胞と破骨細胞

骨リモデリングでは **BMU** における破骨細胞と骨芽細胞の共役が起こることが知られており、そのカップリングファクターが作用する仕組みについても多くの報告がある⁶。一方、骨モデリングについては骨芽細胞と破骨細胞が作用する面が離れていることから、両者間には相互作用はなく、それぞれ独立して骨形成と骨吸収を行うとされている。しかしながら多数の研究が行われている骨リモデリングに比べ、前述したように骨モデリング、特にミニモデリングにおける細胞学的な研究は非常に少なく、相互作用の存在を否定しきれているとは言えない。特に 1.2.4 節で述べたように、哺乳類の骨モデリングにおける破骨細胞の骨吸収は一様ではないと考えられており、それらの時空間的な吸収活性の制御が、骨形成との相互作用なしに単独で行われているとは考えにくい。特に頭蓋骨の厚みは破骨細胞と骨芽細胞の活性のバランスによって決められており^{22,23}、両者が何らかの相互作用を取りながら吸収、形成のバランスを取って骨の **shaping** を行う可能性が示唆されている。また前述したように骨芽細胞は多くの機会において破骨細胞の吸収能を調節する重要な役割を持っており、これらの骨芽細胞が持つ骨吸収能の調節機能が骨モデリング時に働いている可能性は十分にあると考えられる。

1.3.5 骨モデリング研究における問題点

骨モデリング研究が盛んに行われていない原因の一つに、その系の複雑さが挙げられる。現在骨研究には哺乳類が広く用いられているが、その骨、特に長管骨などは複雑な構造をしている。それ故、骨の微小構造内で起こる骨リモデリングとは異なり、ダイナミックな形状の変化を伴い、時空間的に異なる複雑な動きをする骨モデリングを解析することが困難であるという問題がある。また、哺乳類の骨は巨大な上に硬く、組織化学的解析も困難である。さらに生涯を通してある程度の頻度で起こる骨リモデリングとは異なり、マクロモデリングは成育期のみ行われ、またミニモデリングは頻度が非常に低いために解析には向かない。

以上のことから、1.3.4 節に述べたような仮説を証明するような研究を行うためには、まず骨

モデリング研究を行う上で最適なモデル系を探すべきであると考えた。そこで私は骨研究領域で優れたモデル生物として近年注目を集めているメダカに着目した。

1.4 メダカ

1.4.1 モデル生物としてのメダカ

メダカは古くから日本で親しまれてきた淡水魚であるが、近年その脊椎動物のモデル生物としての有用性が注目されてきている²⁴。メダカはゼブラフィッシュなどの他の小型魚類モデル生物と同様に体が小さく、簡単な流水システムさえあれば小スペースで多数の個体を飼育することができる。それに加え、メダカは四季による気温の変化の厳しい日本の川や池などに生息する生物であるため、生息可能水温域が 4℃から 40℃と、ゼブラフィッシュの 20℃から 30℃に比べて幅広い。塩分などのその他の環境変化にも強く、実験のための動物の維持管理が容易であると言える。

メダカのゲノムサイズは 800MB と、ゼブラフィッシュの 1700MB に比べて小さい。また、北方系と南方系の純系が確立されており、ゲノム解読も終了している。さらに、メダカは単純な水温と照明時間の管理によって、一年を通して毎日 20～30 個程度の卵を産むことができる。卵が体外発生する点も踏まえると、メダカに対する遺伝子操作は他のモデル生物に比べて比較的容易であり、これまでに様々なトランスジェニック(以降 Tg と表記する)ラインや変異体が作製され、それらを用いた解析は発生生物学において重要な知見をもたらしている。

1.4.2 メダカと骨研究

骨研究、特に骨モデリング研究において、メダカは非常に有用であると言える。椎骨を例に挙げると、ゼブラフィッシュの第一椎骨の石灰化開始は 9 dpf (dpf: day post fertilization)で、すべての脊椎骨の石灰化が終わるのは 14 dpf 以降である²⁵。一方、メダカは 4 dpf、すなわち孵化 2 日前には第一椎骨の石灰化が始まり、出生直後(6 dpf)の段階では脊椎骨のほとんどが

石灰化を終えている²⁶。

また、ゼブラフィッシュは体表に縞があるうえ、発生と共に体が不透明になっていくが、メダカは稚魚期においては透明度の高い身体を持っているため、骨のボディプランが完成して骨モデリング期に移行した後も個体を生かしたまま骨組織全体を見ることができる。特に、Tg ラインを用い、骨に関係する細胞、すなわち骨芽細胞及び破骨細胞の骨モデリング期における動態を *in vivo* で個体を生かしたままライブイメージングできるという強力な利点を持つ。

1.4.3 メダカの骨芽細胞

メダカの骨芽細胞の Tg ラインが初めて発表されたのは 2007 年である²⁶。これを皮切りに、様々な分化段階の骨芽細胞系 Tg ラインが作製され、上記のようなメダカの特性と合わせて骨形成に関する様々な知見を残してきた²⁷。特に骨形成異常の変異体と Tg ラインを組み合わせた研究により、遺伝学的な背景と骨芽細胞の動きを合わせた解析が可能になり、より深い骨形成に関する知見を得られるようになった^{28,29}。

1.4.4 メダカの破骨細胞

メダカにも哺乳類同様、破骨細胞が存在する。当研究室において作製された TRAP-GFP Tg ラインにより、世界で初めて生理的な条件下での破骨細胞の *in vivo* イメージングに成功した³⁰。この研究によりメダカにおいて哺乳類と同様に、TRAP 及びカテプシン K を発現する単核及び多核の破骨細胞が存在することが明らかになった。単核の破骨細胞が生体内で細胞融合し、多核の破骨細胞に分化する様子を *in vivo* で初めてとらえており、多核破骨細胞は哺乳類同様の細胞形態(波状縁、明帯)を持つことが明らかになった。さらに、ゼブラフィッシュの *c-fms* 変異体を用いた解析により、この変異体においては破骨細胞の数が減少し、その結果として大理石病に似た表現型を示すことが明らかになった。また、メダカにおいて RANKL の過剰発現によって骨粗鬆症様の表現型を示すことも報告されており³¹、これらのことから小型魚

類においても哺乳類同様の破骨細胞の分化機構が存在し、破骨細胞の骨吸収能力が正しく調節されることが骨モデリングに重要であるということが示唆された。

メダカの破骨細胞が局在する組織は脊椎骨と歯に限られている。特に咽頭歯骨という、咽頭部に多数存在する歯を支えている骨は、破骨細胞がメダカ生体内において最も早く出現する場所であり、生涯にわたって多数の破骨細胞が局在し続けることが分かっている³²。咽頭歯骨には神経棘に存在する破骨細胞同様、多核で波状縁を持つ TRAP 陽性の破骨細胞が存在することが明らかになっているが、その役割は長らく不明であった。近年、この咽頭歯骨において頻繁に歯交換が行われることが示され、咽頭歯骨に存在する破骨細胞はこの歯交換において骨組織の改変を担っていることが示唆された³³。

次節ではこの咽頭歯と歯交換について触れ、歯交換時における骨の改変が骨モデリングのモデル系となりうることを説明する。

1.5 咽頭歯

1.5.1 歯

歯は口腔内に存在する硬組織で、その発生は口腔上皮と神経堤細胞由来の間葉系幹細胞の上皮—間葉相互作用によって進む³⁴。歯の最終的な形状や、本数、歯列の構成などは種によって様々であるが、その発生の制御機構は生物に共通の部分が多い。

組織学的には骨組織と同様にハイドロキシアパタイトが主成分の硬組織であり、上皮由来のエナメル芽細胞によって作られるエナメル質(魚類ではエナメロイド³⁵)と、間葉由来の象牙芽細胞によって作られる象牙質を主な構成組織とする。歯の中に存在する歯髄には血管や神経が豊富に存在している。哺乳類において、歯は口腔上皮から突出した歯冠と顎骨中に埋まっている歯根からなり、歯根と顎骨の間は歯根膜という繊維性結合組織が繋いでいる。

歯の主な機能は摂食である。そのため、日々咬合力によって強いメカニカルストレスを受ける組織である。哺乳類の歯においてこの咬合力の緩衝役として働くのが歯根膜である。歯根

膜は常にリモデリングを繰り返しており、これが歯の恒常性の維持に関与していると考えられている。

1.5.2 咽頭歯

魚類の歯は哺乳類のように口唇の裏側に生えたと決まっておらず、口腔内のいたるところに発生する。たとえば顎骨上に生えた歯は顎歯、口蓋に生えたものは口蓋歯と呼び、咽頭部分に生えるものを咽頭歯と呼ぶ³⁶。どの歯を持つかは種によって様々であるが、メダカは顎歯と咽頭歯の二種類を持つ³³。

咽頭歯は哺乳類の歯とは異なり、単純な円錐状の形をしている。咽頭歯の底部には繊維性結合組織があり、それを介して咽頭歯は真下にある骨組織に結合している。この、咽頭歯を支える骨組織を歯足骨と呼ぶ。この構造は魚類に多く認められる歯の基本構造である³⁵。

歯足骨は咽頭歯骨の構成要素の一部であり、咽頭歯と歯足骨の複合体を成熟歯と呼ぶ。咽頭歯は成熟歯列を作っており、咽頭歯骨内には複数の列が平行に並んで存在している。その列の間には成熟歯と生え変わるための歯胚と呼ばれる未熟な歯が存在している。

咽頭歯は食物の咀嚼及び嚥下の機能を持つ。また、摂食や呼吸に伴って口腔内に流れ込んできた水から微小なゴミを取り除くためにもあるとされている。

1.5.3 歯交換

歯を持つ生物の多くはその恒常性維持のために歯交換機構を持つ。その機構は生物種によって様々であり、歯の交換回数だけ見ても、哺乳類は生涯の内一度歯を交換する二生歯性生物なのに対し、魚類は生涯にわたって何度も歯交換を行う多生歯性生物である。

歯交換は口腔外から突出した機能歯が、口腔上皮内に埋まった歯胚で発生中の、交換用の歯と置き換わることによって達成される。例えば、ヒトは乳児期には機能歯である乳歯と、歯胚中に永久歯を持っている(図 1.4 A,B)²。永久歯は顎骨の成長に伴って萌出運動を起こす。

永久歯の萌出に伴い、乳歯は歯根が吸収され、垂直方向に押し出されて脱落する。これを垂直交換という。永久歯の萌出後、新しい歯胚は形成されないため、一度歯交換が起こるとその後歯は生えてこない。

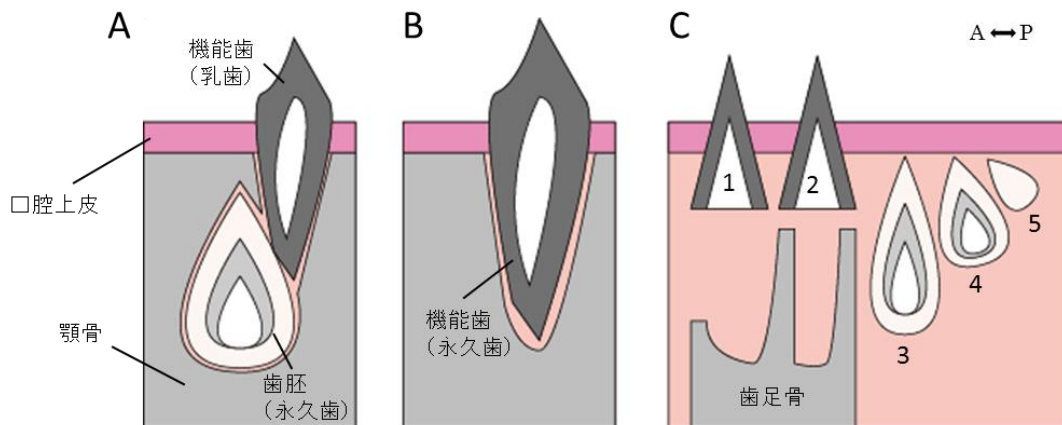


図 1.4 ヒトとメダカの歯交換単位

(A, B)ヒトの歯交換の模式図²。(A)乳児期のヒトにおいて、機能歯である乳歯の下には将来永久歯になる歯胚が局在している。永久歯の萌出に伴い、乳歯は脱落する。(B)永久歯が生えた後のヒトの歯。機能歯となった永久歯の下にはもはや歯胚はないため、これ以上の生え変わりは起こらない。(C)メダカにおける tooth family の模式図。メダカの tooth family は 5 本程度の歯から成る。模式図中の tooth family には2本の機能歯(1, 2)と3本の歯胚(3-5)が存在する。機能歯は歯足骨に繊維性結合組織をもって結合しているが、歯胚には歯足骨は無い³³。A: anterior, P: posterior.

一方、多生歯性の生物のいくつかは tooth family(歯族)という、複数の機能歯と歯胚が AP 軸に沿って並んだ単位を構成し、水平交換と呼ばれる交換様式によって歯交換を達成する(図 1.4 C)³⁷。この交換方式においてはまず family の最も posterior 側で新しい歯胚の形成が始まる。新たな歯胚の発生スペースを確保するため、family を構成するその他の歯は anterior 側へと移動する。移動に伴いながら歯は発生ステージを進めるため、歯胚の内の一つは萌出し、最も発達した歯は脱落する。これらはすべて連続した運動であり、tooth family を構成する歯は常に移動しながら脱落や萌出を繰り返すと考えられている。哺乳類とは異なり、多生歯性生物では歯の交換に伴って新しい歯胚が形成される。それにより歯の脱落后も tooth family の

恒常性が保たれるため、多生歯性生物では生涯にわたって歯が生え変わる。メダカの咽頭歯も 5 本程度の歯から成る **tooth family** を形成することがわかっており³³、咽頭歯は水平交換によって交換すると考えられる。

しかしながら歯交換の過程については不明な点が多く残っている。すなわち、歯が顎骨等の骨組織と密接に関係しているため、歯のみの移動が起こるとは考えにくく、歯の移動に伴って骨組織の改変が起こるとされているが、その機構は良くわかっていない。

メダカについて言えば、機能歯において、咽頭歯は歯足骨(図 1.4 C)と繊維性結合組織によって結合しているため、脱落に際してこの構造を壊さなければならない。また、生え変わり用の歯である歯胚には歯足骨が存在しないため、萌出に際して新たに骨組織に結合しなければならない。このようにメダカの歯交換において、断続的な歯足骨の改変が起こると考えられるが、その組織学的または細胞学的な仕組みは不明のままである。

前述したように、この歯足骨には多数の破骨細胞が局在することが明らかになっている。以上を踏まえたうえで、私は歯足骨には歯交換に伴った頻繁な骨モデリングまたは骨リモデリングが存在すると考えた。

1.6 本研究の意義

本研究は、歯交換中の歯足骨の代謝は優れた骨モデリングのモデル系であるということを、骨の詳細な組織学的な解析と、*TRAP-GFP/osterix-DsRed* ダブル Tg ラインを用いて破骨細胞及び骨芽細胞を同じ組織内で同時に可視化することによって証明した。またこのモデル系を用いて、破骨細胞の分化について、さらに破骨細胞及び骨芽細胞の骨モデリングにおける役割について検証した。その結果、破骨細胞は正常な骨モデリングに必須であり、破骨細胞の分化や生存が骨芽細胞によって調節されることで骨モデリングが統率されていることが示唆された。本研究は、哺乳動物の複雑な解析系においてはその存在が不確かであった骨モデリングにおける骨芽細胞と破骨細胞の相互作用を示唆するものである。

第二章 メダカ咽頭歯の歯交換に伴った骨モデリング

2.1 背景と目的

歯は毛や爪などと同様に皮膚付属機関に分類される器官であり、哺乳類においては繊維性結合組織である歯根膜を介して顎骨に結合している³⁴。硬組織の一種である歯はエネルギーの補給という、生命活動において必須の役割を担う摂食行動において重要な働きを持っている。それと同時に摂食による咬合力からくるメカニカルストレスを日常的に受ける器官であり、その力学的負荷によるダメージからいかにして歯を守り、恒常性を維持するのかということは生命にとって死活問題であると言える。

歯を持つ生物はその恒常性を維持するために歯交換機構を備えている。その機構は種によって様々であり、多くの哺乳類は一生のうち一度、乳歯から永久歯への歯交換を行うが、魚類をはじめとした多生歯性生物は生涯にわたって何度も歯を生え変わらせることができる³⁶。

魚類のいくつかの種における歯交換は **tooth family** と呼ばれる単位の中で行われる。**tooth family** は発生ステージの異なった複数の連続発生した歯から構成されており、口腔上皮から突出した機能歯と、歯堤中に埋まった未熟な歯である歯胚から成る。**tooth family** は歯交換のために AP 軸方向に沿って発達した歯ほど **anterior** 側に配置されるように一列に並んでおり、ヒトのように垂直方向に歯が交換するのではなく、水平方向に交換する。

歯交換は水平、垂直などの様式に関わらず、萌出、移動、脱落

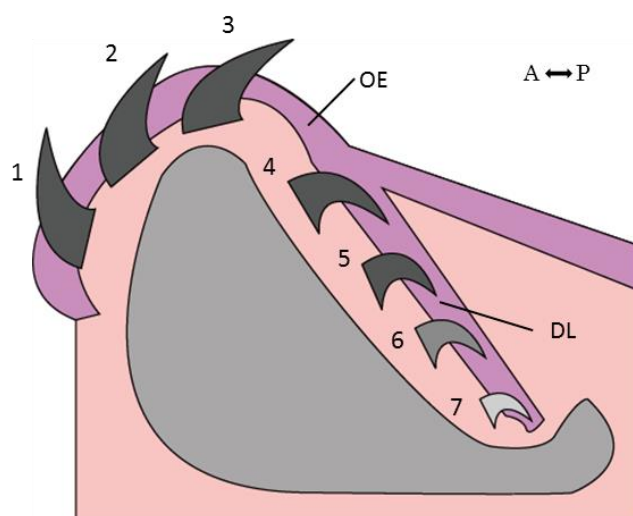


図2 サメの **tooth family**

口腔上皮 (OE) から突出した機能歯 (1-3) と歯堤 (DL) 中に埋まった歯胚 (4-7) が確認できる³⁵。口腔上皮は **anterior** 側へと動いており、その動きによって機能歯 1 は口腔外へと脱落する。2-7 の歯は上皮と共に **anterior** 側に動き、2 は 1 の位置に、といったように、ひとつ前の番号の位置へと移動する。4 の歯胚は 3 の位置に移動した後萌出し、機能歯となる。新しい歯胚が 7 の位置に形成される。

の連続した過程によって達成される。水平交換を行う種の中で最も有名なサメを例に、歯の水平交換について説明する(図 2)。その歯交換の初めには、tooth family の最も posterior 側の歯堤内に新しい歯胚が形成され始める。それに伴って、その他の tooth family を構成する歯は、成長を続けながら anterior 側へと移動する。歯胚の中で最も発達した歯(図 2 中の 4 の歯)は図 2 中の 3 の歯が存在していた位置まで移動した段階で萌出ステージになり、萌出を行って機能歯になる。tooth family の中で最も anterior 側に存在していた機能歯(図 2 中の 1 の歯)はこの移動により口腔外へと脱落する。このように tooth family を構成する歯はベルトコンベア式に移動しながら交換される。軟骨魚類であるサメの歯は口腔上皮下の繊維性結合組織に埋まるのみで顎骨には結合していないため、歯の移動は骨組織によって制限されない。

硬骨魚類であるメダカも多生歯性生物であり、その tooth family の並びから水平交換を行うと考えられる。近年、咽頭歯と呼ばれる咽頭部分に存在する歯において生涯を通した歯交換が行われることが明らかになった³³。しかしながらサメとは違い、メダカの咽頭歯は歯足骨という骨組織に繊維性結合組織を介して結合しており、歯は一定の位置に骨によって固定されている。そのため歯交換に伴ってどのようにして歯の萌出、移動、脱落が行われるのかは不明のままであった。本章では、咽頭歯において歯交換に伴って歯足骨がダイナミックに作り変えられることを、骨標識法を用いた詳細な組織解析によって明らかにし、またその骨構造の改変と、骨形成を行う細胞である骨芽細胞及び骨吸収を行う細胞である破骨細胞がどのように関係するのかについて、TRAP-GFP/osterix-DsRed ダブル Tg ラインによって各細胞を可視化することによってアプローチした。

2.2 材料と方法

2.2.1 実験動物と飼育方法

メダカ (*Oryzias Latipes*) は南方系の系統 Cab を用いた。Cab は近藤分化誘導プロジェクトの古谷一清木誠博士から供与して頂き、当研究室で継代しているものを用いた。成魚及び稚

魚の飼育水は、水道水を活性炭のカラムに通して塩素を除去したものを汲み置きして用いた。成魚の飼育環境では熱帯魚用フィルターマット、多孔質な小石（濾材）の 2 層からなる濾過ユニットで循環し、水温はヒーターで 26℃に保った。一週間に 1 度水槽の 1/2～1/3 程度の水をサイホンで汲み出し、飼育水の交換を行った。稚魚を用いた実験では、稚魚を 30℃のインキュベーター内において3日に一度程度水を替えながら止水で飼育した。餌は、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、成魚にはブラインシュリンプエッグス（ミヤコ化学株式会社）、おとひめ B1（日清飼料）を組み合わせ用い、この餌をメダカに 1 日に 2 度与え飼育した。照明を明 14 時間、暗 10 時間の周期タイマーを用いて調整し、1 年を通して産卵できる環境にした。

本章で使用した Tg ライン;TRAP-GFP³⁰ は茶谷昌宏助教から、*osterix-DsRed*²⁸ は猪早敬二助教から供与いただき、それを掛け合わせてダブル Tg ラインを得た。

2.2.2 試料の固定

成魚はトリカインで深麻酔を行った後にメスで断頭後、咽頭部をピンセットで切開して咽頭歯を摘出し、4%パラホルムアルデヒド（nacalai tesque）/PBS に浸して 4℃で一晩振盪して固定した。稚魚は氷上で麻酔後に個体ごと 4%パラホルムアルデヒド（nacalai tesque）/PBS に浸し、4℃で一晩振盪して固定した。成魚については1匹分の咽頭歯に対して 1.2 ml の固定液を、稚魚についてはサンプルが固定液の 1/50 以下の体積になるようにして固定を行った。

2.2.3 アリザリンレッド染色（成魚咽頭歯）

アリザリンレッド染色は石灰化組織を赤く染める染色法である。前述の方法に従って試料を固定した後、PBST（0.1%Tween20/PBS）で 5 分間 3 回洗浄し、その後蒸留水に 5 分間置換した。次に、0.5%KOH 水溶液に 5 分間置換した。その後 4% Alizarin Red（nacalai tesque）/0.5%KOH 水溶液に浸し、一晩染色した。

2.2.4 アリザリンレッド染色(稚魚)

前述の方法に従って試料を固定した後、PBST (0.1%Tween20/PBS) で 5 分間 3 回洗浄し、その後蒸留水に 5 分間置換した。次に、0.5%KOH 水溶液に 5 分間置換した。4% Alizarin Red (nacalai tesque) /0.5%KOH 水溶液に浸し、染色度合いを顕微鏡下で確認しながら数時間～一晩染色した。

2.2.5 骨の生体染色

カルセイン及び Alizarin complexon (ALC) は、生体に投与することにより新生中の骨をラベルすることができる骨標識剤である。カルセインは緑色蛍光、ALC は赤色蛍光によって骨がラベルされる。カルセイン保存液はカルセイン(同仁)を、2%NaOH 水溶液に対して 0.5%溶液になるように溶かして調整し、ALC 保存液は Alizarin complexon (同仁) を、2%KOH 水溶液に対して 0.5%溶液になるように溶かして調整した。投与の際、飼育水を用いてそれぞれの保存液をカルセイン 2%、ALC 1.5%になるように調整した標識溶液を使用した。成魚については、20 ml の標識溶液をプラスチックカップの中に満たし、カルセイン及び ALC 共に溶液中に一時間魚を置くことで標識を行った。稚魚については 2 ml の標識溶液をプラスチックシャーレの中に満たし、カルセインは 24 時間、ALC は 12 時間にわたって稚魚を溶液中に置くことで標識を行った。成魚、稚魚共に標識は 28℃インキュベーター中で行った。標識後のサンプルは前述の方法を用い、暗条件で固定した。

2.2.6 咽頭歯の観察(whole mount)

骨染色後の咽頭歯及び固定後の Tg ラインの咽頭歯を whole mount で観察する場合の方法について述べる。アリザリンレッドによる骨染色を行った試料は、染色後 0.5%KOH 水溶液で数回洗った後、50%グリセリン/0.5%KOH 水溶液に一晩置換した。骨の生体染色及び Tg ラインのサンプルは固定後、PBST (0.1%Tween20/PBS) で 5 分間 3 回洗浄し、50%グリセリンで一

晩置換した。稚魚のアリザリンレッド染色試料については、グリセリンでの置換後に顕微鏡下で咽頭部を慎重に解剖し、咽頭歯を摘出した。

成魚由来のサンプルは、ビニールテープを数枚重ねることで土手を作ったスライドガラス上に、置換に用いたグリセロールでマウントし、組織がつぶれないようにしてからカバーガラスをかけた。稚魚由来の試料についてもビニールテープ一枚で土手を作り、同様にマウントした。骨染色試料については倒立顕微鏡または正立蛍光顕微鏡を用いて観察し、Tg ライン由来の試料については共焦点顕微鏡 (Olympus FV1000) を用いて撮影した。共焦点顕微鏡による撮影では x10 のレンズを用い、蛍光が検出できる範囲 (200 μ m ~ 300 μ m) について 2 μ m ほどの z stack 画像を取得したのち、それを FV10-ASW (ver.2.0a) 上で z 軸方向にすべて重ね合わせることで画像を得た。

2.2.7 遺伝子のクローニング

Ensembl ゲノムブラウザ (<http://www.ensembl.org/index.html>) を用いて *osterix*, *MMP9* の遺伝子配列を取得し、その配列からプライマーを設計した。配列は下記である。

osterix F, 5'-ACTGTCAGGAGCTGGAAAGACTG-3'

osterix R, 5'-AGATCTCCAACAATCCACTGCTG-3'

MMP9 F, 5'-CTGCTCTCCCAGCTGTTATTG-3'

MMP9 R, 5'-GAAATTTGCTGACCCGTATGA-3'

メダカ cDNA ライブラリーをテンプレートにし、このプライマーを用いて PCR 法によって遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子は TA クローニング法によって RNA polymerase のプロモーターを有するプラスミドベクターにクローニングした。

また *TRAP* 遺伝子が組み込まれたプラスミドは茶谷昌宏助教^{30,32}、*Type X collagen* 遺伝子が組み込まれたプラスミドは猪早敬二助教³⁸ に供与していただいた。

2.2.8 whole-mount RNA in situ hybridization (WISH 法)

1994 年に Hauptmann らによって発表された”2 Color Whole-Mount In situ Hybridization on Zebrafish and Drosophila Embryos”の方法をいくつか改変を行った。

1) プローブの合成

プローブに用いる cDNA 断片を上記「遺伝子のクローニング」の手法を用いて 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。サブクローニングしたプラスミドは 2 μ g を制限酵素によって直線化し、フェノール抽出後、エタノール沈殿処理を行い、乾燥後に 10 μ g の RNase free 水に溶解して、これを鋳型 DNA とした。全反応溶液 20 μ l 中、鋳型 DNA 5.5 μ l に対し、10 mM の DTT、1 mM の ATP、CTP、GTP、0.65 mM の UTP、0.35 mM のジゴキシゲニン UTP、0.5~1 U の RNase インヒビター (ブタ肝臓由来:TaKaRa)、40 mM の Tris-HCl pH7.9、6 mM の MgCl₂、2 mM の spermidine、10 mM の NaCl、30 mM の T7 RNA-polymerase または T3 RNA-polymerase、sp6 RNA-polymerase の組成で、37 °C で 2 時間保温し RNA プローブを合成した。RNase free DNase によって鋳型 DNA を断片化した後、塩化リチウムを用いたエタノール沈殿処理を行い、最後に 75%エタノールで沈殿を洗い、プローブに取り込まれなかった塩基の除去、精製を行った。50 μ l の DEPC 処理水と 50 μ l のホルムアミド加え全量を 100 μ l のプローブ溶液とし、プローブ溶液のうち 1 μ l を 100 μ l のハイブリダイゼーション溶液 (HB4) に加え whole-mount in situ hybridization を行った。コントロールとしてセンスプローブを用いた。

2) プロテアーゼ処理及び再固定処理

試料は固定後に、PBST (0.1%Tween20/PBS)溶液を用いて 5 分間 3 回の洗浄を行った。次に 10 分おきに 25%、50%、75%のメタノール/PBST に置換し、100%メタノールで 10 分の置換を 2 回行って脱水を行った。最後に 100%メタノールに再び置換した後 -20 °C で保存した。-20 °C で脱水を行った試料を、10 分おきに 75%、50%、25%のメタノール/PBST に置換し、PBST を用いて 5 分間 3 回の洗浄を行った。10 μ g/ml の Proteinase K (Roche) /PBST を用い

て、室温で一時間処理した後に、PBSTを用いて5分間2回の洗浄を行った。4%パラホルムアルデヒド溶液に置換し、室温で20分間の再固定を行った。再固定終了後、PBSTを用いて5分間4回の洗浄を行った。

3) ハイブリダイゼーション

試料を HB4 (50% formamide, 5×SSC, 50 μg/ml Heparin, 0.1% Tween-20, 5 mg/ml torula RNA) 中で1~5時間、65 °Cでプレハイブリダイゼーションを行った。次に HB4 100 μl に対し、合成したプローブ 1 μl の割合で調整したものをハイブリダイゼーション溶液とし、これを 80 °C で10分間加熱後、氷中に浸し10分間急冷処理してから試料溶液と置換し、65 °Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。

4) プローブの洗浄

試料を 100% HB4、75% HB4/2×SSC、50% HB4/2×SSC、25% HB4/2×SSC でそれぞれ 65 °C 15 分の条件で1回ずつ、2×SSCT (0.1%Tween-20 を含む SSC) で 65 °C15 分の条件で1回、1×SSCT で 65 °C15 分の条件で2回、0.1×SSCT で 65 °C10 分の条件で5回ずつそれぞれ洗浄し、PBST で室温 10 分の条件で4回洗浄した。

5) 抗体反応、発色反応

5%子羊血清 (GIBCO BRL) 、5%BSA (nacalai tesque)を含む PBST の中に試料を移し、室温で 1.5 時間ブロッキングし、4000 倍希釈したアルカリホスファターゼ付加した抗 DIG 抗体 (Roche) を含む PBST に置換した。4 °Cで一晩静置して反応させ、PBST で6回、室温で15分ずつ洗い、AP Buffer (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH9.5, 0.1%Tween-20) で3回、室温で10分ずつ洗った後、染色溶液 SS (337.5 μg/ml NBT, 175 μl/ml BCIP, を含む AP Buffer) に移し、室温で遮光して発色させた。発色後、PBST で置換し室温で5分間3回の洗浄を行った。

2.2.9 樹脂切片の作製

成魚の Tg ライン、生体染色を行った成魚由来の咽頭歯及び、WISH を行った試料に対しては樹脂切片を作製した。Tg ライン及び生体染色後の咽頭歯試料は、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定し、PBST で 5 分間 3 回洗浄した後、Technovit 8100 (KULZER) 浸透液を 500 μ l 加えて静置し、試料が沈むまで待った。試料が沈んだ後置換液を捨て、新たに 750 μ l の Technovit 8100 を加えて 4 $^{\circ}$ C の暗条件で一晩振盪することで完全に置換した。WISH を行ったサンプルについては 4%パラホルムアルデヒドを用いて再固定し、PBST で 5 分間 3 回洗浄した後に Technovit 8100 浸透液を 500 μ l 加えて静置し、試料が沈むまで待つて置換を完了した。置換を完了した後、Technovit 8100 と凝固剤(Hater, Kulzer Haraeus)をよく混ぜ合わせ、溶液を専用の包埋容器に満たし、その中に試料を浸漬したのちに方向を整えて固めた。樹脂が固まった後、Technovit 3040 と専用の型を用いて、容器から取り出し、適当な大きさにトリミングした後、厚さ 4 μ m で薄切した (YAMATO Rom380)。

2.2.10 メチレンブルー染色

組織を青く染める染色方法であり、染色によって核が濃く染まり、軟骨が青紫に染色される。メチレンブルー保存液はメチレンブルー 0.1 g を 95% エタノールに溶解することで作製した。保存液は暗条件で保存し、使用時には 4 倍の希釈液を切片上に数滴垂らし、30 秒ほど室温で置いた後に蒸留水で洗浄することで染色を行った。

2.2.11 DAPI 染色

DAPI は DNA に対して結合する蛍光物質であり、蛍光観察時の核染色に用いられる。紫外光によって励起され、青色の蛍光を発する。0.5 μ g/ml の DAPI 溶液で室温に切片を 20 分静置し、蒸留水で洗浄することで染色を行った。

2.3 結果

2.3.1 咽頭歯の構造

咽頭歯骨には機能的な歯である成熟歯と、未熟な状態である歯胚が存在しており、それらは斜めに傾いた AP 軸(本論文では以降この軸を A'P'軸とした)に沿って tooth family を形成することがわかっている³³。咽頭歯骨において実際に成熟歯と歯胚がどのように配置されているのかを調べるために、咽頭歯骨全体に対してアリザリンレッド染色を行った。その結果、成熟歯は左右方向に並んで成熟歯列を形成しており、咽頭歯骨上では複数の成熟歯列が平行に並んでいることがわかった(図 2.1 A, B: 矢頭)。また歯胚は各成熟歯列の間に観察された(図 2.1 A, B: 矢印)。拡大像によって詳しく成熟歯及び歯胚の状態を確認したところ、A'P'軸(図 2.1 C)に沿って歯胚(図 2.1 C: 矢頭)及び成熟歯(図 2.1 C: 矢印)が tooth family を形成している様子が観察された。tooth family 内で成熟歯はアリザリンレッド陽性の骨組織(図 2.1C: 点線)上に生えているが、歯胚はアリザリンレッド陰性の軟組織中に埋まっていた。

成熟歯列及び歯胚がどのような骨構造を取っているのか詳しく知るために、それぞれを上顎咽頭歯から単離して前方から観察したところ、成熟歯では、円錐状をした咽頭歯が結合組織を介して歯足骨に結合していることがわかった(図 2.2 A)。一方歯胚は、発生中の咽頭歯が存在するのみで歯足骨を持たなかった(図 2.2 B)。成熟歯における歯足骨の構造を詳しく確認するために、矢状及び水平方向から咽頭歯骨の樹脂切片を作製し、メチレンブルー染色を施すことで組織像を観察した。矢状切片では、二本の歯足骨が咽頭歯の下に垂直に生えて歯を支えている像が確認できた(図 2.2 C)。また水平切片では、個別の歯足骨は楕円状に観察され、多数の歯足骨が数珠つなぎ状につながることによって歯足骨列を形成していた(図 2.2 D)。以上の組織像から、一つの咽頭歯を支える歯足骨は中空の円筒状をしていることがわかった(図 2.2 E)。また、これ以降の解析では歯足骨を posterior 側と anterior 側の半分ずつに分け、posterior 側の半円柱を P 歯足骨、anterior 側の半円柱を A 歯足骨と呼ぶことにした。また、水平切片の組織像から判断して、成熟歯列は筒状の歯足骨同士が左右方向に数珠つ

なぎ状につながることによって形成されているものと考えられる(図 2.2 F)。

2.3.2 咽頭歯の発生段階

tooth family は anterior 側に行くほど発達した歯が配置されるという性質を持つ。しかしながら咽頭歯骨に生えるそれぞれの咽頭歯について、詳しいステージの違いは今までに規定されてこなかった。tooth family を構成する咽頭歯のステージを規定することを目的として、水平切片を作製し、歯または骨組織の状態の違いを観察した。その結果、歯胚における咽頭歯の形成度合い、もしくは成熟歯における歯足骨の骨構造には、歯の存在する位置によって違いがあることがわかった。そこで tooth family を構成する咽頭歯を、構造の違いによって歯胚及び成熟歯でそれぞれ3つずつのステージに分類した(歯胚:ステージ i-iii, 成熟歯:ステージ I-III)。この分類では、A'P'軸の A'側に行くほどステージが進んだ歯が局在するようになっていた(図 2.3 A)。

それぞれのステージの歯もしくは歯足骨の構造は以下のように規定した。まず歯胚について、歯胚中に石灰化組織が認められないものをステージ i、歯胚の内部には発達中の咽頭歯が認められるが、萌出していないものをステージ ii、口腔上皮を突き破って咽頭歯が萌出しているが、その下部にはまだ歯足骨が形成されていないものをステージ iii とした(図 2.3 B, C i-iii)。ステージが進むにつれ歯胚で発生中の咽頭歯は上下方向に長さを増していった(図 2.3 C i-iii)。

さらに成熟歯については、P 歯足骨が薄く幼若で、完全には A 歯足骨に結合していないと水平切片から確認できるものをステージ I とした。(図 2.3 B I: 矢印)。また P 歯足骨と A 歯足骨が完全に結合しているものをステージ II (図 2.3 B II)、発達した A 歯足骨が断片化しており、多核の細胞によって囲まれているものをステージ III とした(図 2.3 B III: 矢頭)。矢状切片でも同様に、ステージ I の P 歯足骨は薄く幼若でところどころ途切れていた。薄い歯足骨が分断している部分には細胞が密集していた(図 2.3 C I: 矢頭) また、ステージ III において A 歯足骨は

厚みがあり発達していたが、ところどころ分断していた(図 2.3 C III: 矢印)。以上の観察結果から、歯足骨列は **anterior** 側で吸収され、そして **posterior** 側で形成されることで代謝されているのではないか、という仮説を立てた。

2.3.3 歯足骨の代謝

歯足骨列の形成、吸収が実際にどのように起こっているのかを調べるために、カルセインとアリザリンコンプレクソン(ALC)を用いた二重標識実験を行った。これらの骨標識剤は体内に取り込まれると新生中の骨に沈着する。それにより、カルセインを取り込ませた時点で新生中であつた骨は緑の、ALC を取り込ませた時点で新生中であつた骨は赤の蛍光標識が施されるため、年輪のようにして標識された骨の代謝過程をトレースすることができる(図 2.4 A)²⁶。

まず歯足骨がどこで形成されているかを調べるために、カルセインの取り込みが終わった直後に咽頭歯を摘出し、水平切片を作製した(図 2.4 B、0 dpt (day post treatment))。蛍光ラベルの状態を確認したところ 0 dpt の個体では、どの歯足骨列においても列の最も **posterior** 側、すなわちステージ I の P 歯足骨が緑色蛍光によってラベルされていた。このことから歯足骨は、常に列の最も **posterior** 側で形成されることが分かった。

次に歯足骨がどこで吸収されているかを調べるために、カルセインを取り込ませた魚を飼育水中で飼育し、その後アリザリンコンプレクソンを取り込ませたのちに、咽頭歯を摘出して水平切片を作製した。その結果、4 dpt 次いで 7 dpt とラベルの間隔が長くなるごとに、カルセインラベルされた歯足骨は歯足骨列の中で **anterior** 側にシフトしていくことが分かった(図 2.4B、4, 7 dpt: 矢頭)。14 dpt においては、カルセインラベルされた歯足骨は歯列の **anterior** 側の端にわずかに認められるのみで、ほとんどが消失していた(図 2.4 B、14 dpt: 矢頭)。また、0 dpt のカルセインラベルの骨と同様に、どのサンプルでも ALC ラベルされた歯足骨が列の最も **posterior** 側に認められたことから、カルセインラベルされた歯足骨の **posterior** 側に新しく歯足骨が形成されたことわかる(図 2.4 B、4, 7, 14 dpt: 矢印)。歯足骨が常に列の最も **posterior** 側で

形成されているのにもかかわらず歯足骨列の AP 幅が変わらないこと、カルセインラベルされた骨が歯列中で anterior 側にシフトしていき最終的には消失することから、歯列は図 2.4C のように anterior 側で常に吸収されると考えられる(図 2.4 C)。この代謝により、歯足骨列は常に posterior 側へとシフトするということが示唆された。

2.3.4 咽頭歯の交換と歯足骨の代謝

上記で明らかになった歯足骨の代謝が、歯交換とどのように関係しているのかを詳しく調べるために、二重標識 7 dpt における咽頭歯骨の矢状切片を作製し、歯の萌出前から萌出完了のステージの間にある歯を観察した。歯の萌出前から萌出完了の状態にある組織は、水平切片において図 2.5 A のように観察される。萌出前の歯胚の anterior 側には、A 歯足骨がまだ完全には吸収されていない成熟歯が接していた(図 2.5 A (1))。萌出中であるステージ iii の歯胚の anterior 側には、A 歯足骨が吸収されたステージ III の成熟歯が接していた(図 2.5 A (2))。さらに萌出後のステージ I の歯の anterior 側には、カルセインラベルされた骨組織が残っていた(図 2.5 A (3))。上記それぞれの状態の組織について矢状切片を作製して観察した。その結果、萌出前の歯胚の anterior 側に存在する歯は、A 歯足骨が一部吸収された初期ステージ III の歯であった(図 2.5 B (1))。また、ステージ iii の萌出中の歯は、A 歯足骨が完全に吸収されたステージ III の歯の P 歯足骨に接するように萌出していた(図 2.5 B (2))。さらに、萌出後のステージ I の歯においては、咽頭歯とカルセインラベルの残る太く発達した A 歯足骨を繋ぐようにして、ALC 陽性の新しく形成された骨質(図 2.5 A (3):点線)が観察された。以上の組織像から、A 歯足骨が吸収されることで支えを失ったステージ III の咽頭歯は、歯の anterior 側へと脱落し、ステージ iii の歯胚は、歯胚として成長してきたその場所で、ステージ III の P 歯足骨を足場にして萌出しているということがわかった(図 2.5 C)。さらに、歯の萌出に際して iii の咽頭歯の直下に新しく形成されるのは P 歯足骨のみで、ステージ III の P 歯足骨を新たに A 歯足骨として再利用していることが明らかになった。

2.3.5 咽頭歯の代謝

歯交換を理解するためには歯足骨の代謝だけではなく、咽頭歯がどのように代謝されているのかも理解しなければならない。しかしながら成魚の歯は合わせて千本以上にのぼるため、特定の歯を識別することができず、歯交換に伴った咽頭歯の代謝過程を観察することが難しい。そこで私は歯の本数が少なく容易に個々の歯が識別でき、特定の歯の脱落過程を追うことが可能な稚魚の咽頭歯骨における歯交換について解析した。

まず、孵化直後の稚魚に対し24時間カルセインを取り込ませ、1 dph (day post hatch)における tooth family の分布を観察したところ、上顎咽頭歯骨に7個の tooth family が存在することがわかった(図 2.6 A, B)。これらの tooth family は3列に分かれて存在しており、これらの列を posterior 側から順に第1列、第2列、第3列とした。さらに第1列においては3つの tooth family が存在しており、正中線側から順番に第1族、第2族、第3族とした(図 2.6 A)。以降 tooth family を区別するために、例えば第1列の第2族の位置に存在する tooth family を 1-2 tooth family と呼ぶことにした(図 2.6 B: 赤線)。ハイフンの前の数字は列番号を、後ろの数字は族番号を表している。

成魚の歯足骨の代謝実験と同様にカルセインとALCによる二重ラベルを行い、歯胚で発生中の咽頭歯をラベルし、その代謝過程を観察した(図 2.6 C, D)。カルセインの取り込みにより、0 dpt において歯胚内で成長中の咽頭歯及び歯足骨が全てラベルされた。1-2 tooth family 内には歯胚で発生中である咽頭歯が2つあった(図 2.6 D: 矢頭)。4 dpt において、この二つのラベルされた咽頭歯のうち、anterior 側に局在していた歯の下部に歯足骨が形成されることで成熟歯へと成長し、成熟歯列に参入していた。6 dpt においては残りの咽頭歯も成熟歯へと成長した。0 dpt においてこれらの咽頭歯は tooth family の中でも最も posterior 側に存在していたが、6 dpt においては anterior 側の端まで来ていた。最終的に 9 dpt においてカルセインラベルされた咽頭歯は 1-2 tooth family から消失していた。以上の結果と、2.3.4 節の結果を合わせて考えると、咽頭歯の代謝は次のように起こると考えられる。咽頭歯は歯胚の中に発生した後も

絶対的な位置は変えずにその場で萌出するが、tooth family 内でその歯よりも anterior 側に局在している歯が、歯足骨の吸収によって脱落していく。それに伴って tooth family 内での相対的な位置が anterior 側へとシフトしていき、最終的に歯足骨が吸収される位置となって脱落する(図 2.6 E)。この代謝によって、tooth family 自体はその絶対的な位置を posterior 側へとシフトしていくものと考えられる。

2.3.6 咽頭歯骨全体の骨モデリングと歯交換

以上の結果から、歯交換は歯足骨列の posterior 側へのシフトを伴うことが明らかになった。この posterior 側へのシフトと、咽頭歯骨全体の骨モデリングにどのような関係があるかを調べるために、咽頭歯骨の成長を時系列で追った。7, 9, 11 dph の稚魚をそれぞれアリザリンレッドで染色した後、咽頭歯骨を摘出して全体を観察した(図 2.7 A)。その結果、咽頭歯骨はその外形を保ちながら相似形に大きくなっていることがわかった。成熟歯列に関しては、7 dpt では2列だったのに対し、9 dpt では3列、11 dpt では4列と、咽頭歯骨全体の外形が大きくなるごとに列が増えていることがわかった。tooth family は歯交換中の歯足骨の代謝に伴って posterior 側にシフトするという結果から考えて、咽頭歯骨の AP 軸方向への成長に伴い、既存の成熟歯列は posterior 側へとシフトし、それによって咽頭歯骨の最も anterior 側にできた空間に新しい成熟歯列が形成されるのだと考えられる(図 2.7 B)。

2.3.7 破骨細胞と骨芽細胞の局在

歯足骨の代謝に破骨細胞と骨芽細胞がどのように関係しているのかを調べるために、破骨細胞マーカーである TRAP の下流で GFP を発現する TRAP-GFP Tg ラインと、骨芽細胞マーカーである osterix の下流で DsRed を発現する osterix-DsRed Tg ラインを掛け合わせたダブル Tg ライン TRAP-GFP/osterix-DsRed を作製し、咽頭歯における蛍光シグナルを調べることでそれぞれの細胞の局在を調べた。

まず、骨芽細胞に特異的なマーカーである *type X collagen* 及び *osterix* の mRNA の発現を WISH 法によって検出し、切片を作製することで歯足骨上のシグナルの局在を観察した。結果、この 2 種類の内在性の骨芽細胞マーカーの mRNA は、ステージ II の P 歯足骨において発現していた(図 2.8 A)。さらに破骨細胞に特異的なマーカーである *TRAP* 及び *MMP9* も同様に mRNA の発現を解析したところ、この 2 種類の内在性の破骨細胞マーカーの mRNA はステージ II の A 歯足骨において発現していた(図 2.8 B)。これらの内在性の発現は Tg ラインの蛍光発現と一致していた(図 2.8 C)。

共焦点顕微鏡により、ダブル Tg ラインから摘出した上顎咽頭歯全体の蛍光像を撮影したところ、破骨細胞と骨芽細胞は成熟歯列を挟んで分極しており、それぞれの蛍光は列に沿って帯状に交互に観察された(図 2.9 A)。各細胞の歯足骨上での局在をより詳細に調べるために水平切片を作製した(図 2.9 B, C)。ステージ I において、骨芽細胞は形成中の P 歯足骨に集まっており、単核の破骨細胞は歯足骨の内側への局在を始めていた(図 2.9 C I, I')。しかしながら、これらの破骨細胞は P 歯足骨の外側には決して局在していなかった。続いてステージ II では、単核の破骨細胞と骨芽細胞の両方が歯足骨に認められた(図 2.9 C II)。最終的にステージ III では、多核の破骨細胞が A 歯足骨に局在を始めていた。特に、巨大な多核破骨細胞が脱落した咽頭歯(図 2.9 C III: 白矢印)を囲んでいる様子が、歯足骨列の最も anterior 側で頻繁に観察された。これは歯が脱落后に口腔上皮内に埋没し、破骨細胞によって吸収されることを示唆している。

さらに歯の萌出に伴った骨形成に、骨芽細胞及び破骨細胞がどのように関係しているかをより詳しく観察するため、矢状切片を作製してそれぞれの細胞の様子を詳しく観察した。咽頭歯の萌出に伴い DsRed 陽性の骨芽細胞が、骨組織の形成前から上下方向に縦長に伸びて局在を始めていた(図 2.10 A, B: 円)。萌出が完了し、P 側歯足骨が新たに作られた後は主に posterior 側外面に局在していた(図 2.10 C)。また、接続骨について見てみると、ステージ III の歯の脱落后、ステージ iii の歯が萌出する前に、接続骨が形成される予定の領域に骨芽細

胞が集中し始めていた(図 2.10 D)。萌出後も接続骨の周りには多数の骨芽細胞がおり、活発に形成を行っている様子が観察された(図 2.10 E)。さらに萌出完了後、歯足骨からはみ出した接続骨を破骨細胞が吸収し、形を整えている様子が観察された(図 2.10 F)。以上の結果から、歯足骨の代謝において、骨芽細胞は歯足骨列の形成面である **posterior** 側に集中して局在し、骨形成を行っており、また多核の破骨細胞は歯足骨列の吸収面である **anterior** 側に集中して局在して骨吸収を行っていることが示唆された(図 2.10 G)。

2.4 考察

2.4.1 骨モデリングのモデルとしての歯足骨の代謝

本章では咽頭歯の歯交換に伴い、歯足骨列が列の **anterior** 側で破骨細胞によって吸収され、**posterior** 側で骨芽細胞によって形成されることを明らかにした。本章の結果により、これらの細胞による断続的な骨改変が、咽頭歯の歯交換機構を司っていることが示唆された。

通常、骨構造の改変は骨モデリングか骨リモデリングによって行われるが、この特徴は骨モデリングの特徴に類似していた^{6,39,40}。すなわち骨リモデリングでは、破骨細胞が吸収した箇所に骨芽細胞が吸収量と等量の骨形成を行うのに対し、骨モデリングでは吸収面と形成面が断絶しており、それに伴って破骨細胞と骨芽細胞も別れて局在して別々に働く、というものである。このことから、歯交換中の歯足骨の代謝は一種の骨モデリングであると捉えることができる。

本章で明らかにしてきた歯足骨における骨モデリングの特徴は、従来のマウス等哺乳生物で用いられてきた骨モデリングの解析系が抱えている問題を解決することができると考えられる。序論で触れたように、巨大で複雑な構造を持つ骨組織は組織化学的な解析が難しい。また哺乳類の骨モデリングは複雑な形状変化を含み、骨の場所や発生ステージによって吸収及び形成の速度が異なる。そのため、切片によって微小構造を観察しても、対象の領域の骨がどのような性質を持っているのか判断がつかず、その現象が骨モデリングのうちのどのような性質を表しているのか理解しにくかった。このような理由から、哺乳類の骨モデリングについて組

織学及び細胞学的に、詳細な定量及び定性的な解析をすることは困難を極め、この領域の研究の遅れにつながっていた。

一方歯足骨における骨モデリングは、**posterior** 側へのシフトという単純な動きのみで構成されている。歯足骨列はシンプルながらも規則的な構造を持っており、その組織のコンパクトさゆえに様々な組織化学的な解析が容易である。また列内における配置位置や形状によって、観察対象の骨のステージを容易に判断することができる。そのため、形成および吸収速度などの定量的な解析や、ステージごとの細胞構成の比較、及び変異体などを用いて同ステージにおける細胞や遺伝子発現の比較といった定性的な解析が容易にできるという利点を持つ。

さらに序論に述べたように、メダカは遺伝子サイズが比較的コンパクトで、胎外発生を行い受精卵が扱いやすいということから、**Tg** ラインの作製や **TALEN** 法による変異体の作製などの遺伝操作が容易である。メダカの骨には本来哺乳類には存在するはずの骨細胞が存在しないなどの違いがあるために、哺乳類と完全に同一の骨モデリング機構を取っているとは言い切れない。しかし、複雑で扱いにくい哺乳類の骨に比べて、シンプルで扱いやすいメダカ歯足骨列は、哺乳類の骨モデリングをより単純な形にモデル化した系であると考えられ、遺伝子操作の行い易さと合わせても非常に強力な骨モデリングの解析ツールになる可能性を秘めていると言えるだろう。

2.4.2 咽頭歯骨の骨モデリングと歯足骨の骨モデリング

2.3.6 節では咽頭歯骨全体の骨モデリングと、歯足骨列の骨モデリングの関係について論じた。個体の成長に伴って、咽頭歯骨は外形を保ったまま相似形に大きさを増していた。歯足骨列は、その骨構造の改変の組織学的、細胞学的な特徴から骨モデリングを起こしていると考えられるが、歯足骨列自体は咽頭歯骨のように概形を保ったまま相似形に大きさを増すということがなかった。その代りに歯足骨列の骨モデリングは、咽頭歯骨を構成する成熟歯列の本数を増やすために働いていた。11 dph の段階では成熟歯列は4列であったが、成魚では十数

列に及ぶため、この後も個体の成長に伴って咽頭歯骨が巨大化するにつれ、歯列は増加しているのだと予想される。

以上の特徴から咽頭歯骨は基本的な構造が変わらずに全体の大きさが増すマクロモデリングを行っており、歯足骨列は咽頭歯骨の構成要素としてミニモデリングを行っているのだと考えられる。ミニモデリングは哺乳類の管状骨の骨梁において起こる骨モデリングであるが、骨梁も咽頭歯骨と歯足骨列の関係同様、管状骨の内部構成要素である。そのことから考えても、歯足骨列の骨モデリングをミニモデリングに分類するのは妥当だと考えられる。

また、ミニモデリングが持つ生物学的な意味から考えても、歯足骨のモデリングはミニモデリングと考えるべきであると言える。哺乳類の骨梁におけるミニモデリングは骨全体にかかる力学的負荷に応答して起こるとされている。歯足骨列の代謝は **tooth family** 内で起こる歯交換に伴うものであるが、歯交換は 1.5.3 節にも述べたとおり、**tooth family** 内の最も **posterior** 側に新たに歯胚が形成されることで始まる。新たに形成された歯胚のみならず、その他の **tooth family** を構成する歯胚のも成長を起こすため、歯足骨列に対して常にメカニカルストレスがかかることが想定される。そのため、骨梁内のミニモデリング同様、歯足骨列の移動は、歯胚の成長が引き起こす力学的負荷に応答して引き起こされると考えられる。

またミニモデリングは、力学的負荷に対しての抵抗という、骨が本来持つ機能を維持するために起こっているとも言えることができる。歯足骨列は多数の咽頭歯を支え、成熟歯列を維持するために存在している。咽頭歯の機能は 1.5.2 節で述べたとおり、捕食した餌を咀嚼し、それにより細くなった餌を絡めて消化管内に嚥下するものであるとされている。咽頭部の成長に伴い咽頭歯骨も大きくなり、より広い領域をカバーするようになるが、その際に列を増やさないまま咽頭歯が巨大になるよりは、徐々に歯列を増やし、それにより咽頭歯の本数を増やしていく方が、効率的に咽頭歯としての機能を果たせると考えられる。

以上のことから歯交換に伴った歯足骨の代謝は骨モデリング、特にミニモデリングの側面を持っていると考えられる。ミニモデリングについての報告は非常に少なく、メカニズムについて

は不明な点が多い。しかもそのすべてが、マクロモデリングが終わった後の骨の骨梁のミニモデリングに関するもので、マクロモデリングが行われている間の骨梁形成中のミニモデリングについては報告がない。歯足骨の骨モデリングはこのミニモデリングに関する新しい知見を供給できるものであり、また、咽頭歯骨のマクロモデリングと合わせて解析することで骨モデリングを包括的に解析できると考えられる。

2.4.3 骨芽細胞の骨形成能による分類

歯足骨の代謝系は上記のような骨モデリングに対する新たな知見だけではなく、骨芽細胞及び破骨細胞による骨モデリングの調節メカニズムについても新しい知見をもたらす可能性を秘めていると言える。本章では **tooth family** 中の歯足骨において、ステージごとのそれぞれの細胞の分布を明らかにした。その結果、骨芽細胞は骨面全体に分布が見られたものの骨形成面に集中しており、破骨細胞の局在はステージごとに異なっており、成熟破骨細胞の局在は骨吸収面のみに制限されていた。このような細胞の分布機構や機能調節について研究を行えば、骨モデリングの細胞学的なメカニズムの一端を知ることができるだろう。

まず骨芽細胞について考える。骨芽細胞は歯足骨列の **posterior** 側に集中して局在するという傾向はみられたものの、基本的には列のどのステージの歯についても普遍的に局在していた(図 2.11 A)。しかしながら、活発に骨形成が行われていたのは歯列の最も **posterior** 側に位置するステージ I の P 歯足骨のみであった(図 2.11 B: 矢印)。以上の結果から、歯足骨中の骨芽細胞を 2 タイプに分類することができると考えられる。すなわち、1 つ目は歯足骨列の最も **posterior** 側に局在し、活発に骨形成を行う骨芽細胞、2 つ目はそれ以外の箇所に局在し、骨形成はあまり活発に行っていない骨芽細胞である。私は前者を **osteoblast I** と名付け、後者を **osteoblast II** とし、これ以降の解析結果を考察した(図 2.11 C)。

2.4.4 歯足骨の代謝と破骨細胞

次に破骨細胞について考える。歯足骨のモデリングが正常に行われるためには破骨細胞に対して以下の 2 点が要求されると考えられる。まず、(1)破骨細胞による骨吸収の位置が正しく制御されること、そして(2)形成面での骨芽細胞による骨形成量と、吸収面での破骨細胞による骨吸収量のバランスがとれていることである。歯足骨が形成される前や、新しく形成している面に破骨細胞が現れてしまうと、効率的な骨形成が行われなくなる。そのため歯胚や、ステージ I における P 歯足骨の外面に破骨細胞が現れないようにしなければならない。また、多核の成熟破骨細胞がステージ III の A 歯足骨で活発に骨吸収を行うことも、歯の脱落にとって欠かせない。以上を考えると、破骨細胞が活性を持つ位置の制御は、このシステムにおいて重要な要素であると考えられる。さらに、骨吸収量が骨形成量を大幅に上回ってしまうと、歯の脱落に対して萌出が追い付かなくなるため、やがて成熟歯列がなくなるという事態に陥る。そのため、破骨細胞の活性が骨芽細胞に合わせて調節されていることも、このシステムにおいては重要である。

破骨細胞は骨芽細胞とは異なり、歯足骨上で局在パターンがステージごとに異なっていた(図 2.12)。すなわち歯足骨の形成面より *posterior* 側には存在せず、活発に骨吸収を行う多核の破骨細胞は吸収面のみに局在していた。その数も歯のステージが進むごとに増える傾向があった。このように破骨細胞の数や分化状態は、歯の発生ステージに伴っていた。破骨細胞が上記のような時空間的な活性と局在の制御を受ける仕組みとして、破骨細胞は歯の発生によって起こる様々なイベント、例えば歯足骨の形成などから影響を受けて分化及び増殖を行う、自己組織化のようなシステムがあるのではないかと考え、これ以降の章において仮説を検証するための研究を行った。

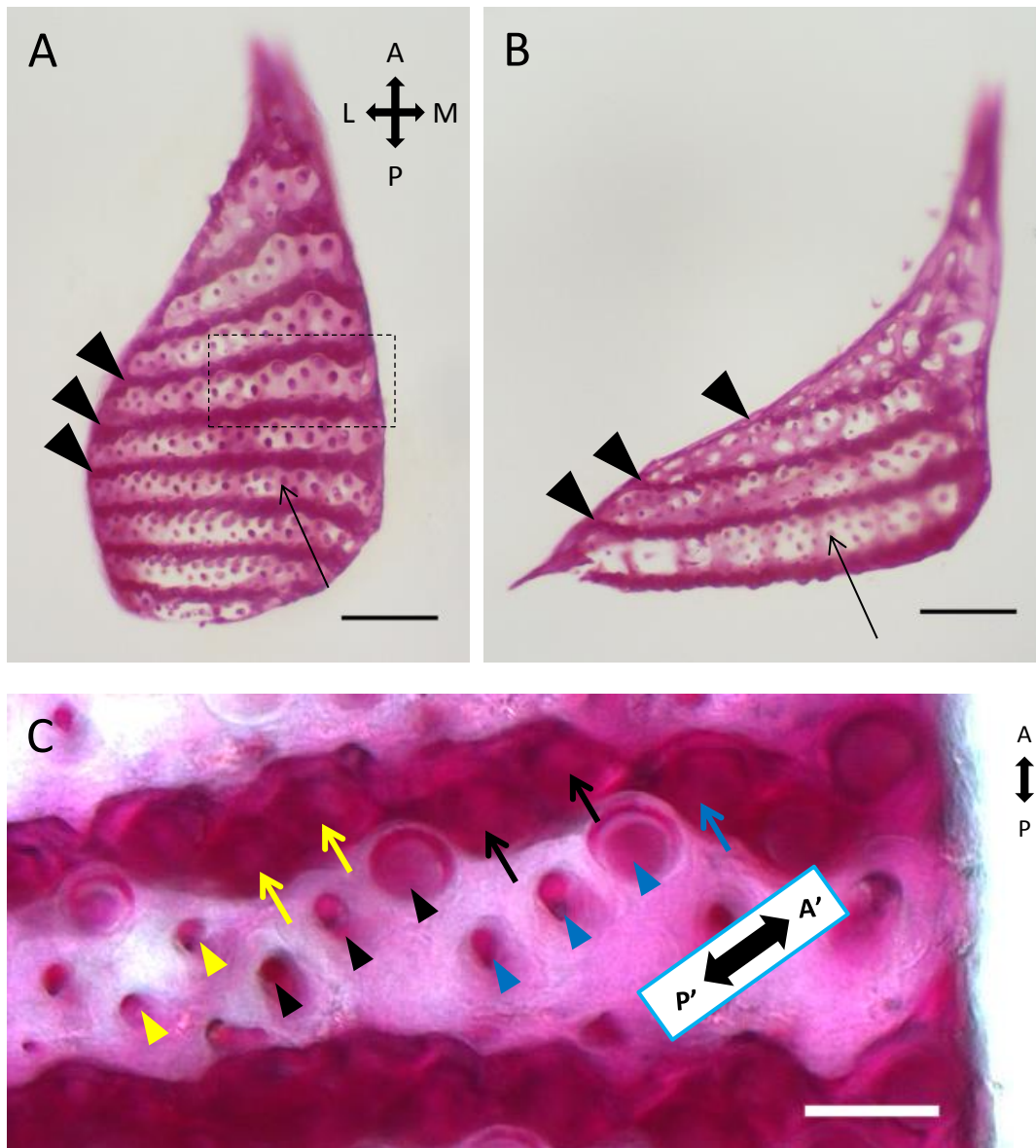


図2.1. 成熟歯と歯胚が構成するTooth family

(A, B) 上顎(A)および下顎(B)咽頭歯骨全体のアリザリンレッド染色像。赤色のライン上に見えるのが成熟歯列(矢頭)で、列間にドット状に並んで見えるのが歯胚(矢印)である。A: anterior, P: posterior, M: medial, L: lateral. (C) Aの点線四角で囲った領域の拡大像。歯胚(矢頭)は成熟歯(矢印)のposterior側に並び、A'P'軸に沿ってtooth familyを形成していた。同じtooth family内に属する歯は同じ色の矢頭もしくは矢印で表している。A': anterior, P': posterior. スケールバー: 200 μ m (A, B), 50 μ m (C).

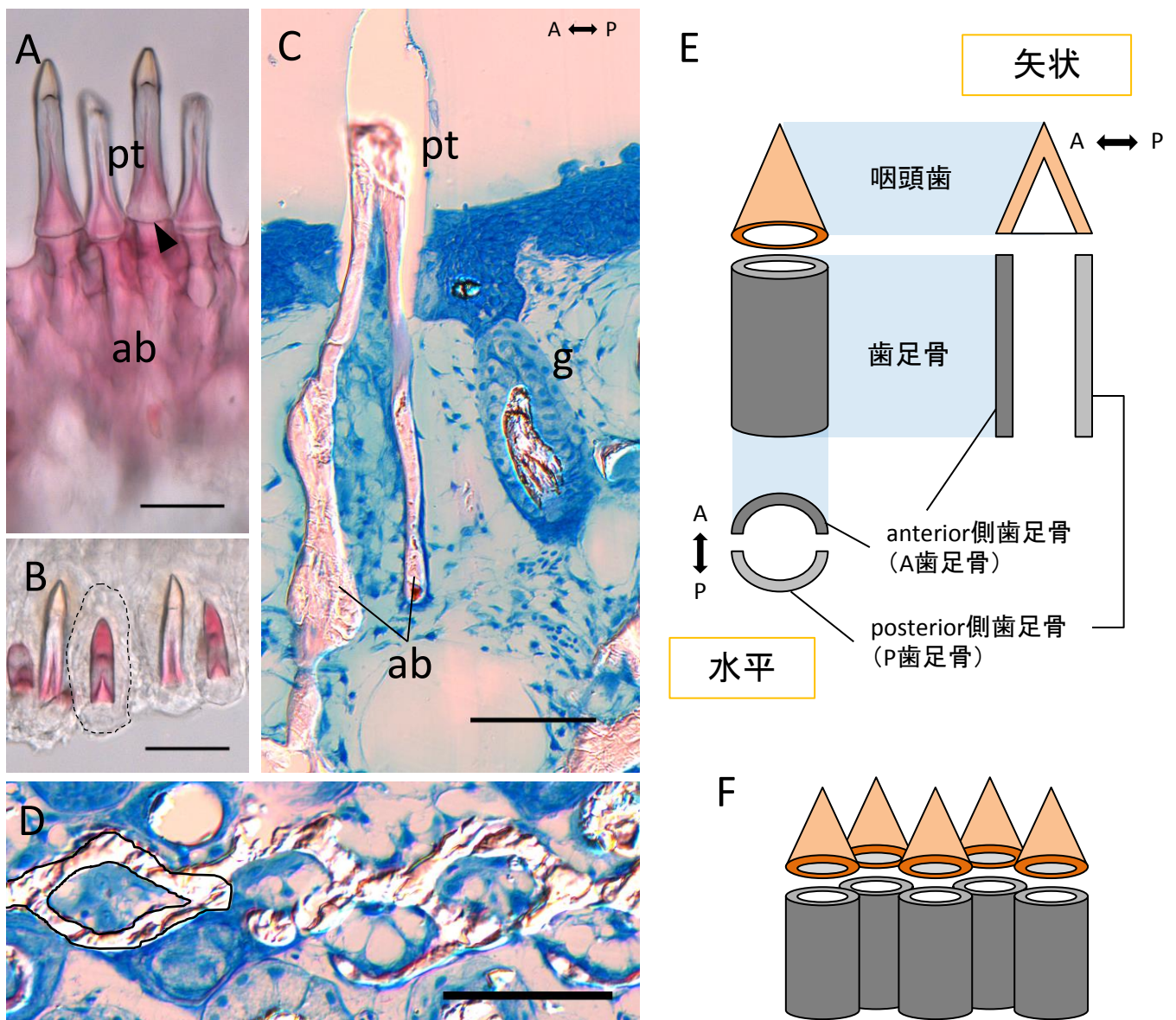


図2.2. 成熟歯と歯胚の構造

(A, B) アリザリンレッドによって染色した咽頭歯骨から成熟歯と歯胚を摘出し、前方から見た像。(A) 成熟歯は歯足骨に繊維性結合組織(矢頭)を介して結合していた。pt: 咽頭歯; ab: 歯足骨。(B) 歯胚(点線)中にある未成熟な咽頭歯は歯足骨を持たなかった。(C) 成熟歯と歯胚の矢状切片像。成熟歯の咽頭歯は2本の直線状に伸びた歯足骨によって支えられて口腔上皮(点線)上に萌出していた。一方歯胚中の咽頭歯は歯足骨を持たず、口腔上皮下に深く埋まっていた。g: 歯胚。(D) 歯足骨列の水平切片像。楕円状の歯足骨(実線)が数珠つなぎ状になって歯足骨列を形成していた。(E) 成熟歯列の構造の模式図。オレンジ色の三角錐が咽頭歯、灰色の円柱が歯足骨を表す。歯足骨anterior側の半円柱(濃い灰色)をA歯足骨、posterior側の半円柱をP歯足骨とした。(F) 成熟歯列の模式図。スケールバー: 50 μ m.

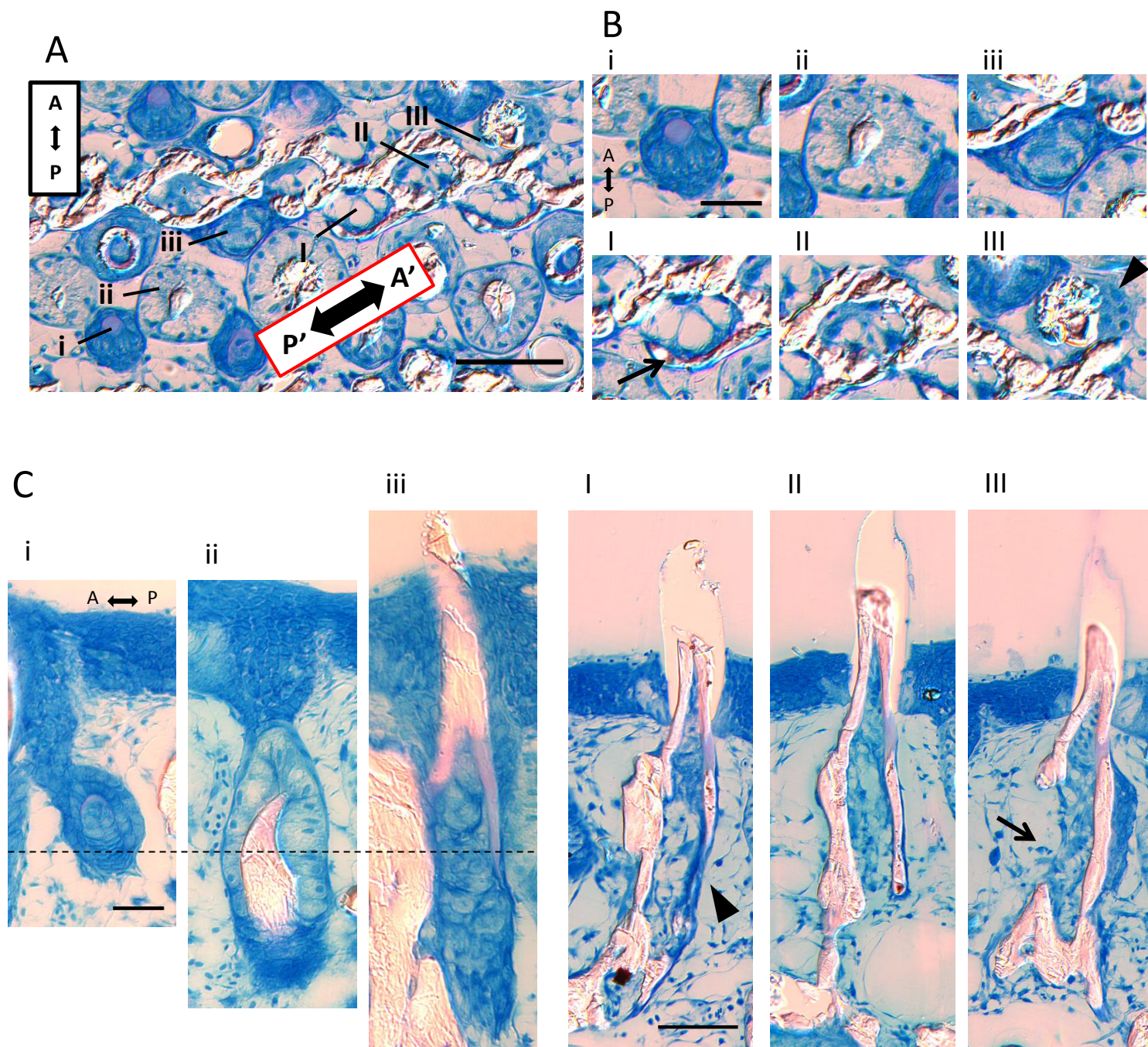


図2.3. 成熟歯及び歯胚のステージ

(A) 歯足骨および歯胚の水平切片をメチレンブルーによって染色した像。ステージi-iiiの歯胚およびステージI-IIIの成熟歯における歯足骨を図中に示した。A'P'軸に沿ってステージが進むほどanterior側に配置されるように並んでいた。(B) A中の各発生ステージにおける咽頭歯の拡大像。左上につけられたローマ数字はステージを表す。矢印は薄く未発達なステージIのP歯足骨を表し、矢頭はステージIIIの断片化したA歯足骨が、多核の細胞によって囲まれている様子を示している。(C) 各発生ステージにおける咽頭歯の矢状切片像。左上につけられたローマ数字はステージを表す。ステージi-iiiの点線は、A, Bにおける水平切断面を表している。ステージIのP歯足骨(矢頭)は薄く、ステージIIIのA歯足骨(矢印)は分断していた。スケールバー: 50 μ m (A, C I), 20 μ m (B, C i)。

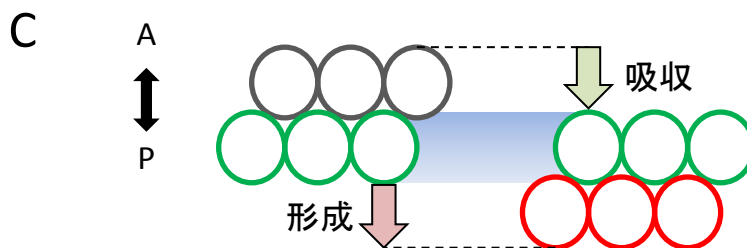
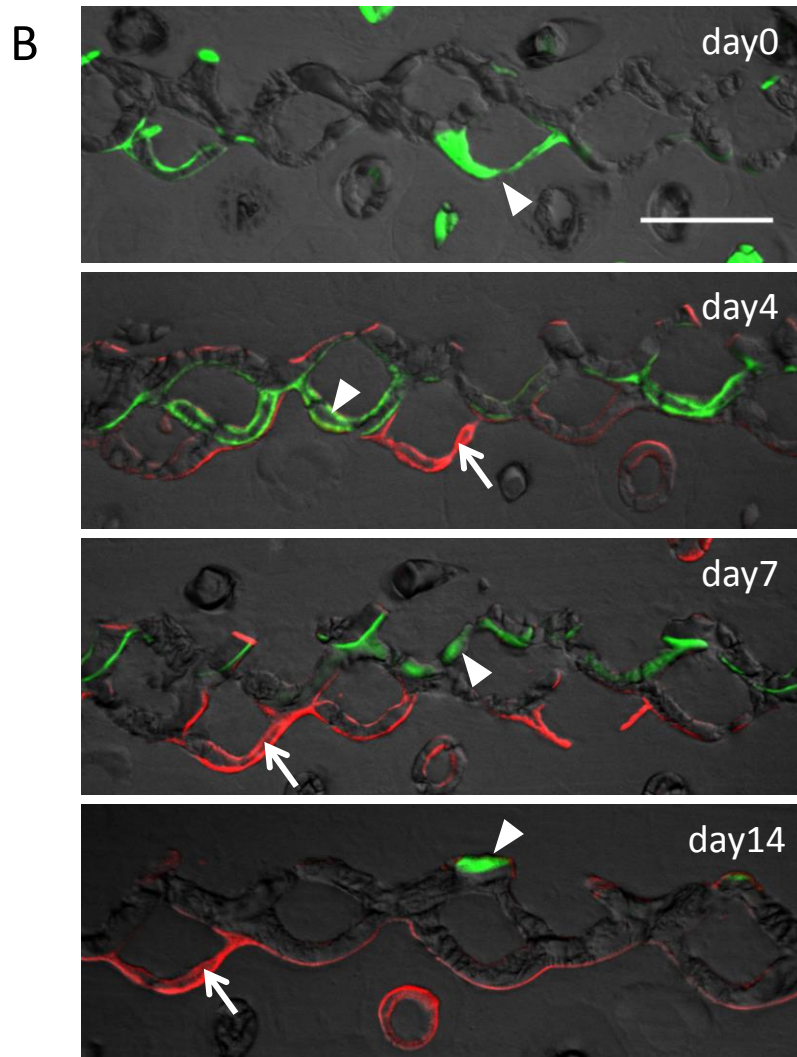
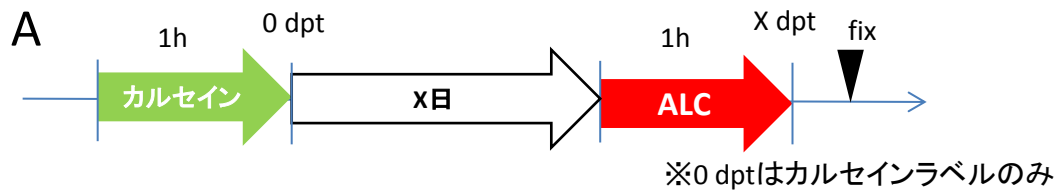


図2.4. 歯足骨列の代謝

(C) 標識のスケジュール。まず個体にカルセインラベルを1時間施して0 dpt (day post treatment) とした。その後、飼育水中でX日飼育し、1時間アリザリンコンプレクソン (ALC) ラベルを施した後に固定し、X dptのサンプルとした。(B) カルセインとALCによって骨標識を行った個体から咽頭歯を摘出し、歯足骨列について作製した水平切片像。0 dptにおいて列の最もposterior側でラベルされた歯足骨 (矢頭) は、日を追うごとに列の中でその位置をanterior側へと変えていた。一方で、列のposterior側には常にALC陽性の歯足骨 (矢印) が作られていた。(C) 歯足骨列の代謝の模式図。円は列を構成する個別の歯足骨を表している。カルセインでラベルされた歯足骨を緑円、ALCでラベルされた歯足骨を赤円で表している。スケールバー: 50 μ m.

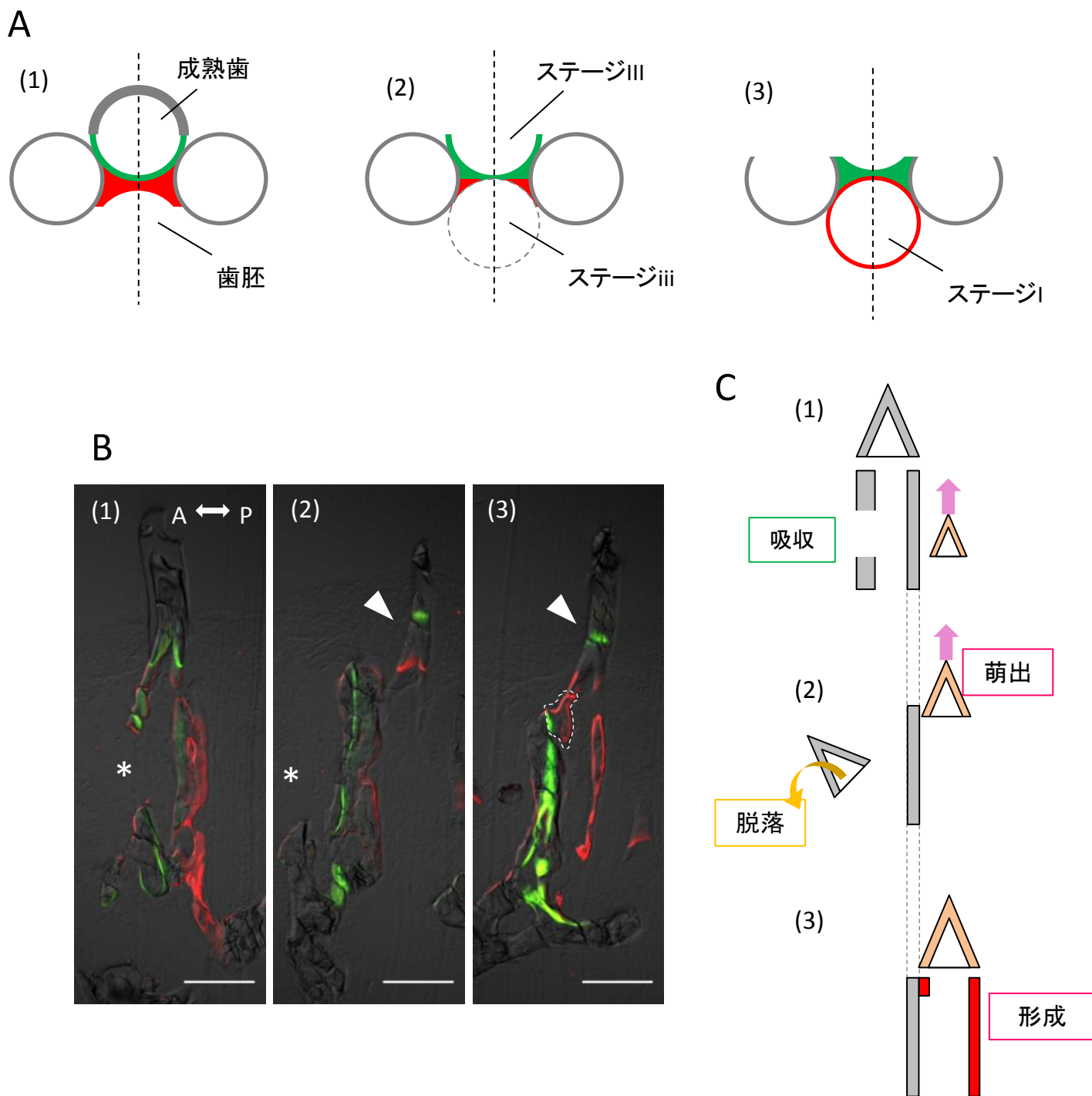


図2.5. 歯足骨の代謝と歯交換

(A) 二重標識7 dptにおける、咽頭歯萌出前ステージから萌出後ステージの水平断面についての模式図。(1) 萌出前、(2) ステージiiiの歯が萌出中、(3) 萌出後を表す。各円、もしくは半円は歯足骨を表し、緑はカルセインラベルされた骨、赤はALCIによってラベルされた骨を表している。黒の点線は(B)におけるそれぞれの切片の作製位置を表している。(B) 二重標識7 dptにおける、咽頭歯萌出前ステージから萌出後ステージの矢状切片像。アスタリスクはステージIIIの成熟歯のA歯足骨の位置を、矢頭は新しく萌出した咽頭歯を表している。点線によって囲まれた骨は接続骨である。(C) 歯の萌出の模式図。灰色の三角形はステージIIIの咽頭歯を、オレンジの三角形は萌出する咽頭歯を表す。灰色の四角はステージIIIのA, P歯足骨を表す。赤色の四角は萌出のために新たに形成された歯足骨を表す。スケールバー: 50 μ m.

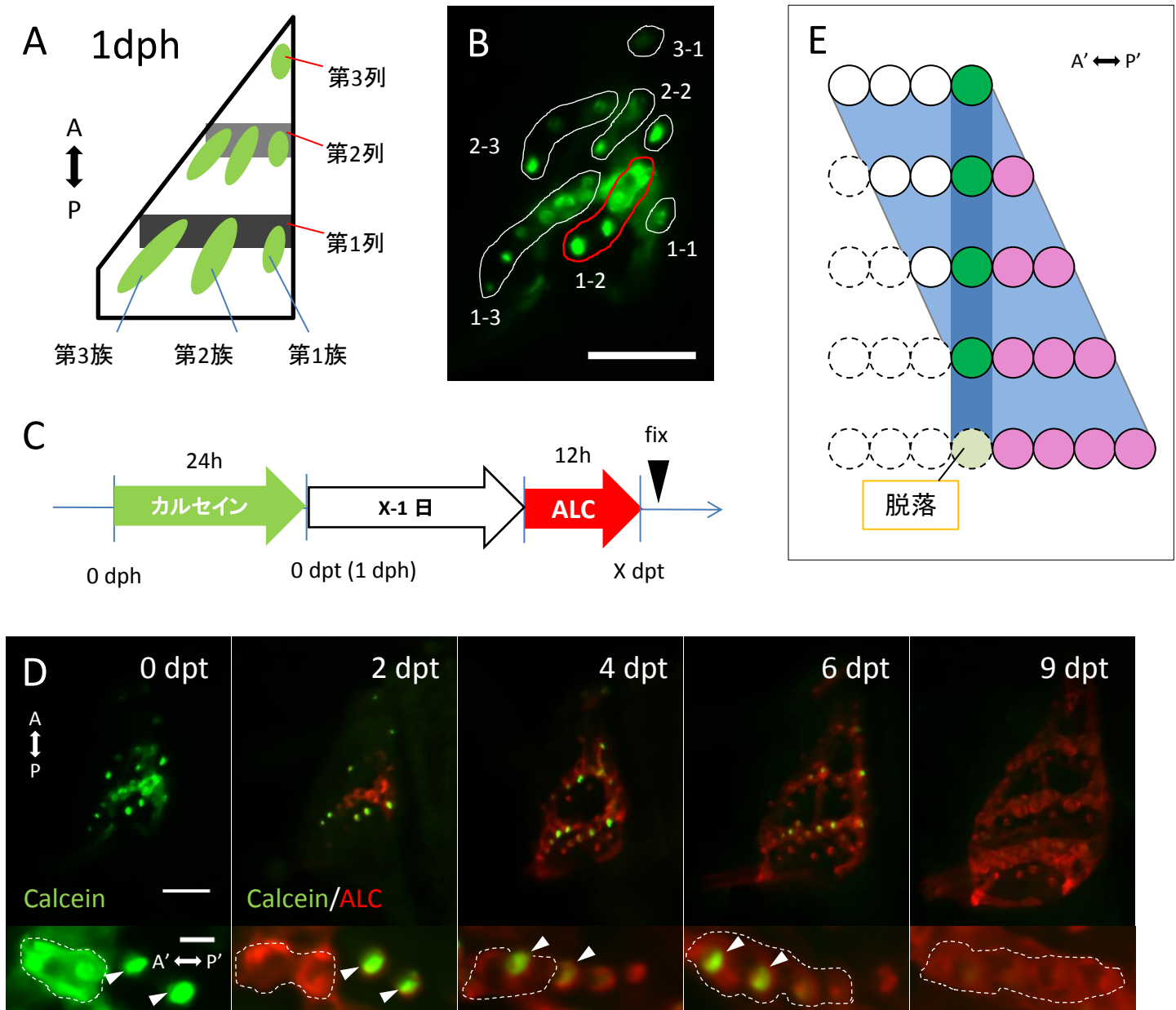


図2.6. 咽頭歯の代謝

(A) 1 dph (day post hatch) 稚魚の上顎咽頭歯骨に局在するtooth familyを模式的に表した図。灰色の四角は成熟歯列を、緑色の楕円はtooth familyを表す。黒い線は咽頭歯骨の外形を表す。(B) 1 dphの稚魚における上顎咽頭歯骨の全体像。咽頭歯骨上には7個のtooth family(実線)が存在している(1-1, 1-2, 1-3, 2-1, 2-2, 2-3, 3-1)。先の番号は列番号、後の番号は族番号を表している。(C) 標識のスケジュール。まず、孵化直後の稚魚にカルセインラベルを24時間施して0 dptとした。その後、飼育水中でX-1日飼育し、12時間ALCラベルを施した後に固定し、X dptのサンプルとした。(D) 咽頭歯の代謝。上のパネルは咽頭歯骨の全体像を、下のパネルは1-2 tooth familyの拡大像を表す。矢頭は0 dpt (1 dph) でカルセインによってラベルされた歯胚中で成長中の咽頭歯を示している。点線は1-2 tooth familyを構成する成熟歯の歯足骨を表している。(E) 咽頭歯の脱落の仕組みについての模式図。円はtooth family中の各咽頭歯を表す。緑円は同じ歯を、点線の円は脱落した歯を、赤円は新たに形成された歯を表す。スケールバー: 100 μm (B, D 上パネル), 20 μm (D 下パネル)。

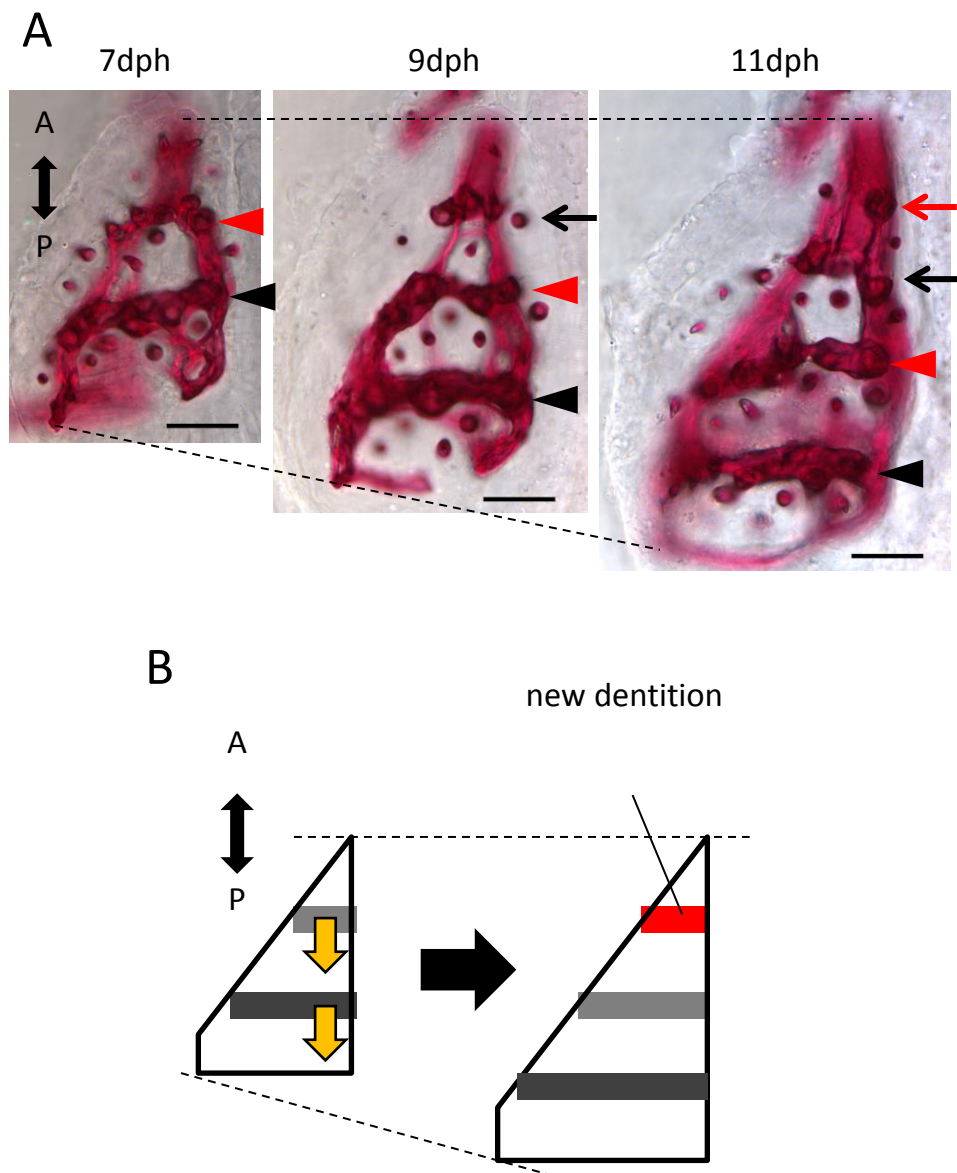


図2.7. 歯交換と咽頭歯骨のモデリング

(A) 7 dph, 9 dph, 11 dphの稚魚より摘出した咽頭歯骨のアリザリンレッド染色像。各咽頭歯骨の上端及び左下端を点線で結んだ。また第一歯列を黒矢頭、第二歯列を赤矢頭、第三歯列を黒矢印、第四歯列を赤矢印で示した。(B) 咽頭歯骨全体の骨モデリングの模式図。灰色の四角は成熟歯列を表し、黒の実線は咽頭歯骨の外形を表している。右側の咽頭歯骨は左側の物より発生ステージが進んだもので、両咽頭歯骨の上端及び左下端を点線で結んだ。黄色矢印は、歯交換による成熟歯列のposterior側へのシフトを表している。赤四角は新しく形成された成熟歯列を表している。スケールバー: 50 μ m.

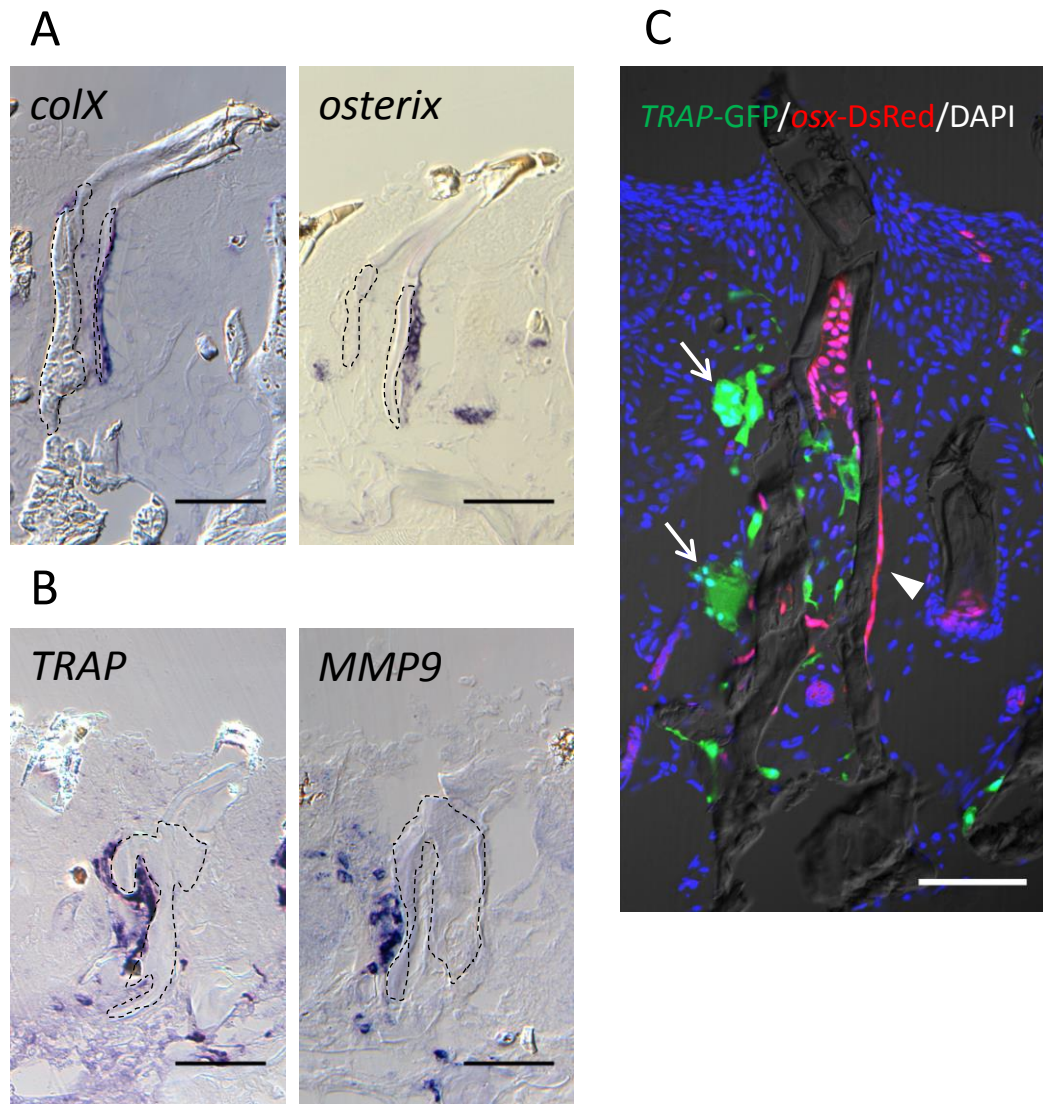


図2.8. *TRAP-GFP/osterix-DsRed*ダブルTgラインにおける蛍光シグナルと内在性の骨芽細胞マーカー及び破骨細胞マーカーの発現

(A, B) 骨芽細胞及び破骨細胞マーカーについてwhole-mount RNA in situ hybridizationを行った咽頭歯骨の矢状切片像。(A) 歯足骨における骨芽細胞マーカーの発現。歯足骨は点線で表している。*Type X collagen*, *osterix* 共にP歯足骨にシグナルが確認できた。(B) 歯足骨における破骨細胞マーカーの発現。歯足骨は点線で表している。*TRAP*, *MMP 9* 共に主にA歯足骨でのシグナルが強く確認できた。(C) *TRAP-GFP/osterix-DsRed*ダブルTgラインの咽頭歯骨についての矢状切片像。*DsRed*シグナル(矢頭)はP歯足骨で、*GFP*シグナル(矢印)は主にA歯足骨で確認された。スケールバー: 50 μ m.

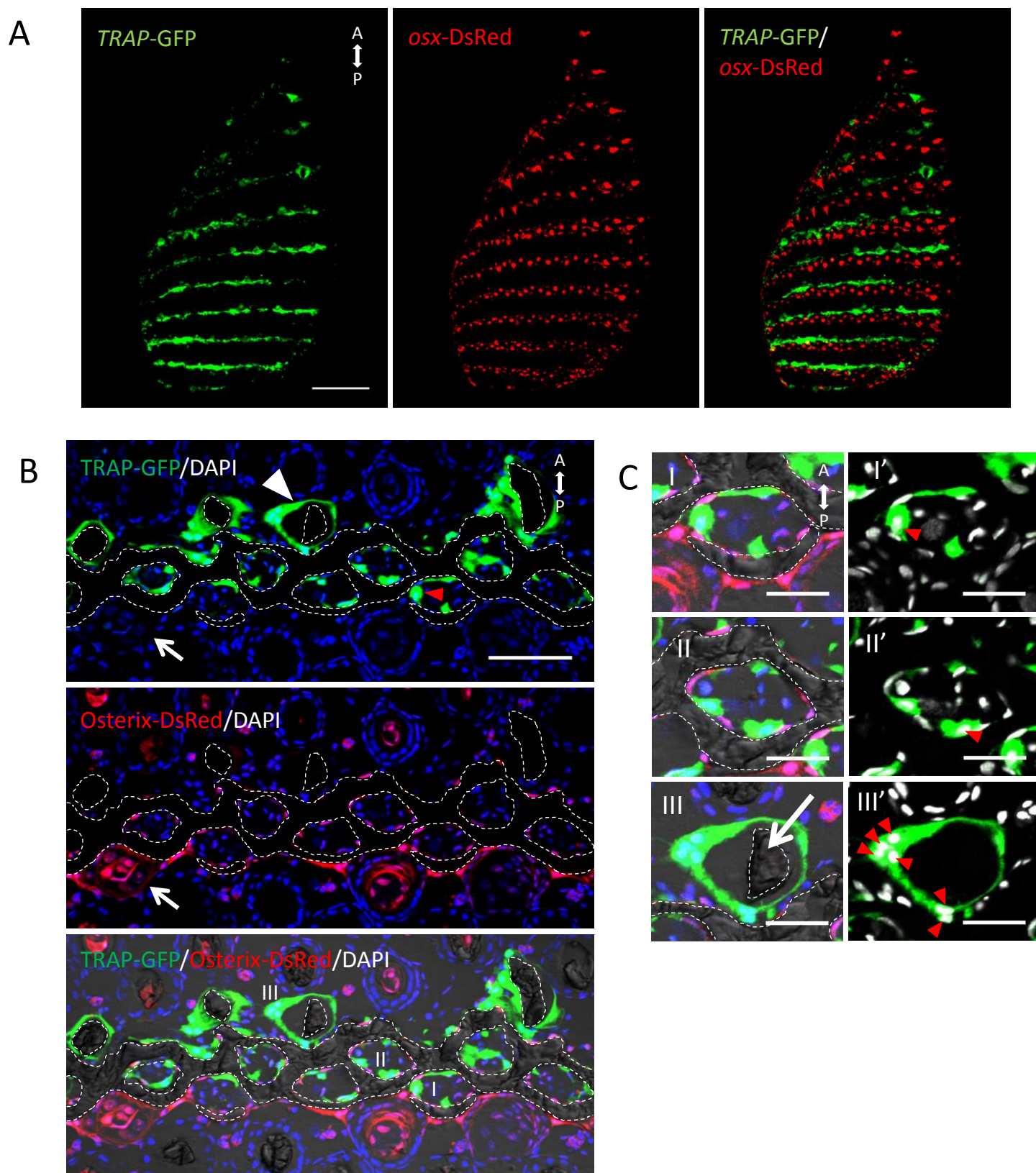


図2.9. 歯足骨における破骨細胞と骨芽細胞

(A) TRAP-GFP/*osterix*-DsRedダブルTgラインから摘出した咽頭歯骨の全体像。GFPは破骨細胞の、DsRedは骨芽細胞の局在を表している。(B) ダブルTgラインの咽頭歯骨についての水平切片像。DAPIによって染色された核は青蛍光で検出されている。(B, 上パネル) 多核の破骨細胞(白矢頭)は歯足骨列(点線)の最もanterior側に局在していた。単核の破骨細胞(赤矢頭)は列の中央部分に局在していた。列よりもposterior側(矢印)には破骨細胞は認められなかった。(B, 中央パネル) 骨芽細胞は列のposterior側で密集していた(矢印)。(B, 下パネル) GFPとDsRedのmerge像。ステージI-IIIの成熟歯の歯足骨を図中に表した。(C) Bの下パネルにおいて示したステージI-IIIの成熟歯の歯足骨についての拡大像。左上につけられたローマ数字はステージを表す。I'-III'はI-IIIのGFP(緑)と核(白)のみを抽出した像である。白矢印は脱落歯、赤矢頭は破骨細胞の核を示している。スケールバー: 200 μ m (A), 50 μ m (B), 20 μ m (C)。

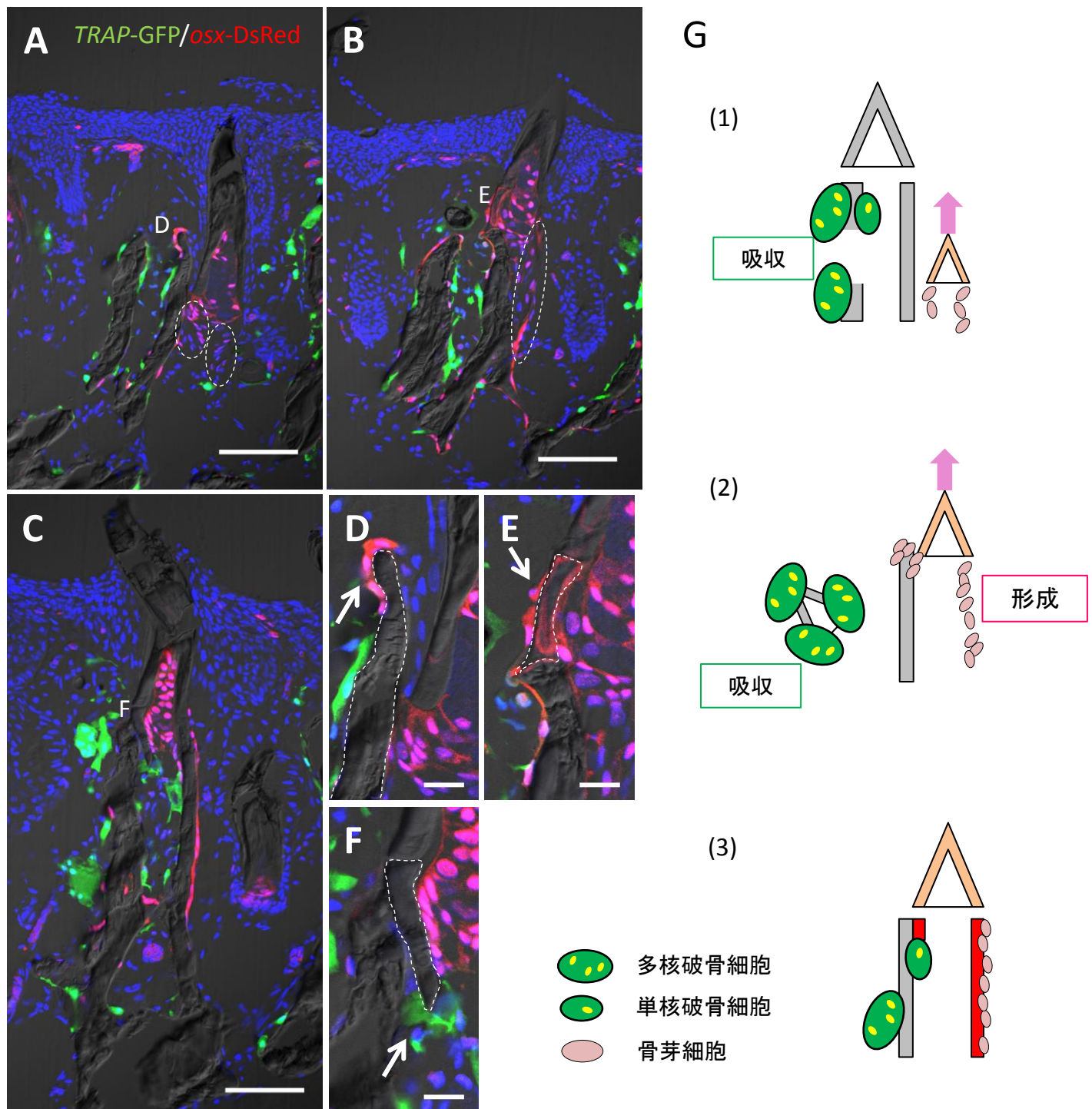


図2.10. 咽頭歯萌出時の骨形成と骨芽細胞及び破骨細胞

(A, B) 新たに形成されるP歯足骨と骨芽細胞。(A) ステージiiiの萌出前の歯胚の底部には骨芽細胞が集まり、縦方向に伸びていた(点線円)。(B) 萌出中の咽頭歯底部にはよりはっきりと骨芽細胞が縦長に伸びてP歯足骨の骨形成を始めていた(点線円)。(C) 萌出後のステージIIの成熟歯。(D-F) 接続骨のモデリング。(D) 歯の脱落が起こった後のステージIIIのP歯足骨上端(矢印)には骨芽細胞が凝集している様子が観察された。(E) 接続骨(点線)上に骨芽細胞が多数集まっているのが確認された(矢印)。(F) 余分に作られ、突出した接続骨(点線)を破骨細胞が吸収していた(矢印)。(G) 歯の交換に伴った歯足骨の代謝と骨芽細胞及び破骨細胞。三角形と四角で表した歯及び歯足骨は図2.5と同じものを示している。各種細胞は図中に示した通りである。スケールバー: 50 μ m (A-C), 10 μ m (D-F)。

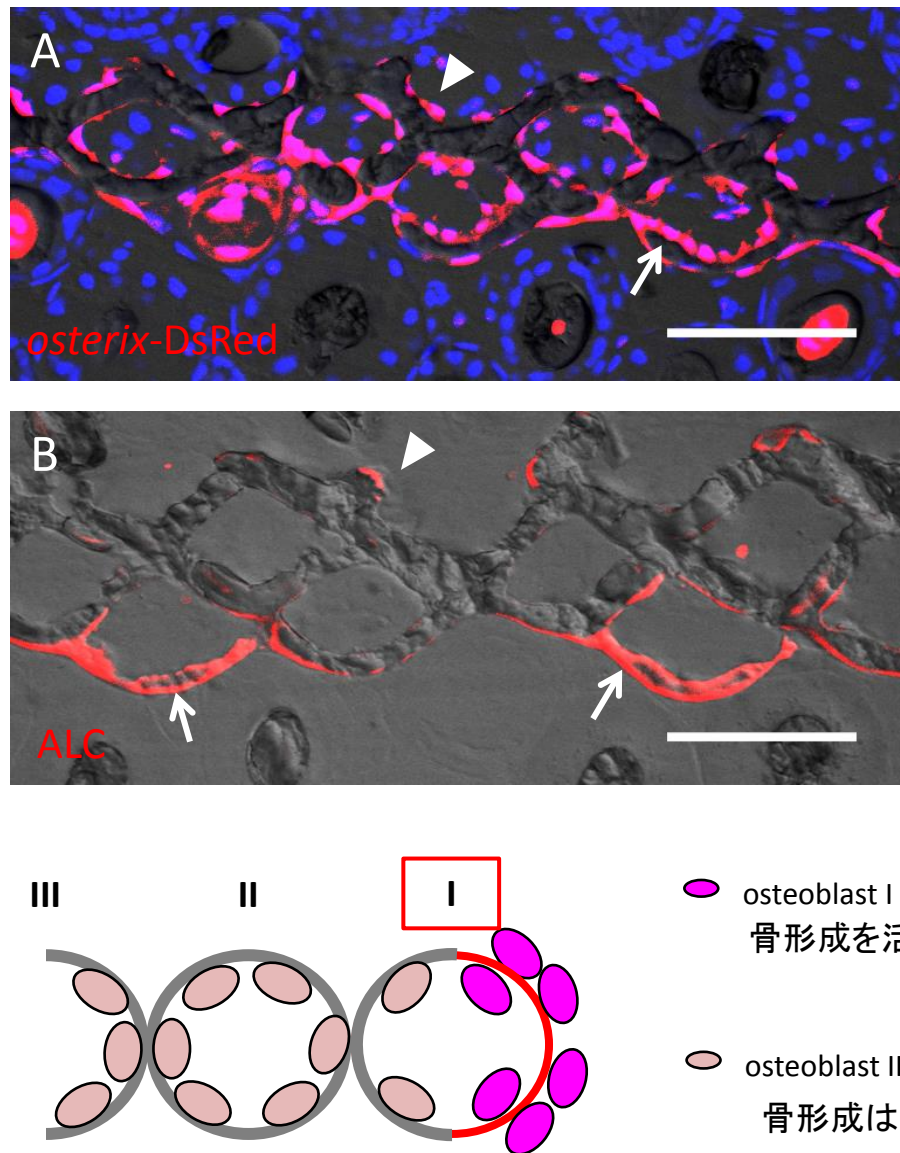


図2.11. 骨形成能による骨芽細胞の分類

(A) *osterix-DsRed* Tgラインから摘出した咽頭歯骨の歯足骨列についての水平切片像。DsRed陽性細胞は歯足骨列のposterior側(矢印)にもanterior側(矢頭)にも確認できる。(B) ALCによる標識直後に摘出した咽頭歯骨の歯足骨列についての水平切片像。ALC陽性の歯足骨は主にposterior側(矢印)で確認されるが、anterior側(矢頭)には少数しか確認されない。(C) 骨芽細胞を骨形成能によって二種類に分類した。円は個別の歯足骨を表し、赤い部分は形成中の歯足骨を表している。濃いピンクで表したosteoblast Iは歯足骨列の最もposterior側に存在し、活発に骨形成を行っている。一方、薄いピンクで示したosteoblast IIは歯足骨列の最もposterior側以外の場所に局在し、骨形成をあまり活発には行わない。スケールバー: 50 μ m.

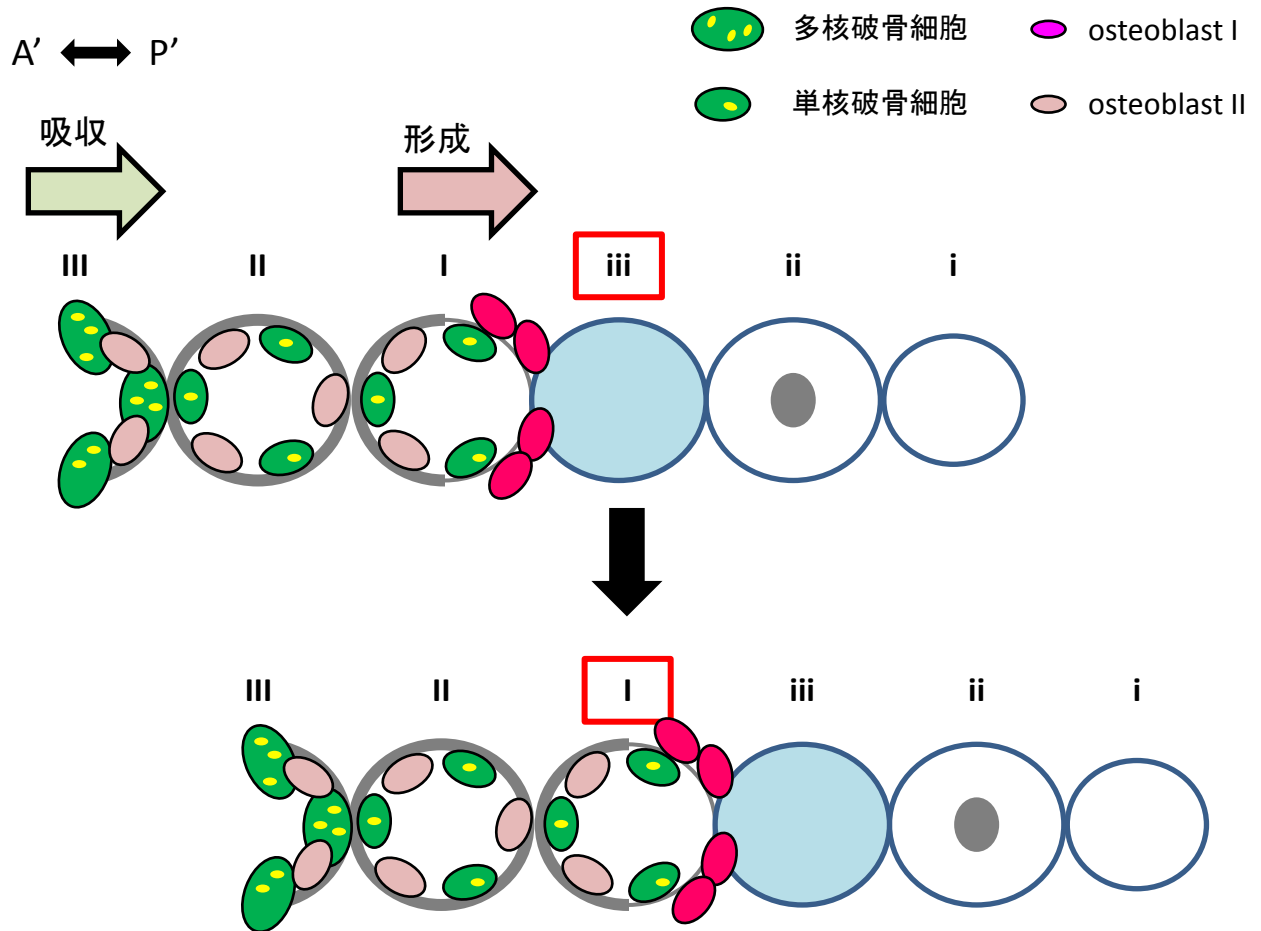


図2.12. 歯足骨の代謝と、破骨細胞及び骨芽細胞の局在のまとめ

ステージごとの歯胚及び歯足骨の代謝と、骨芽細胞と破骨細胞の局在のまとめ。青線は歯胚の輪郭、灰色の線は歯足骨を表している。ステージIではP歯足骨の外面にosteoblast Iが凝集して、活発に骨形成を行っている。歯足骨の内側には単核の破骨細胞とosteoblast IIが局在している。ステージIIでは単核の破骨細胞とosteoblast IIが局在している。ステージIIIでは、osteoblast IIと多核の破骨細胞が局在しており、多核の破骨細胞がA歯足骨を吸収している。tooth familyの最もposterior側に新しくステージiの歯胚が形成されると、各ステージの歯はその場で成長し、ステージを一つ進める。ステージiiiの咽頭歯の下に歯足骨が作られてステージIとなり、ステージIIのA歯足骨が吸収されてステージIIIとなり、歯足骨の支えを失った咽頭歯は脱落する。これによって歯交換を起こしながらもtooth familyの恒常性は保たれる。

第三章 歯足骨の骨モデリングにおける破骨細胞と骨芽細胞の相互作用

3.1 背景と目的

抗メカニカルストレスという性質を持つ骨は出生直後から必要な組織であるため、多くの骨を持つ生物において出生前の胚の段階で骨発生が起こる。マウスの後肢骨を例にとると、胎生 13.5 日目には軟骨細胞によっておおよその形が形成され、胎生 15.5 日目には第一次石灰化が始まる⁴¹。このようにして哺乳類のほとんどの骨は出生前におおよその形づくりが行われるが、限られたスペースでの胚発生では生体と同様の大きさの骨を作ることができない。この問題を解決するのが骨モデリングである。骨モデリングは骨の外側において骨芽細胞が骨基質を添加し、内側で破骨細胞が骨吸収を行うことによって骨の厚みを保ちながら径を広げることができる仕組みである。これにより胎生期に形作られた骨はその外形を変えることなく、相似形に大きさを増すことができる。

破骨細胞と骨芽細胞が離れて働くというその性質から、骨モデリングにおいては骨リモデリングとは異なり、それぞれの細胞は相互作用しないと言われている。しかしながら、骨モデリングが細胞によってどのように制御されているのかはほとんど研究がなされておらず、特に序論に述べたように複雑な骨の形態形成をそれぞれの細胞が自律的に行うとは考えにくいことから、これらの細胞の骨モデリング中の相互作用については議論の余地があるとされている。

骨モデリングという概念が Frost によって提唱されたのは今から数十年も前にさかのぼる⁴。それにもかかわらず、研究が盛んに行われている骨リモデリングとは対照的に骨モデリングについてはあまり細胞学、分子学的な解析が行われていないのは、その *in vivo* 解析が困難なためである。ダイナミックな形態形成を司る骨モデリングは、その仕組みを理解するために *in vivo* における解析が必須であるが、既存の哺乳類のモデルでは組織の複雑性やモデリングの頻度等の問題から解析が難しい。

一方、前章で述べた咽頭歯の歯交換に伴った歯足骨の代謝は、既存の哺乳類モデルが抱える問題を解消している。すなわち、歯足骨列は微小でシンプルな骨構造であり、生涯にわたって高回転のモデリングが起こるという特徴を持っており、これらは骨モデリング解析の強力な

武器となり得る。さらにメダカはその遺伝学的な性質上、種々の分化段階を示す細胞のレポーターTgラインや、TALEN法による遺伝子特異的な変異体、また、NTRシステム等と組み合わせたコンディショナルな細胞のノックアウト、Cre-LoxPシステムと組み合わせた細胞系譜の追跡など、様々な細胞、分子レベルの機能解析を容易に行うことができる。

本章では、以上のようなTgライン及び変異体を用い、骨モデリングにおける破骨細胞及び骨芽細胞の機能を解析し、歯交換中に起こる骨モデリングにおける破骨細胞と骨芽細胞の相互作用について明らかにした。

3.2 材料と方法

3.2.1 fosmidを用いたTgラインの作製

本章ではfosmidを用いて作成したTgラインである、*c-fms-a*-EGFP及び*ColX*-EGFP-NTRを使用した解析を行った。*c-fms-a*-EGFPは青野一志さんから、*ColX*-EGFP-NTRは猪早敬二助教から供与されたものであるが、簡単にその作製方法を記す。

c-fms-a-EGFP

メダカ*c-fms-a*の遺伝子座を含むfosmidクローンgolwfno31_o03をEnsemblゲノムブラウザから探索し、基本生物研究所より取り寄せた。このfosmidについてEGFP-カナマイシンカセットを用いて、以前報告された方法⁴²によって相同組み換えを行った。EGFP-カナマイシンカセットは以下のプライマーを用いて増幅した。

5'-AGTTTCAGCCCTGTTTGACTTTGGATCTGCAGAACTGAAGCTGATCCAGGTCCA
CCGGTCGCCACCATGG-3' (forward)

5'-TGCGCCCAAAAAAGAAAGGATGGAAGAAAAGCAGGGGAAATCTTGCTTACGA
GGCTATGGCAGGGCCTGC-3' (reverse).

下線部は相同組み換え部位を示している。PCR産物をメダカ*c-fms-a*の第一エクソンに組

み替えた。

ColX-EGFP-NTR

メダカ *type X collagen* の遺伝子座を含む fosmid クローン golwfno181_n17 を Ensembl ゲノムブラウザから探索し、基本生物研究所より取り寄せた。この Fosmid について EGFP-NTR-カナマイシンカセットを用い、*c-fms-a*-GFP Tg ラインを作製した時と同様の方法によって相同組み換えを行った。カセットは以下のプライマーを用いて増幅した。

5'-CTTTCAAACCTGACTGCAGTTGTCTTCTCCAAACAGATCTGACCTTGCAAGTCCA
CCGGTCGCCACCATGG-3' (forward)

5'-CTTTGTTTGTGTTTGAAAGTGCGTGTGCAAGGAGTCTGCATTTTTCTTACGTCTG
ACCAGTTGGTGATTTT-3' (reverse)

下線部は相同組み換え部位を示している。PCR 産物をメダカ *type X collagen* の第一エキソンに組み替えた。

相同組み換えを行った後の fosmid クローンはメダカ胚が一細胞ステージの時に、細胞質にインジェクションした。インジェクション後に前述の飼育方法に従って胚を発生させ、強い蛍光シグナルが確認できるものを成魚まで育てた。その個体から F1 世代を得て蛍光シグナルが残っているかどうかを調べ、シグナルの確認できた F1 世代をライン化した。

3.2.2 TALEN 法による *c-fms-a* 変異体の作製

本章では TALEN 法により作製した *c-fms-a* 変異体使用した解析を行った。*c-fms-a* 変異体は青野一志さんから供与されたものであるが、簡単にその作製方法を記す。

TALEN 法をメダカに対して用い、*c-fms-a* 変異体を作製した^{43,44}。6ユニット以下の TAL エフェクターモジュール(NIはA、HDはC、NNはG、NGはTに用いた)をクローニングし、array

plasmid pFU⁴⁵ に組み込んだ。その後、得られた repeat arrays を発現ベクター pCS2TAL3DD or pCS2TAL3RR⁴⁶ にクローニングした。

それぞれのターゲット部位について集められた RVD モジュールと *c-fms-a* 変異体における欠失部位は表1に記した。変異体のジェノタイピングには下記プライマーを用いた。

5'-GCAGGTACATCCTATTTTCTGGTT-3' (forward)

5'-TGACCTCACTCACCTTTCACA-3' (reverse)

PCR 法により DNA を増幅した後、産物を Pst1 制限酵素 (Takara) によって切断した。

3.2.3 遺伝子のクローニング

前章で述べたのと同様にして *DSPP* 及び *c-fms-a* 遺伝子をクローニングした。クローニングに用いたプライマーは以下である。

DSPP F, 5'-TTCGGAGCTTCAGAGCTCTGAGG-3',

DSPP R, 5'-CCTCATCTGGCGTCATCAGTCCG-3';

c-fms-a F 5'-CTGAAGCTGATCCAGGATGC-3';

c-fms-a R 5'-TCAGCAAACTGATAGTTGTTAGTCTTC-3'

3.2.4 whole-mount in situ hybridization

前章で述べたのと同様の方法を用いたため、ここでは省略する。

3.2.5 Von Kossa/TRAP 染色

Von Kossa 染色は石灰化組織を黒に、TRAP 染色は破骨細胞の酵素活性を赤色に検出する染色方法である。前章で述べた方法によって切片を作製したのち、まず 5% AgNO₃ 溶液を滴下して室温で 2 分間置いた。その後溶液を蒸留水によって洗浄し、炭酸ナトリウムホルムアルデヒド溶液を滴下したのちに、目視で黒色を確認できるまで置いた。発色が確認できたら蒸

留水によって数回よく洗浄した。その後、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 0.1 M acetate buffer (pH 5.2)) を数滴垂らし、湿潤及び暗条件の箱に切片を静置して、その箱を 15~30 分程度 37 °C のインキュベーター内に置いた。10 分毎に顕微鏡下で染色度合いを確認し、赤色の発色が確認されたら蒸留水で洗浄した。

3.2.6 定量解析における統計解析

野生型と *c-fms-a* 変異体における GFP の陽性領域及びメロニダゾール処理後の野生型と *ColX-NTR-GFP* における TRAP 陽性領域は Image J によって定量した。また、野生型と *c-fms-a* 変異体におけるステージ II の歯 5 本に局在していた骨芽細胞の総数は、ステージ II の成熟歯をランダムに選び、歯足骨内の DsRed 陽性細胞の核の数を数え、それを 5 本分行って合計することで定量した。野生型と *c-fms-a* 変異体の比較ではそれぞれ 3 サンプルについて行い、野生型と *ColX-NTR-GFP* の比較ではそれぞれ 4 サンプルについて行った。

3.2.7 メロニダゾールによる薬剤処理(稚魚)

メロニダゾール (Sigma) を 5 mM になるように飼育水に溶解した。30 ml のメロニダゾール溶液をプラスチックカップに入れ、稚魚が 5 匹以下になるような飼育密度にして、暗条件 28 °C でインキュベーター内にて飼育した。一日に一度、薬剤を含まない飼育水にスポイトを用いて稚魚を移動させ、明条件下で餌を与えた。その後、新しく調整した 5 mM メロニダゾール溶液にスポイトを用いて稚魚を移動させた。移動の際、薬剤溶液に残留した餌が入らないように注意した。

3.2.8 メロニダゾールによる薬剤処理(成魚)

メロニダゾール (Sigma) を 5 mM になるように飼育水に溶解した。30 ml のメロニダゾール

溶液をプラスチックカップに入れ、そこに成魚一匹を維持して、暗条件 28 °C でインキュベーター内にて飼育した。24 時間薬剤溶液で維持した後、24 時間飼育水で維持し、これを処理期間中繰り返した。薬剤溶液で維持しているは餌を与えなかったが、飼育水での維持期間中は一日 2 回餌を与えた。

3.2.9 稚魚のライブイメージング

稚魚はトリカインにて麻酔後、プラスチックシャーレにスポイトを用いて乗せた。その後スポイトを用いて稚魚周囲の水をできる限り除去し、シャーレを裏返してシャーレ底部をレンズ面に向けて蛍光顕微鏡にて撮影した。撮影には LAS AF (Laica) を用い、写真の編集(蛍光画像の重ね合わせ)もこのソフトを用いて行った。撮影後は稚魚にダメージを与えないよう、素早く汚れていない飼育水に戻した。薬剤処理を続ける場合は稚魚が飼育水中で落ち着いてから薬剤溶液に戻した。

3.2.10 半定量 RT-PCR

5 日間のメロニダゾール処理を行った成魚から咽頭歯骨を摘出し、TRIzol (Invitrogen) によって mRNA を抽出した。この mRNA 0.5 μ g を鋳型にして、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) を用いて cDNA ライブラリーを作製した。実験に用いた各ライブラリーの cDNA について、8 段階の希釈系列を作ってハウスキーピング遺伝子 (*GAPDH*) の増幅を行い、電気泳動によって得られたバンドの輝度によって各 cDNA 間の濃度調節を行った。

PCR 用のプライマーは以下になる。

GAPDH F, 5'-CTTGGATACACAGAGGACCAGG-3'

GAPDH R, 5'-GCCAAACTCATTATCGTACCAT-3'

TRAP F, 5'-TCCCCTGGTACGTTCTTGCT-3'

TRAP R, 5'-GCTCAGAGTCTTCCCCGTGT-3'

RANKL F, 5'-TGCTTCCGCCACTACAACCT-3

RANKL R 5'-TGCCGTTTTGCCTGATGCTC-3'.

各遺伝子のプライマーは Ensembl ゲノムブラウザから配列を取得し Prime 3 plus (<http://primer3plus.com/>) を用いて設計した。

3.2.11 TUNEL 染色(Whole)

2 日間のメロニダゾール処理を行った稚魚を固定し、2.2.5 節(2)で行ったものと同様の方法でメタノールに置換し、-20℃で一日以上脱水した。TUNEL 染色に用いる際はサンプルを 2.2.5 節(2)と同様の方法で親水化し、10 μ g/ml の Proteinase K (Roche) 溶液に浸して室温で 30 分反応させた。PBST による洗浄後、試料を室温で 20 分再固定し、洗浄した。0.1%クエン酸ナトリウム、0.1% Triton X-100 溶液に置換して氷上で 15 分静置した。PBST による洗浄後、In Situ 細胞死検出キット(Roche)を用いて細胞死を検出した。PBST で 5 分間 3 回洗浄した後、50%グリセリンに置換して蛍光顕微鏡によって撮影を行った。

3.2.12 パラフィン切片の作製

5 日間メロニダゾール処理を行った個体から咽頭歯骨を摘出後、試料を固定した。PBST による洗浄後、0.5 M EDTA/PBS 溶液に浸漬し、毎日一度液を替えながら 4 °Cで一週間振盪することで脱灰を行った。脱灰後、0.1 M PB によって洗浄し、70%, 90%, 95%, 100%, 100%メタノールに室温で一時間ずつ浸漬した。その後 100%メタノールに浸漬し、4℃で一晩静置した。その後 100% 1-ブタノールに室温で 30 分ずつ 2 回浸漬した。2 回目の浸漬後、そのまま容器を 65℃インキュベーターに移し、さらに 30 分緩やかに振盪した。その後、引き続き 65 °C で 1-ブタノール:パラフィンが 1:1 の割合で含まれた溶液に 1 時間、パラフィン溶液に 2 時間ずつ3回浸漬し、緩やかに振盪しながら完全にパラフィンに置換した。置換終了後、パラフィン内に試料を包埋し、完全に固まった後に専用の木台に接着して試料ブロックとした。パラフィ

ン切片はミクロトーム(YAMATO)によって $4\mu\text{m}$ に薄切した。ホットプレート上にスライドガラスを乗せ、その上にピペットマンで蒸留水を十分に乘せて 41°C で温めた。薄切した切片を温められた水の上に慎重に乗せ、スライドガラス上で伸展させた。その後、ホットプレート上に一晩静置し、スライドを完全に乾燥させた。

3.2.13 TUNEL 染色(切片)

切片をキシレンに 3 分ずつ 3 回くぐらせることで脱パラフィン化を行った。その後、100%～70%の 5 段階のエタノール希釈系列に 3 分ずつくぐらせることによって親水化を行った。その後流水中でスライドをよく洗い、蒸留水に 3 分置換した。その後、切片を $10\mu\text{g/ml}$ の Proteinase K (Roche)によって 37°C で 30 分処理した。その後切片を TBS によって洗浄し、In Situ 細胞死検出キット(Roche)を用いて細胞死を検出した。染色後、切片を TBS によってよく洗浄した。

3.2.14 抗体染色

3.2.13 節の TUNEL 染色後、2% BSA/PBS によって室温で 20 分ブロッキングを行った後、ブロッキング液で 1/500 に希釈した一次抗体溶液(rabbit anti-GFP antibody: MBL)を切片上にかき、 4°C で一晩静置した。その後スライドを TBS で 3 分間 3 回洗浄し、ブロッキング液で 1/1000 に希釈した二次抗体溶液(goat anti-rabbit IgG-Cy3: Jackson ImmunoResearch)、 $0.5\mu\text{g/ml}$ の DAPI 溶液により、切片を室温で 30 分処理した。反応後 PBS によって 3 分間 3 回洗浄し、50%グリセリンによって封入した。

3.3 結果

3.3.1 破骨細胞前駆細胞の局在

c-fms は哺乳類において破骨細胞前駆細胞のマーカーである¹⁶。歯足骨のどこに破骨細胞

前駆細胞が局在するのかを調べるために、*c-fms-a*-GFP Tg ラインを作製し、TRAP-DsRed と掛け合わせることでダブル Tg ラインを樹立して蛍光のパターンを確認した。

まず、*c-fms-a* の内在性 mRNA を WISH 法によって検出し、切片を作製して Tg ラインの蛍光と比較したところ、G 歯足骨、歯胚、脱落中の咽頭歯における発現が GFP の蛍光と一致したため、この Tg ラインはこれらの組織で、内在性の *c-fms-a* の mRNA の発現を反映していることが分かった(図 3.1 A, B)。

c-fms-a-GFP/TRAP-DsRed ダブル Tg ラインから咽頭歯を摘出し、切片を作製することで各ステージの歯における細胞の蛍光パターンを確認した。結果、*c-fms-a* はステージ i の歯胚から成熟歯に至るまですべてのステージの歯で発現が確認された(図 3.2 A)。また歯胚においては *c-fms-a* 陽性/TRAP 陰性の破骨細胞前駆細胞が認められ(図 3.2 B i-iii)、歯足骨が形成されるステージ I 以降は *c-fms-a* 陽性/TRAP 陽性の破骨細胞が局在していた(図 3.2 B I-III)。前章の 2.3.7 節で行った解析と同様に、ステージ I における共陽性細胞は単核であり(図 3.2 B I, I')、ステージ III における細胞は多核であった(図 3.2 B III, III')。また、ステージ I において共陽性細胞が確認できるのは形成中の P 歯足骨の内側のみで(図 3.2 B I: 矢印)、外面には GFP 単独陽性の破骨細胞前駆細胞のみが確認された(図 3.2 B I: 矢頭)。

骨芽細胞が産生する M-CSF が、破骨細胞前駆細胞に発現する *c-fms* に対して結合することで、破骨細胞の分化と増殖が促進される¹⁴。ステージ iii までの歯胚においては破骨細胞前駆細胞しか局在していなかったのにもかかわらず、ステージ I まで成長した段階では破骨細胞前駆細胞とその分化後の単核破骨細胞の両方が、明確に局在箇所を分けつつも共に局在していたことから、このステージにおいて骨芽細胞からの何らかの刺激を受け、分化している可能性があると考えた。そこで、ステージ I における破骨細胞前駆細胞と骨芽細胞の局在関係を調べた(図 3.3 A, B)。その結果、ステージ I の P 歯足骨外面に局在していた *c-fms-a* 単独陽性細胞は、活発に骨形成を行っている osteoblast I と接していた(図 3.3 B: 矢頭)。

以上の結果から、歯胚周囲に局在していた破骨細胞前駆細胞は、歯胚のステージが進み、

ステージ I になったところで歯足骨を形成している osteoblast I から刺激を受けて分化しているということが示唆された。このことによって破骨細胞は歯足骨が形成されていない場所には局在せずに、骨組織上の適切な箇所では骨吸収が行えるという可能性が示唆された。(図 3.4)

3.3.2 *c-fms a* の変異体

破骨細胞が歯足骨の骨モデリングにどのように関与しているのかを調べるため、TALEN 法によって *c-fms-a* の変異体を作製し、成魚における破骨細胞のノックダウンを試みた。同週齢の野生型と変異体から咽頭歯を摘出し、アリザリンレッド染色を行ったところ、野生型においては成熟歯列間に透明な軟組織と歯胚が確認できるのに対し、変異体の歯列間は異所性のアリザリンレッド陽性の骨組織で埋まっていた(図 3.5)。

歯足骨と破骨細胞の状態を調べるために野生型、変異体共に切片を作製し、Von Kossa/TRAP 共染色を行うことで骨組織と破骨細胞を同時に可視化した。結果、変異体では野生型に比べ TRAP 陽性領域が減少していることが分かった(図 3.6)。また、野生型において歯足骨列は楕円状の歯足骨が横一列に並ぶことで形成されているのに対し、変異体では3列程度の歯足骨が歯足骨列を形成していた。

変異体における破骨細胞前駆細胞の状態を調べるために、*c-fms-a* 変異体における *c-fms-a*-GFP Tg ラインを樹立し、蛍光によってその局在を調べた。結果、野生型に比べ、TRAP と *c-fms-a* の共陽性の破骨細胞が局在する歯足骨上では GFP 陽性細胞は減少していたが、*c-fms-a* の単独陽性の破骨細胞前駆細胞の局在する歯胚上ではその数に大きな差は確認できなかった(図 3.7 A)。

また、変異体における骨芽細胞の状態を調べるために、*c-fms-a* 変異体における TRAP-GFP/*osterix*-DsRed ダブル Tg ラインを樹立し、GFP と DsRed それぞれの蛍光を野生型と比較した。ステージ II の歯足骨における骨芽細胞数を野生型と変異体で比較したところ、変異体と野生型には大きな差は確認できなかった(図 3.7 B, C)。一つの歯列における GFP の陽

性領域は、TRAP 染色の結果と同様に変異体で減少していた(図 3.7 B, D)。また、骨芽細胞における骨形成能を比較するためにカルセインと ALC における二重標識実験を行ったが、骨形成能に大きな差異は確認できなかった(図 3.7 E)。以上のことから、破骨細胞は正常な歯足骨の骨モデリングにおいて重要であり、破骨細胞の減少は骨形成と骨吸収のアンバランスを起こすということがわかった(図 3.7 F)。

3.3.3 骨芽細胞のコンディショナルノックダウン

骨芽細胞の歯足骨の骨モデリングにおける役割を調べるために、*ColX*-NTR-GFP Tg ラインを作製し、メロニダゾール処理によって骨芽細胞をコンディショナルに除去する実験系を樹立した。NTR はプロドラック型のメロニダゾールを無害な状態から有毒な型へと変化させる酵素であり、NTR を発現している細胞をメロニダゾールによって処理するとその細胞は細胞死を起こす。ある細胞のマーカーのプロモーター下で NTR を発現するような Tg ラインを作製すると、メロニダゾール処理によってその細胞のみを効率的に除去することが可能である⁴⁷。

type X collagen は哺乳類においては肥大軟骨細胞マーカーであるが、小型魚類においては分化初期の骨芽細胞のマーカーとして使われている²⁷。咽頭歯において *type X collagen* の内在性 mRNA の発現箇所を WISH 法により検出した。結果、Tg ラインの蛍光発現は内在性の mRNA の発現を反映していた(図 3.8 A, C 上パネル)。咽頭歯における *osterix* と *type X collagen* の発現箇所を調べるために *ColX*-NTR-GFP/*osterix*-DsRed ダブル Tg ラインを作製し、切片によって蛍光パターンを確認した。その結果、*type X collagen*、*osterix* 共に歯足骨と歯髄および歯胚の一部での発現が認められたが、歯髄及び歯胚の底部では *osterix* の強い発現が確認された(図 3.8 C 下パネル)。歯を形成する象牙芽細胞マーカーである *DSPP* の発現を *in situ hybridization* によって確認したところ、この *osterix* の発現が強い部位と一致していた(図 3.8 B, C 下パネル)。マウスにおいては象牙芽細胞が *osterix* を発現するという報告がある⁴⁸。ことも踏まえると、この *osterix* の発現が強い領域には象牙芽細胞が局在していると考えられる。

以上のことから *type X collagen* は歯足骨においてより骨芽細胞特異的なマーカーであるといえる。

まず、この Tg ラインにおいてメロニダゾールによる骨芽細胞の除去が可能かどうかを調べるために、1 dph の *ColX-NTR-GFP* 稚魚を 2 日間 5 mM メロニダゾール中で飼育し、継時的に咽頭歯における蛍光シグナルをライブイメージングした(図 3.9 A)。コントロールにはメロニダゾール処理を行っていない同腹の Tg 個体を用いた。結果、2 dpt においてコントロールは咽頭歯部に蛍光が確認できるのに対し、処理を行った個体では蛍光シグナルが減少していた。アブレーション後、メロニダゾールによる処理をやめると骨芽細胞は再び現れた(図 3.10)。これが骨芽細胞特異的なアポトーシスによるものなのかを調べるために、同様の条件で稚魚を処理したのち、TUNEL 染色を行った。コントロールには同腹の Tg のノンキャリア、すなわち NTR のトランスジーンを持たない野生型を用い、同様にメロニダゾール処理を行った。結果、*ColX-NTR-GFP* の Tg 個体において、骨芽細胞が多く局在する鰭条骨で多数の TUNEL 陽性細胞が確認できたが、NTR 陰性の個体ではほとんど検出されなかった(図 3.9 B)。成魚においても同様に骨芽細胞のアブレーションが行えるかどうかを調べるために、*ColX-NTR-GFP/osterix-DsRed* ダブル Tg 個体をメロニダゾール処理した後、個体から咽頭歯を摘出し、切片を作製して DsRed の蛍光を検出した(図 3.11 A)。薬剤処理は 3 日間、3.2.8 節に書いた通りに行った。コントロールとして、NTR を含まない *osterix-DsRed* のみの Tg ラインを用い、同様にメロニダゾールで処理をした。その結果、NTR 陰性個体では歯足骨上に多数の DsRed 陽性骨芽細胞が確認されたのに対し、NTR 陽性個体では歯足骨上の骨芽細胞が減少していた。興味深いことに、骨芽細胞の減少はステージ II, III で強い傾向にあり、ステージ I において活発中に骨形成を行っている *osteoblast I* は残留したままの傾向にあった(図 3.11 B)。以上のことからこの Tg ラインは骨芽細胞のコンディショナルな除去実験に有用であると結論付けた。

骨芽細胞の除去による破骨細胞への影響を調べるために、*ColX-NTR-GFP/TRAP-DsRed*

ダブル Tg ラインの稚魚を 5 mM メロニダゾールで処理し、継時的にライブイメージングを行った(図 3.12 A)。コントロールには NTR を持たない *TRAP-DsRed* のみの Tg 個体を用いた。その結果、骨芽細胞が残ったままの 1 dpt においては DsRed 陽性領域に変化は見られなかったが、骨芽細胞が 2 dpt で消失したわずか1日後の 3 dpt には、DsRed 陽性領域はほとんど認められなくなった(図 3.12 B)。

成魚でも同様の結果が得られるか確かめるために、*ColX-NTR-GFP* Tg ラインの成魚をメロニダゾールにて 5 日間薬剤処理をした。コントロールには NTR を持たない同腹の野生型個体を用い、同様に薬剤処理を行った。処理後咽頭歯を摘出し、切片を作製して Von Kossa/TRAP の共染色を行ったところ、NTR Tg ラインにおいて劇的に破骨細胞が減少することが分かった(図 3.13 A, B)。その影響は成熟歯のステージ全体にわたっており、単核破骨細胞だけでなく多核の破骨細胞も減少していた。同様に処理した個体の咽頭歯から mRNA を抽出し、*TRAP* に対する RT-PCR を行ったところ、内在性の mRNA の発現量も減少していることが分かった(図 3.13 C)。一方、破骨細胞分化に必要とされている *RANKL* の発現は減少していなかった。破骨細胞の減少がアポトーシスによるものなのかを調べるために、*ColX-NTR-GFP/TRAP-DsRed* ダブル Tg ラインの成魚について5日間メロニダゾール処理を行った。処理後に咽頭歯を摘出し、切片を作ったのちに TUNEL 染色を行ったところ、歯足骨列の吸収面で TUNEL 陽性の細胞が確認され、そのうちのいくつかは DsRed 陽性であった(図 3.13 D)。以上の結果から、骨芽細胞は破骨細胞に対し生存因子(survival factor)を産生することでその生存を調節していることが示唆された。

3.4 考察

3.4.1 骨モデリングにおける破骨細胞と骨芽細胞の相互作用

本章では *c-fms-a* 変異体の解析結果から、破骨細胞が正常な骨モデリングに必須であることを証明した。また、*c-fms-a-GFP* を用いた破骨細胞前駆細胞の局在に関する解析及び

ColX-NTR-GFP を用いた骨芽細胞のアブレーション実験の解析から、歯足骨の骨モデリングにおいては骨芽細胞が破骨細胞の分化を制御し、また生存因子によってその吸収活性を調節している可能性を示唆した。序論でも述べたように、これまで骨モデリングにおいてはその局在の乖離から破骨細胞と骨芽細胞の相互作用は無いとされてきた。しかしながら本研究では歯交換に伴った歯足骨の代謝という骨モデリングの新しいモデル系を用い、*Tg* ラインや変異体、*NTR* システムを利用して *in vivo* でこれらの細胞の相互作用の可能性にアプローチできたとと言えるだろう。

本章で明らかになった破骨細胞と骨芽細胞の相互作用の可能性を以降論じていく。前章の考察部分で、歯足骨のモデリングが正常に行われるためには破骨細胞に対して以下の二点が要求されると考えた。まず、(1)破骨細胞による骨吸収箇所が正しく制御されること、そして(2)形成面での骨芽細胞による骨形成量と吸収面での破骨細胞による骨吸収量のバランスがとれていることである。これを達成するために、破骨細胞は咽頭歯の発達に伴った細胞学的な変化等に同調して分化や増殖、機能調節を行っているという仮説を立てたが、本章のデータからそれぞれが骨芽細胞によって制御されるという可能性が示唆された。すなわち、この(1)は *osteoblast I* によって、(2)は *osteoblast II* によって制御されている可能性があることを示した(図 3.14)。

3.4.2 破骨の分化調節と *osteoblast I*

まず(1)の破骨細胞の局在箇所の制御について述べる。*c-fms-a-GFP Tg* ラインの組織解析の結果から、破骨細胞前駆細胞は歯足骨が形成される前の歯胚の状態から歯に局在していることがわかった。さらに *c-fms-a-GFP* 陽性の破骨細胞前駆細胞は、*osteoblast I* と骨形成面で接触しており、ステージ I の P 歯足骨形成後になると単核の破骨細胞が現れていた。歯胚は誕生後も絶対的な位置を変えずにその場で成長し、ステージ I となって歯足骨を形成し始めることを考えると、歯胚に局在していた破骨細胞前駆細胞はそのまま歯の萌出ステージまで維持

され、ステージ I となって **osteoblast I** が歯足骨を形成し始めたところで初めて刺激を受けて単核の破骨細胞へと分化し、その後のステージでは歯足骨内に局在するようになるのだと考えられる(図 3.14 I)。このように萌出に伴った骨芽細胞による歯足骨の形成という、歯の発生ステージの進行によって起こるイベントに付随して分化のタイミングが制御されることで破骨細胞の出現箇所が調節されているのだと考え、ステージ III における成熟破骨細胞への分化も、同様に歯の発生ステージの何らかのイベントに伴った骨芽細胞や、その他の細胞の変化によって誘導されているという可能性が考えられる(図 3.14 III)。

3.4.3 破骨の骨吸収量の調節と **osteoblast II**

さらに(2)の骨形成量に合わせた骨吸収活性の調節に関しても考える。**ColX-GFP-NTR** を用いた解析により、骨芽細胞のアポトーシス直後、破骨細胞が急激に減少することがわかった。この減少は破骨細胞のステージによらず、単核及び多核の破骨細胞双方が消失していた。この消失は破骨細胞のアポトーシスによるものであることが **TUNEL** 染色からわかった。しかし、骨芽細胞については **osteoblast II** は効率よく除去できていたものの、**osteoblast I** はメトロニダゾールによる除去処理後も比較的残っているということがわかった。以上のことから、**osteoblast II** は破骨細胞の歯足骨上での生存に重要な働きを持つということが考えられる。そこで私は **osteoblast II** が破骨細胞に対して生存因子を産生することにより相互作用を介して破骨細胞の骨吸収を制御する仕組みを持っていると仮説を立てた(図 3.14 I-III)。

この生存因子として **M-CSF** が挙げられる。**M-CSF** は本章で変異体を作製した **c-fms** のリガンドであり、これが受容体に結合すると、破骨細胞前駆細胞は増殖や分化が促進される。また、**M-CSF** は破骨細胞の生存を促進するという報告がある²⁰。さらに **RANKL** は **M-CSF** 同様に骨芽細胞から産生され破骨細胞の分化、増殖、生存などの生理活性について大きな影響を持つが、アブレーションした際の発現量をコントロールと比較したが、大きな差は認められなかった。以上のことから **osteoblast II** が分泌する生存因子は **M-CSF** だという可能性が考えられる。

表 1. TALENのターゲット配列及びアミノ酸配列

ターゲット遺伝子	場所	ターゲットのゲノム配列*	repeat variable di-residues (RVD)のアミノ酸配列	TALENIによって誘導された13塩基欠損
c-fms-a	L	↑CCGCACCTTCAAGGTGGA	HD HD NN HD NI HD HD NG NG HD NI NI NN NN NG NN NN NI	WT : CCGCACCTTCAAGGTGGATCGGCCACTGCAGAA↑TCTCTGGAACGTACAA
	R	↑TTGTACGTCCAGTGAA	NG NG NN NG NI HD NN NG NG HD NI NN NG NN NI NI	MT : CCGCACCTTCAAGGTGGATCGCG_____CACTGGAACGTACAA

*下段はそれぞれのTALENIについての5'端のターゲット配列におけるチミンを表す

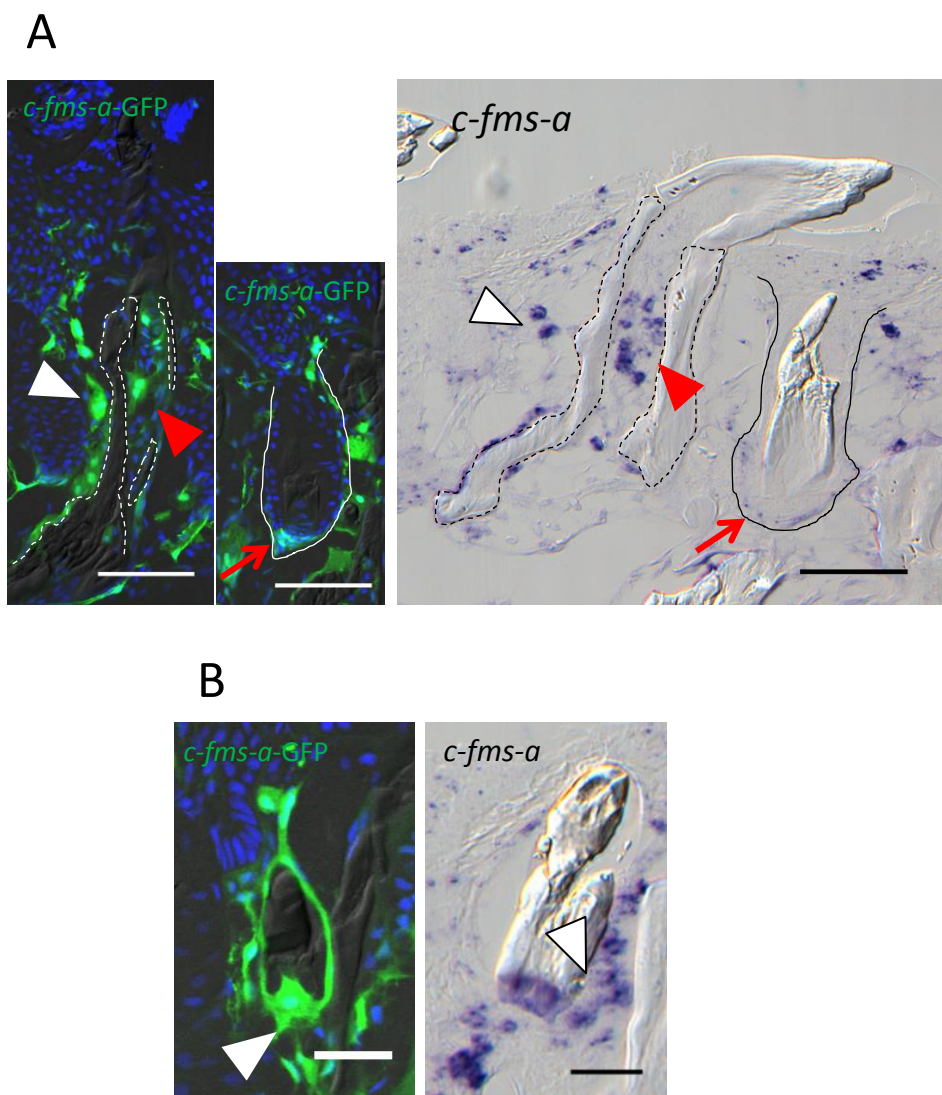
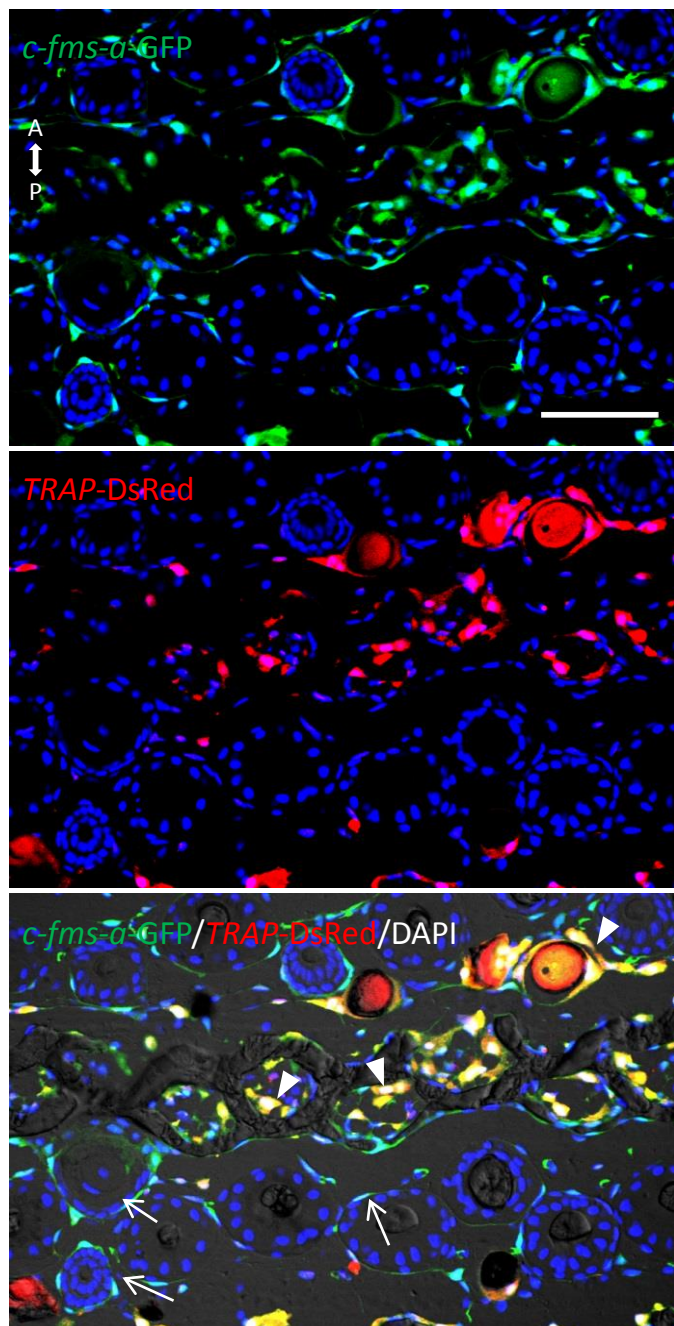


図3.1. *c-fms-a*-GFP TgラインにおけるGFPの発現と内在性*c-fms-a* mRNAの発現

(A) ステージI成熟歯の歯足骨(左)とステージII歯胚(中央)におけるTgラインのGFPの発現は、内在性の*c-fms-a* mRNAの発現(右)を再現していた。GFPとmRNAのシグナルはA歯足骨(白矢頭)、歯足骨内側(赤矢頭)、歯胚底部(赤矢印)で認められた。点線は歯足骨、実線は歯胚を表している。(B) 脱落歯周囲のGFPの発現(左)は内在性の*c-fms-a* mRNAの発現(右)を再現していた(矢頭)。スケールバー: 50 μ m (A), 20 μ m (B)。

A



B

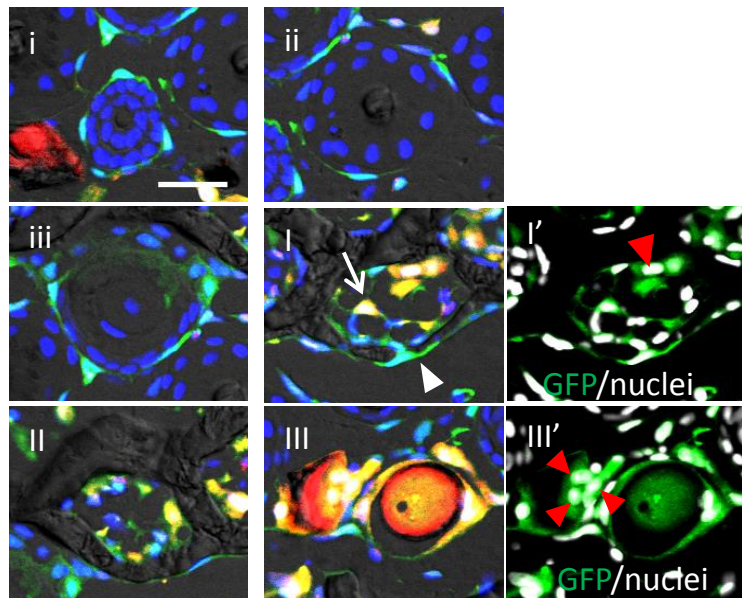


図3.2. *c-fms-a*陽性破骨細胞前駆細胞の歯足骨における局在

(A) *c-fms-a*-GFP/*TRAP*-DsRedダブルTgラインにおけるGFPとDsRedの発現。GFP(A上)とDsRed(A中央)の蛍光シグナルは歯足骨上でmergeした(A下、矢頭)。一方、歯足骨の無い歯胚においてはGFPのシグナルのみ検出された(A下、矢印)。(D) A下パネルにおける各ステージの歯を拡大した像。左上につけられたローマ数字はステージを表す。I' and III'はIとIIIにおけるGFP(緑)と核(白)のmerge像を表す。赤矢頭は破骨細胞の核を表す。ステージIの拡大像において、白矢印で表したGFP/DsRed共陽性の破骨細胞は歯足骨内に存在し、GFP陽性/DsRed陰性の破骨細胞前駆細胞(白矢頭)が局在するP歯足骨の外側には決して存在しなかった。スケールバー: 50 μ m (A), 20 μ m (B).

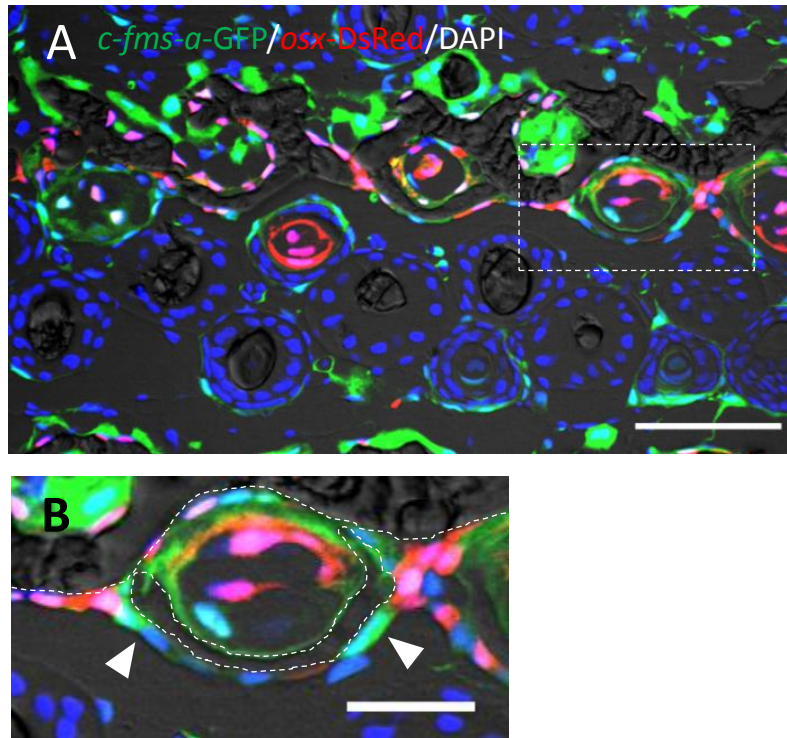


図3.3. 形成中歯足骨における破骨細胞前駆細胞とosteoblast I

(A) *c-fms-a-GFP/osterix-DsRed* ダブルTgラインの歯足骨列におけるGFPとDsRedのシグナル。(B) Aの点線四角で囲った、ステージIの歯足骨の拡大図。歯足骨は点線で表している。矢頭は新しく形成されたP歯足骨外側において破骨細胞前駆細胞がDsRed陽性のosteoblast Iと接触している様子を表している。スケールバー: 50 μ m (A), 20 μ m (B).

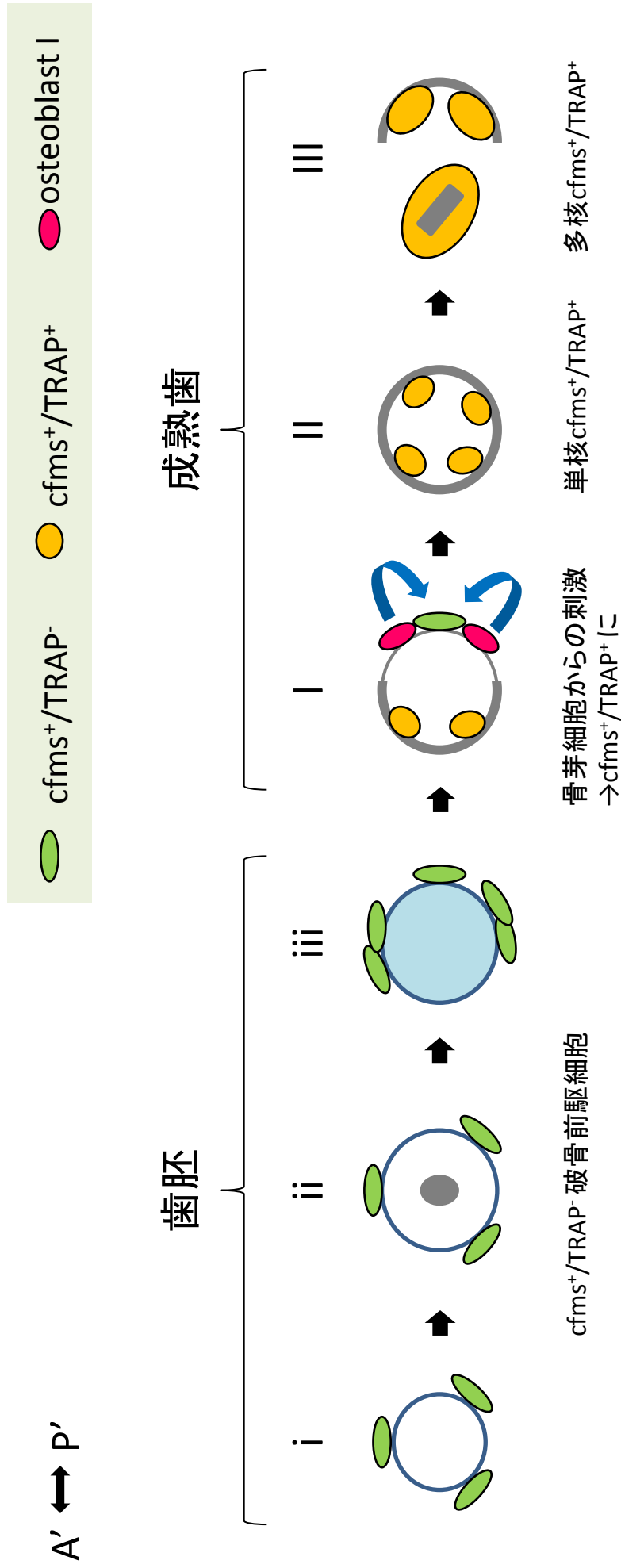


図3.4. 歯足骨における破骨細胞の分化と骨芽細胞

歯足骨における破骨細胞の分化に関する模式図。円は歯胚の輪郭もしくは成熟歯の歯足骨を表している。各種細胞は図中に記した通りである。歯胚においては破骨細胞前駆細胞のみが局在し、骨吸収を行うTRAP陽性の破骨細胞は局在していないかった。前駆細胞は、ステージIIにおいてP歯足骨を活発に形成中であるosteoblast Iと、P歯足骨の外面で接触していた。ステージIのP歯足骨よりもanterior側ではTRAPとc-fms-a共陽性の破骨細胞が局在していた。

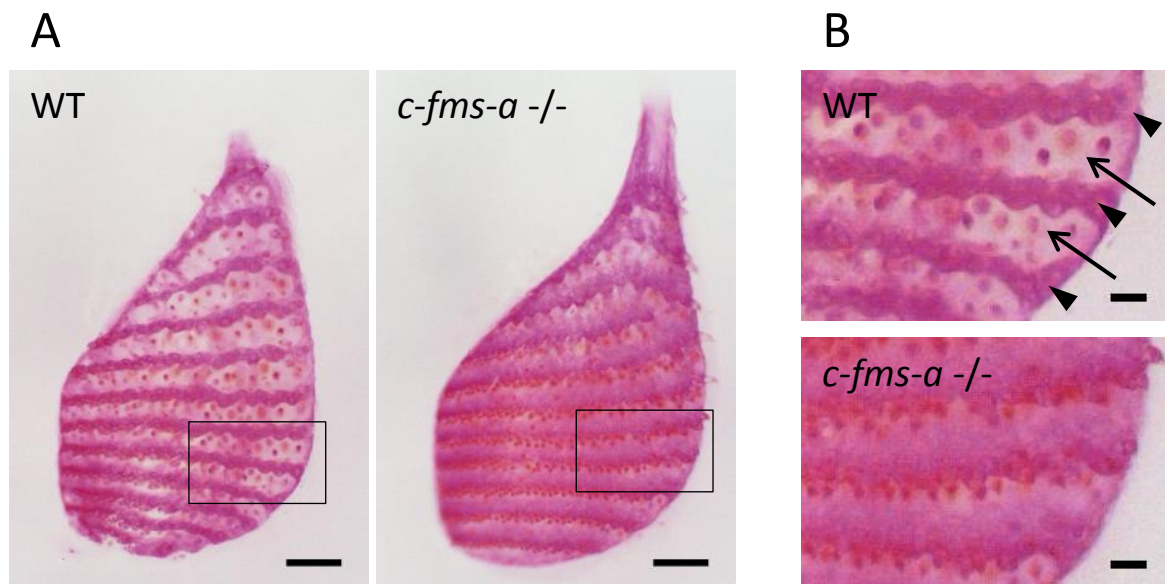


図3.5. *c-fms-a*変異体の咽頭歯では異所性の骨が存在する

(A) 野生型 (WT) と *c-fms-a* 変異体 (*c-fms-a* -/-) から摘出した咽頭歯骨全体のアリザリンレッド染色像。(B) Aの四角で囲った部分の拡大像。野生型では成熟歯列(矢頭)間に、歯胚が局在するアリザリンレッド陰性の領域(矢印)が確認できるのに対し、変異体にはほとんど確認できなかった。スケールバー: 200 μ m (A), 50 μ m (B).

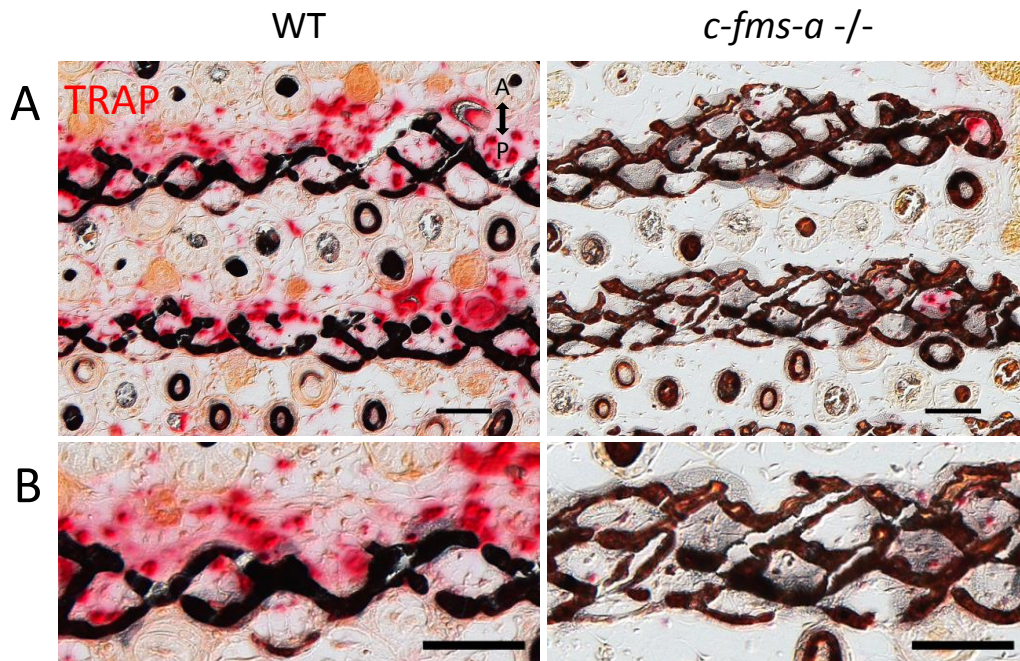


図3.6. *c-fms-a*変異体では歯足骨上の破骨細胞が減少し、骨モデリング異常を示す

(A) 野生型 (WT) と *c-fms-a* 変異体 (*c-fms-a* $-/-$) の歯足骨列水平切片に対し、Von Kossa/TRAP 染色を行い、骨組織を黒色に、破骨細胞を赤色にて検出した像。TRAP 陽性領域が変異体では野生型に比べ顕著に減少しているのがわかる。(B) A の拡大像。野生型と比較して変異体では歯足骨列を構成する歯足骨の数が増加し、AP 方向の幅が広がっている。スケールバー: 50 μm .

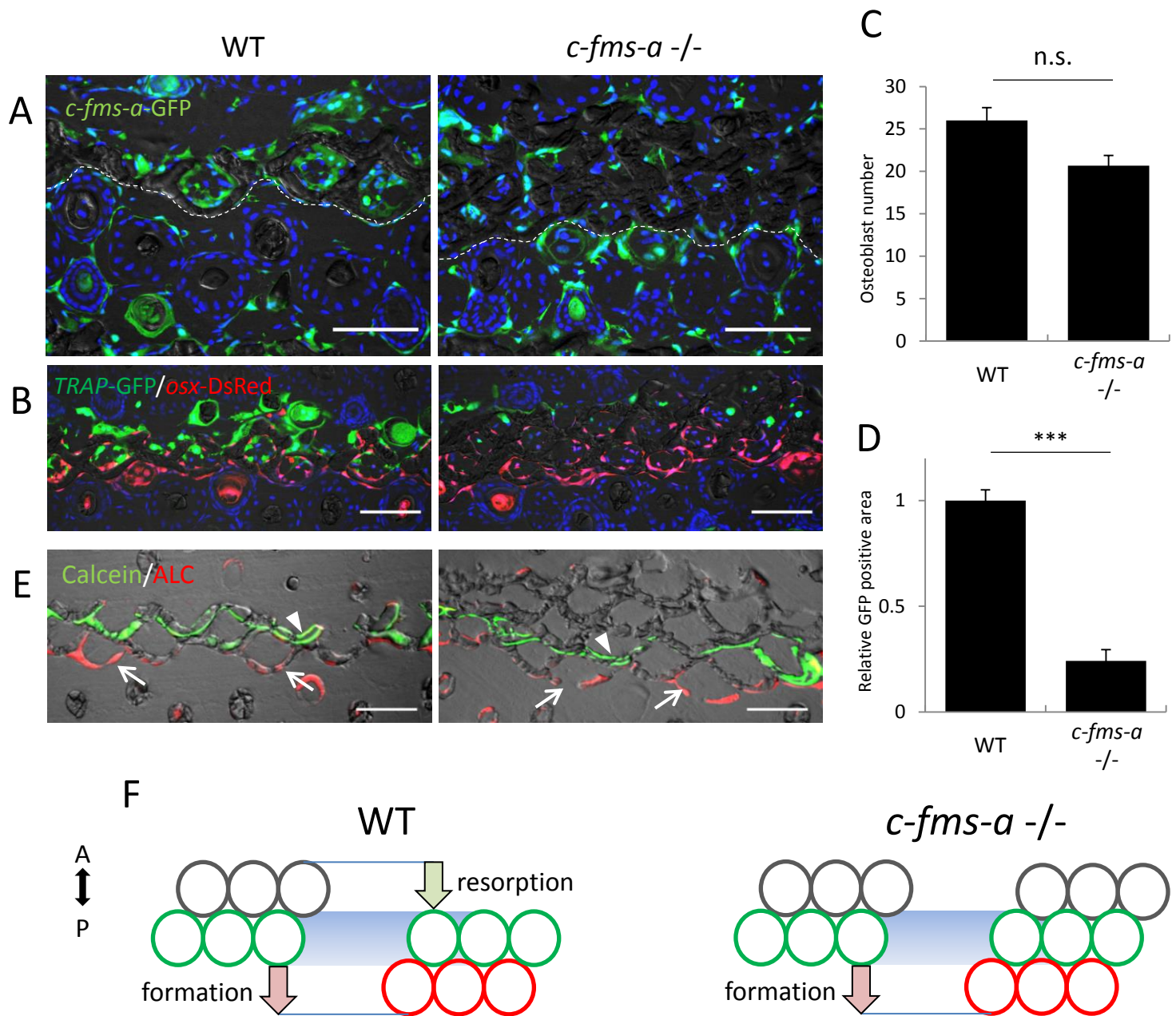


図3.7. *c-fms-a*変異体における破骨細胞と骨芽細胞

(A) 野生型 (WT) と *c-fms-a* 変異体 (*c-fms-a*^{-/-}) の歯足骨列及び歯胚における、*c-fms-a*-GFP の発現。歯足骨列の最も posterior 側の境界面を点線で表している。点線より posterior 側の歯胚領域では GFP 陽性領域の差は見られないが、anterior 側では野生型に比べ、変異体で GFP 陽性領域が減少している。(B) 野生型 (WT) と *c-fms-a* 変異体における TRAP-GFP/*osterix*-DsRed の蛍光シグナルの発現。(C) 野生型と変異体における骨芽細胞数についての定量解析のグラフ。骨芽細胞の数はそれぞれの個体からランダムに選んだステージ II の歯 5 本に局在していたものの合計数を数えた (WT: n=3, *c-fms-a*: n=3; error bars は s.e. m. を示す; n.s. p > 0.05 vs. WT)。(D) 野生型と変異体における GFP 陽性領域についての定量解析のグラフ (WT n=3, *c-fms-a* n=3; error bars は s.e. m. を示す; *** p < 0.001 vs. WT)。(E) 野生型と変異体について、カルセインと ALC による 7 dpt の二重標識を行った個体から摘出した咽頭歯骨の水平切片像。野生型でも変異体でも ALC 陽性の歯足骨 (矢頭) が、カルセイン陽性の歯足骨の posterior 側に一列できている。(F) 野生型と変異体における歯足骨列の代謝の模式図。円は歯足骨を表している。スケールバー: 50 μ m。

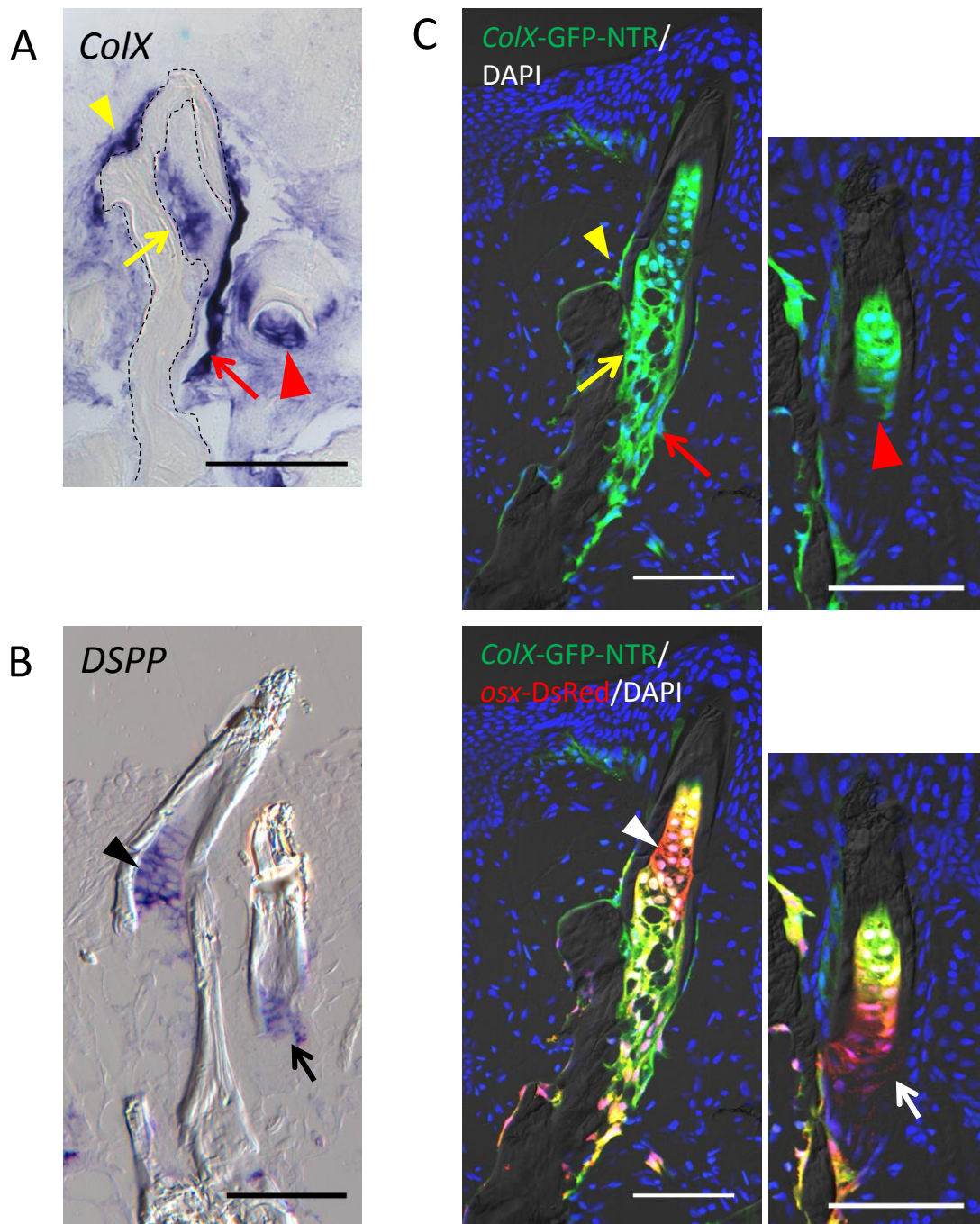


図3.8. *type X collagen*の発現と象牙芽細胞

(A) 歯足骨及び歯胚における*type X collagen*の発現。歯足骨は点線で表している。シグナルの検出時間を長く設定し、弱い発現も確認できるようにした。発現は歯胚(赤矢頭)、P歯足骨(赤矢印)、歯足骨内部(黄矢印)、A歯足骨上部(黄矢頭)で確認された。(B) 歯足骨及び歯胚における象牙芽細胞マーカー*DSPP*の発現。発現は歯胚底部(矢印)、歯髓底部(矢頭)で確認された。(C) *ColX-GFP-NTR/osterix-DsRed*ダブルTgラインにおける蛍光シグナル。(C, 上パネル) 歯足骨及び歯胚におけるGFPの発現。発現は歯胚(赤矢頭)、P歯足骨(赤矢印)、歯足骨内部(黄矢印)、A歯足骨上部(黄矢頭)で確認された。(C, 下パネル) GFPとDsRedのmerge像。ほとんどが共発現しているが、歯胚底部(矢印)、歯髓底部(矢頭)でDsRedの発現が強かった。スケールバー: 50 μ m.

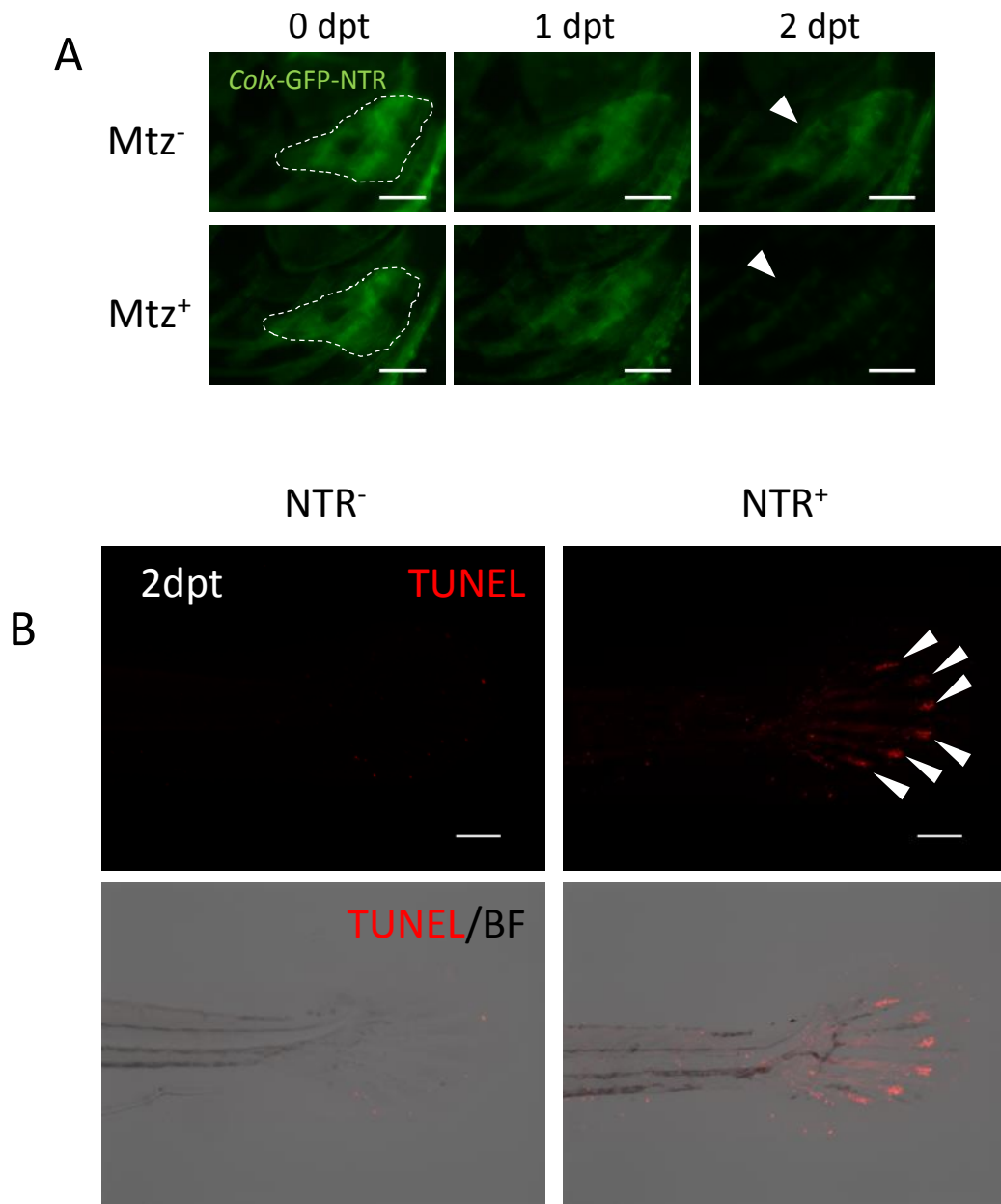


図3.9 稚魚におけるNTRシステムの有効性チェック

(A) *ColX*-GFP-NTRの稚魚を飼育水 (Mtz^- , コントロール) 及び5 mMメトロニダゾール (Mtz^+) 中で飼育し、上顎咽頭歯骨における蛍光シグナルをライブイメージングした。点線は咽頭歯骨を表している。メトロニダゾール中で飼育したものについては2 dptにおいてGFP陽性領域の減少が見られたが、コントロールでは見られなかった(矢頭)。(B) トランスジェーンを含まない野生型 (NTR^- , コントロール) 及び*ColX*-GFP-NTRの稚魚 (NTR^+) を5 mMメトロニダゾール中で2日間飼育し、TUNEL染色を施してヒレにおいてアポトーシスを起こしている骨芽細胞を検出した。矢頭は鰭条骨上のTUNEL陽性のアポトーシスを起こしている骨芽細胞を示している。スケールバー: 100 μm .

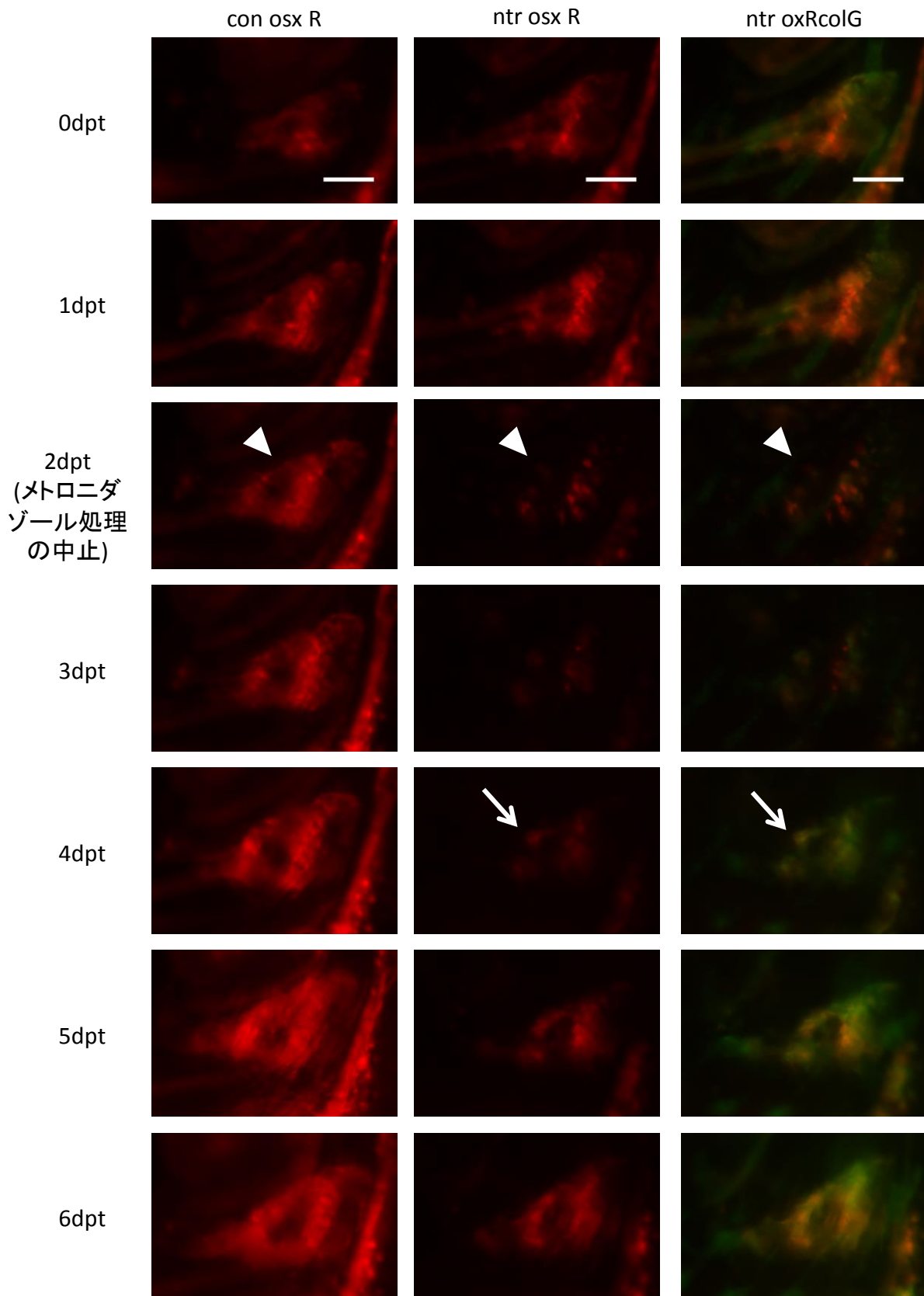
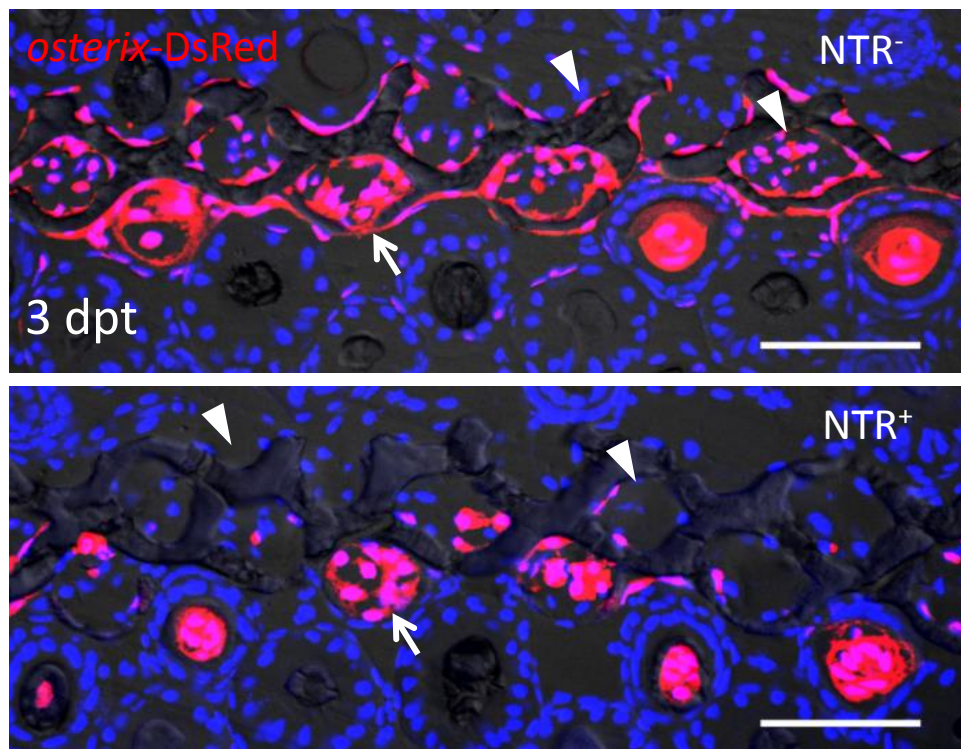


図3.10. 骨芽細胞のアポトーシスとその後の復活

osterix-DsRed (NTR⁻, コントロール) 及び *ColX*-GFP-NTR/*osterix*-DsRed (NTR⁺) ダブルTgラインの稚魚を5 mMのメトロニダゾールで2日間処理した後、飼育水中で飼育した。2 dptにおいて、NTR⁺におけるDsRedの蛍光シグナルは、NTR⁻と比較して減少していた(矢頭)。メトロニダゾール処理からの回復2日目である4 dptにおいて、NTR⁺におけるGFPとDsRedの蛍光シグナルは回復の兆しを見せ始め(矢印)、その後輝度を増していった。スケールバー: 100 μ m.

A



B

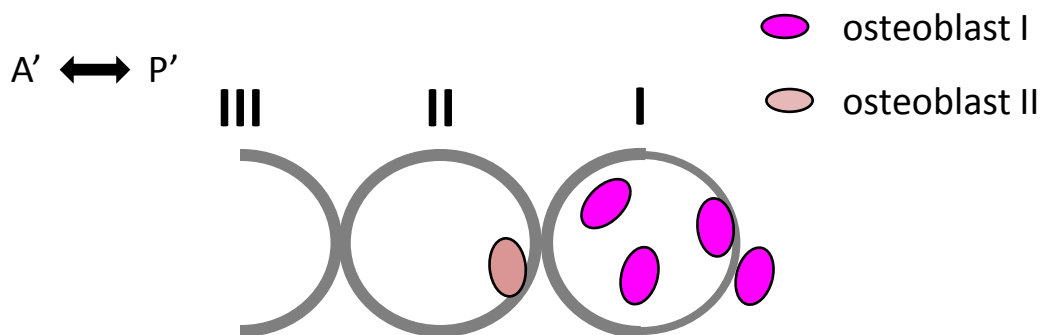


図3.11. 歯足骨に局在する骨芽細胞のメトロニダゾールによる除去

(A) *osterix-DsRed* (NTR⁻, コントロール) 及び *ColX-GFP-NTR/osterix-DsRed* (NTR⁺) ダブルTgラインの成魚を5 mMのメトロニダゾールで3日間処理した後に摘出し、水平切片を作製して歯足骨列状の骨芽細胞の除去状態を調べた。コントロールに比べ、NTR⁺における骨芽細胞はステージIIやIII(矢頭)ではほとんど除去されていたが、ステージI(矢印)では比較的残っていた。(B) メトロニダゾールによる骨芽細胞の除去状態の模式図。灰色の円は歯足骨を表し、各細胞は図中に示した通りである。スケールバー: 50 μ m.

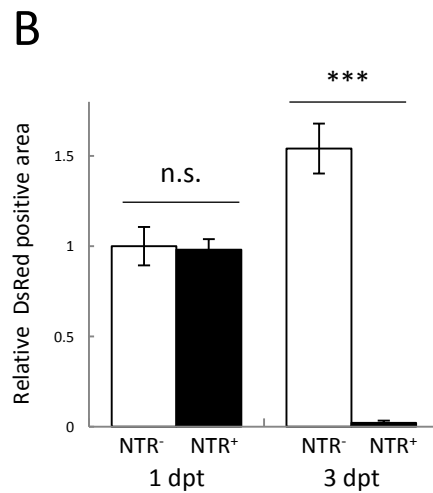
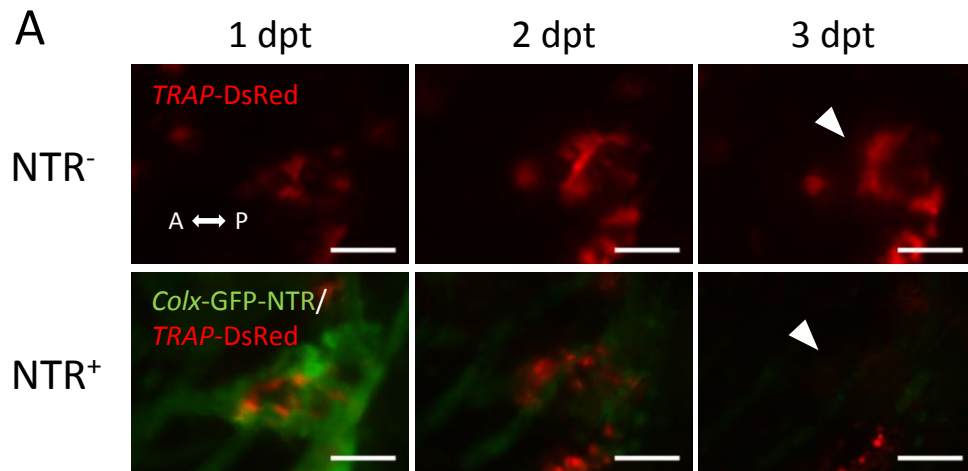


図3.12. 骨芽細胞の死後すぐに破骨細胞も減少する

(A) *osterix*-DsRed (NTR⁻, コントロール) 及び *ColX*-GFP-NTR/*TRAP*-DsRed (NTR⁺) ダブルTgラインの稚魚を5 mMのメトロニダゾールで処理しながら継時的に咽頭歯骨における蛍光を観察した。GFPシグナル(*ColX*陽性の骨芽細胞)が2 dptにおいて顕著に減少しているのがわかる。さらにそれに引き続いて破骨細胞のDsRedシグナルも3 dptで顕著に減少していた(矢頭)。(B) 1 dptと3 dptにおける、*TRAP*-DsRed (NTR⁻)と*ColX*-GFP-NTR/*TRAP*-DsRed (NTR⁺)の、咽頭歯骨におけるDsRed陽性領域についての定量解析のグラフ(1 dpt 及び3 dptの両方について、NTR⁻ n=4, NTR⁺ n=4; error barsはs.e. m.を示す; *** p < 0.001 vs. control)。スケールバー: 100 μ m。

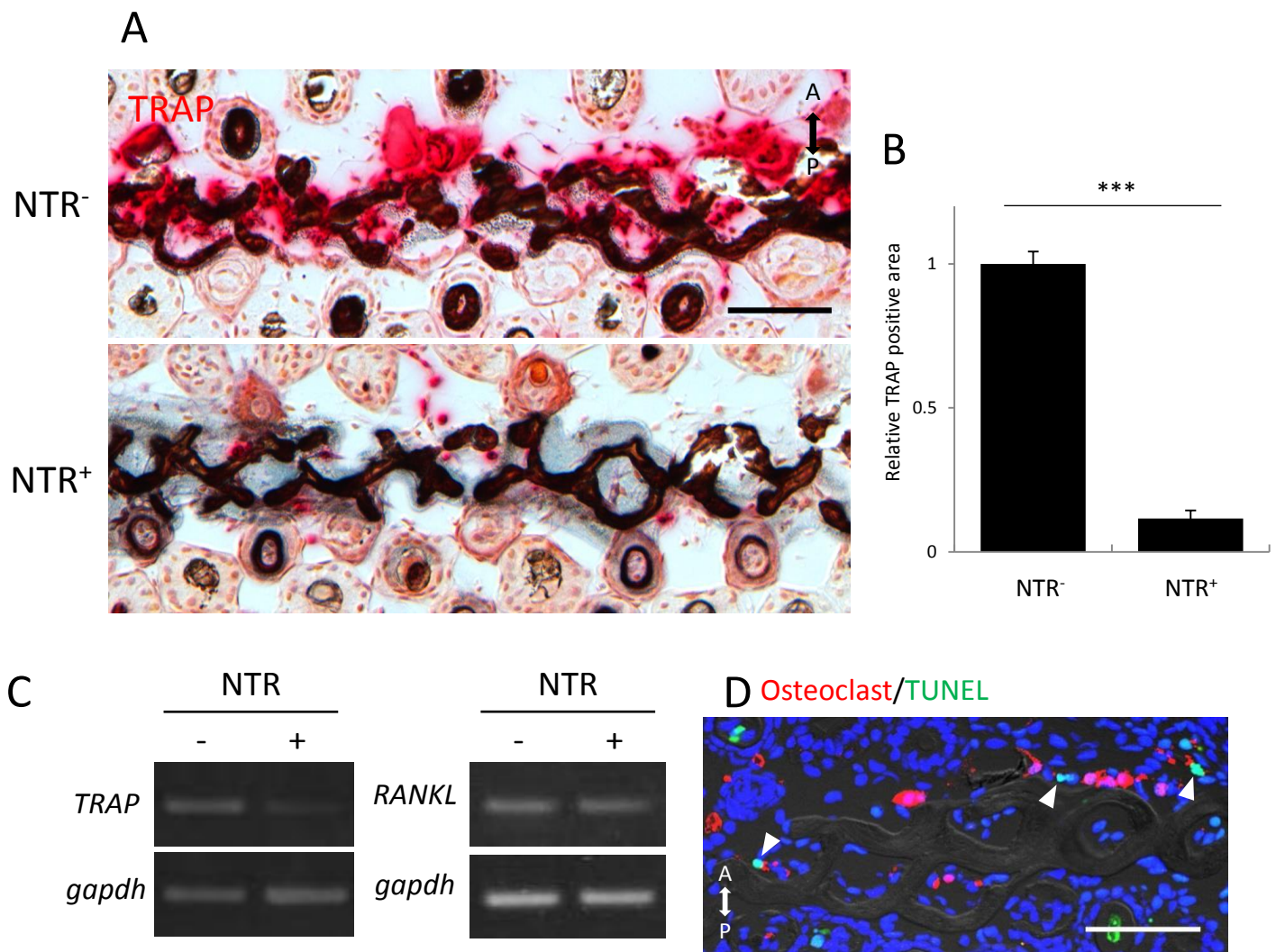


図3.13. 成魚における骨芽細胞の死後に起こる破骨細胞の減少

(A) トランスジーンを含まない野生型 (NTR^{-/-}, コントロール) 及び *ColX*-GFP-NTR (NTR^{+/-}) の成魚の 5 dpt における TRAP 活性。歯足骨列を Von Kossa 染色によって可視化した。(B) 5 dpt における、野生型 (NTR^{-/-}, コントロール) 及び *ColX*-GFP-NTR (NTR^{+/-}) 成魚の歯足骨列における TRAP 陽性領域についての定量解析のグラフ (NTR^{-/-} n=4, NTR^{+/-} n=4 ; error bars は s. e. m. を示す; *** p < 0.001 vs. WT)。(C) 5 dpt の野生型 (NTR^{-/-}, コントロール) 及び *ColX*-GFP-NTR (NTR^{+/-}) 成魚咽頭歯骨から抽出した mRNA による、*TRAP* 及び *RANKL* についての半定量 RT-PCR。(D) 5 dpt の *ColX*-GFP-NTR/*TRAP*-DsRed (NTR^{+/-}) 成魚歯足骨列における、DsRed (赤) 及び TUNEL (緑) の共染色像。矢頭は DsRed と TUNEL が共染色されている細胞を表す。スケールバー: 50 μ m。

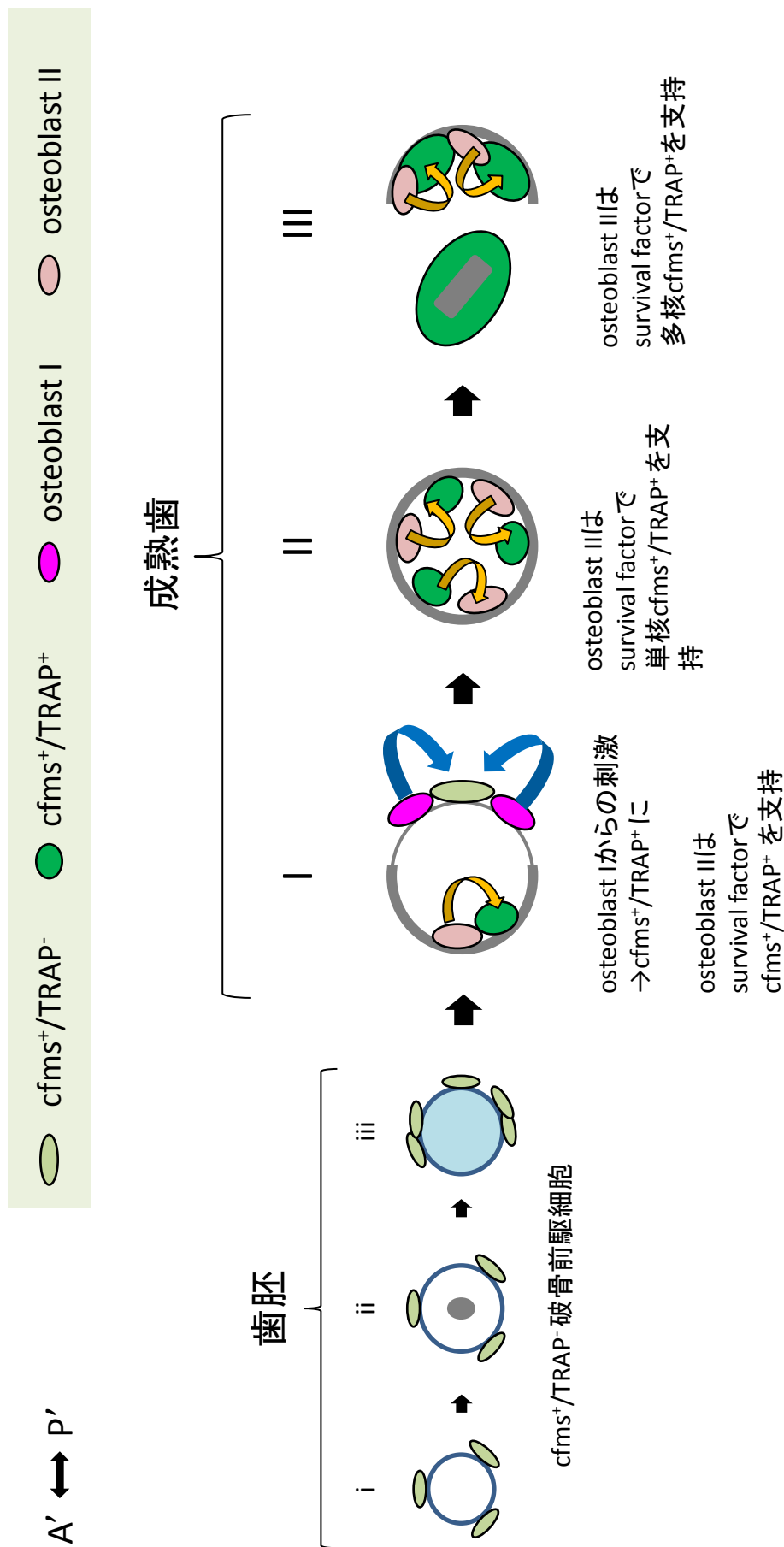


図3.14. 骨芽細胞は破骨細胞の分化及び生存を制御することで歯足骨の骨モデリングを調節している
 歯足骨の代謝を骨芽細胞及び破骨細胞がどのように調節しているかを表した模式図。円は歯胚の輪郭もしくは成熟歯の歯足骨を表している。各種細胞は図中に記した通りである。歯胚においては破骨細胞前駆細胞のみが局在し、骨吸収を行うTRAP陽性の破骨細胞は局在していない。前駆細胞は、ステージIIにおいてP歯足骨を活性に形成中であるosteoblast Iより、P歯足骨の外面で分化の刺激を受ける。ステージIIIのP歯足骨よりanterior側ではTRAPとc-fms-a共陽性の破骨細胞が局在しており、osteoblast IIから生存因子 (survival factor) を受けることで生存している。破骨細胞はステージIIIにおいて何らかの刺激を受け、多核化して活発に骨吸収を行う

第四章 総括と展望

本研究では歯交換に伴った歯足骨の代謝という、新しい骨モデリングのモデル系について組織学的、また細胞学的にそのメカニズムについて解析を行った。この歯足骨の骨モデリングは、哺乳動物における骨モデリングの重要な特徴は残しながらも、既存の骨モデリング解析系の複雑さから生じる問題を解決できる、よりモデル化されたシンプルな解析系であった。さらに、遺伝子操作の行い易さというメダカが持つ利点と合わせて、Tg ライン、変異体、コンディショナルなアブレーションシステムによって、この骨モデリングシステムを用いた解析を行うことで、骨モデリングが持つ骨芽細胞及び破骨細胞の相互作用の可能性についてアプローチできたものと考えられる。

歯足骨の骨モデリングにおいては、骨芽細胞が破骨細胞の分化、及び生存を制御することでその局在位置や吸収活性を調節することによって、骨モデリングシステムの統一的な制御をするという可能性が示唆された。分化制御については形成中の歯足骨で *osteoblast I* から刺激を受けた前駆細胞が本当に破骨細胞に分化するのか、また、成熟破骨細胞への分化が何によって制御されているのかを明らかにできなかった。また、骨芽細胞から分泌される生存因子については *M-CSF* ではないかという仮説を立てるにとどまり、その証明を行っていない。今後、この研究を発展させていくうえで、*Cre-LoxP* システムを利用して *c-fms-a* 陽性の前駆細胞の細胞系譜の追跡をすることで、より詳細な破骨細胞前駆細胞の分化後のトレースを行うことや、*M-CSF* 及びその他の破骨細胞の生存因子を、薬剤や *NTR Tg* ラインの作製によってコンディショナルにノックダウンすることで骨芽細胞アブレーション系のフェノコピーを行うことによって、骨芽細胞から産生される生存因子の特定をすることが必要であると考えている。

本研究で確立した歯足骨の骨モデリングについての今後の解析によって、骨モデリングという体の基本構造を支える骨を効率的に形作るための、非常によくデザインされたシステムのメカニズムの一端が解明されることを望む。

参考文献

- 1 須田立雄ら. 新 骨の科学 Bone Biology. (医歯薬出版株式会社, 2007).
- 2 Nanci, A. Ten Cate 口腔組織学. 第 6 版. (医歯薬出版株式会社, 2006).
- 3 松本歯科大学大学院硬組織研究グループ. 硬組織研究ハンドブック. (松本歯科大学出版会, 2005).
- 4 Frost, H. M. Mechanical determinants of bone modeling. *Metabolic bone disease & related research* **4**, 217-229 (1982).
- 5 Frost, H. M. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's law: the bone modeling problem. *The Anatomical record* **226**, 403-413, doi:10.1002/ar.1092260402 (1990).
- 6 Baron, R. & Kneissel, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature medicine* **19**, 179-192, doi:10.1038/nm.3074 (2013).
- 7 Jee, W. S. & Frost, H. M. Skeletal adaptations during growth. *Triangle; the Sandoz journal of medical science* **31**, 77-88 (1992).
- 8 Kobayashi, S. *et al.* Trabecular minimodeling in human iliac bone. *Bone* **32**, 163-169 (2003).
- 9 Jee, W. S., Tian, X. Y. & Setterberg, R. B. Cancellous bone minimodeling-based formation: a Frost, Takahashi legacy. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **7**, 232-239 (2007).
- 10 Lee, K. S. *et al.* Runx2 is a common target of transforming growth factor beta 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* **20**, 8783-8792, doi:Doi 10.1128/Mcb.20.23.8783-8792.2000 (2000).
- 11 Dupont, S. *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179-183, doi:10.1038/nature10137 (2011).
- 12 Kahn, A. J., Simmons, D. J. & Krukowski, M. Osteoclast precursor cells are present in the blood of preossification chick embryos. *Developmental biology* **84**, 230-234 (1981).
- 13 Walker, D. G. Control of bone resorption by hematopoietic tissue. The induction and reversal of congenital osteopetrosis in mice through use of bone marrow and splenic transplants. *The Journal of experimental medicine* **142**, 651-663 (1975).
- 14 Yoshida, H. *et al.* The Murine Mutation Osteopetrosis Is in the Coding Region of the Macrophage Colony Stimulating Factor Gene. *Nature* **345**, 442-444, doi:Doi 10.1038/345442a0 (1990).
- 15 Pettit, A. R. *et al.* TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *The American journal of pathology* **159**, 1689-1699, doi:10.1016/S0002-9440(10)63016-7 (2001).

- 16 Arai, F. *et al.* Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *The Journal of experimental medicine* **190**, 1741-1754 (1999).
- 17 Asagiri, M. & Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* **40**, 251-264, doi:10.1016/j.bone.2006.09.023 (2007).
- 18 Yagi, M. *et al.* DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 345-351, doi:10.1084/jem.20050615 (2005).
- 19 Fujita, K. *et al.* Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion. *Nature medicine* **18**, 589-594, doi:10.1038/nm.2659 (2012).
- 20 Fuller, K. *et al.* Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *The Journal of experimental medicine* **178**, 1733-1744 (1993).
- 21 Hoshi, K., Komori, T. & Ozawa, H. Morphological characterization of skeletal cells in Cbfa1-deficient mice. *Bone* **25**, 639-651 (1999).
- 22 Hayman, A. R. & Cox, T. M. Tartrate-resistant acid phosphatase knockout mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **18**, 1905-1907, doi:10.1359/jbmr.2003.18.10.1905 (2003).
- 23 Rice, D. P., Kim, H. J. & Thesleff, I. Detection of gelatinase B expression reveals osteoclastic bone resorption as a feature of early calvarial bone development. *Bone* **21**, 479-486 (1997).
- 24 工藤明、武田洋幸. ヒト疾患モデルとしてのゼブラフィッシュ&メダカ. Vol. 23 (秀潤社, 2004).
- 25 Gavaia, P. J. *et al.* Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*): comparative gene and protein expression during larval development through adulthood. *Gene expression patterns : GEP* **6**, 637-652, doi:10.1016/j.modgep.2005.11.010 (2006).
- 26 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 Dynam* **236**, 3031-3046, doi:10.1002/dvdy.21329 (2007).
- 27 Renn, J., Buttner, A., To, T. T., Chan, S. J. H. & Winkler, C. A col10a1:nlGFP transgenic line displays putative osteoblast precursors at the medaka notochordal sheath prior to mineralization. *Developmental biology* **381**, 134-143, doi:10.1016/j.ydbio.2013.05.030 (2013).
- 28 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* **137**,

- 1807-1813, doi:10.1242/dev.051540 (2010).
- 29 Iida, Y., Hibiya, K., Inohaya, K. & Kudo, A. Eda/Edar signaling guides fin ray formation with preceding osteoblast differentiation, as revealed by analyses of the medaka all-fin less mutant afl. *Dev Dynam* **243**, 765-777, doi:10.1002/dvdy.24120 (2014).
 - 30 Chatani, M., Takano, Y. & Kudo, A. Osteoclasts in bone modeling, as revealed by in vivo imaging, are essential for organogenesis in fish. *Developmental biology* **360**, 96-109, doi:10.1016/j.ydbio.2011.09.013 (2011).
 - 31 To, T. T. *et al.* Rankl-induced osteoclastogenesis leads to loss of mineralization in a medaka osteoporosis model. *Development* **139**, 141-150, doi:10.1242/dev.071035 (2012).
 - 32 Nemoto, Y., Higuchi, K., Baba, O., Kudo, A. & Takano, Y. Multinucleate osteoclasts in medaka as evidence of active bone remodeling. *Bone* **40**, 399-408, doi:10.1016/j.bone.2006.08.019 (2007).
 - 33 Abduweli, D. *et al.* Tooth replacement and putative odontogenic stem cell niches in pharyngeal dentition of medaka (*Oryzias latipes*). *Microscopy (Oxf)* **63**, 141-153, doi:10.1093/jmicro/dft085 (2014).
 - 34 本田雅規. 歯の再生 歯の発生生物学から歯の再生研究まで. (真興交易(株)医書出版部, 2006).
 - 35 後藤仁敏、大泰司紀之ら. 歯の比較解剖学. (医歯薬出版株式会社, 1986).
 - 36 松浦啓一. 魚の形を考える. (東海大学出版, 2005).
 - 37 Reif, W.-E. Evolution of dermal sketeton in vertebrates: the odontode-regulation theory *Evol. Biol* **15**, 287-368 (1982).
 - 38 Katogi, R. *et al.* Large-scale analysis of the genes involved in fin regeneration and blastema formation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Mechanisms of development* **121**, 861-872, doi:10.1016/j.mod.2004.03.015 (2004).
 - 39 Seeman, E. Bone modeling and remodeling. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **19**, 219-233 (2009).
 - 40 Matsuo, K. & Otaki, N. Bone cell interactions through Eph/ephrin Bone modeling, remodeling and associated diseases. *Cell Adhes Migr* **6**, 148-156, doi:10.4161/cam.20888 (2012).
 - 41 Kozhemyakina, E., Lassar, A. B. & Zelzer, E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development* **142**, 817-831, doi:10.1242/dev.105536 (2015).
 - 42 Nakamura, S., Saito, D. & Tanaka, M. Generation of transgenic medaka using modified bacterial artificial chromosome. *Dev Growth Differ* **50**, 415-419, doi:10.1111/j.1440-169x.2008.01027.x (2008).
 - 43 Ansai, S. *et al.* Design, evaluation, and screening methods for efficient targeted

- mutagenesis with transcription activator-like effector nucleases in medaka. *Dev Growth Differ* **56**, 98-107, doi:10.1111/dgd.12104 (2014).
- 44 Ansai, S. *et al.* Efficient Targeted Mutagenesis in Medaka Using Custom-Designed Transcription Activator-Like Effector Nucleases. *Genetics* **193**, 739-+, doi:10.1534/genetics.112.147645 (2013).
 - 45 Cermak, T. *et al.* Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research* **39**, e82, doi:10.1093/nar/gkr218 (2011).
 - 46 Dahlem, T. J. *et al.* Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS genetics* **8**, e1002861, doi:10.1371/journal.pgen.1002861 (2012).
 - 47 Willems, B. *et al.* Conditional ablation of osteoblasts in medaka. *Developmental biology* **364**, 128-137, doi:10.1016/j.ydbio.2012.01.023 (2012).
 - 48 Chen, S. *et al.* Runx2, osx, and dspp in tooth development. *Journal of dental research* **88**, 904-909, doi:10.1177/0022034509342873 (2009).

謝辞

本研究を進めるに当たり、指導教官として数多くのご指導、ご鞭撻をいただきました工藤明教授に心から感謝いたします。

本研究に関して様々なお助言をいただいた川上厚志准教授に感謝いたします。

本研究に対するご助言、様々な実験技術の丁寧なご指導及びメダカ破骨細胞研究の基盤を作り上げられた茶谷昌宏助教に心から感謝申し上げます。本研究のみならず、宇宙実験においても大変お世話になりました。重ねて御礼申し上げます。

メダカ骨研究の基盤を作り上げられ、Tg ラインの供与や研究に対するご助言等、本研究の発展に様々にご協力くださった猪早敬二助教に感謝いたします。

6年間の研究室生活で苦楽を共にし、支えてくださった同期の安藤和則君に心から感謝いたします。作製した Tg ラインや変異体を快く供与してくださった青野一志くんに感謝いたします。破骨細胞に関する実験系の確立にご協力くださった北島未紀さんに感謝いたします。実験や研究に関する相談にいつも豊富な知見と斬新な着眼点で答えてくださった泰松清人博士に感謝いたします。

博士課程の間、研究以外の生活面を支え、また本研究に対する新たな着想を得る機会を存分に与えてくださった、情報生命教育院に関わる全ての方々に感謝いたします。

長い研究室生活にわたって、様々な方面で支えてくださった、工藤・川上研究室の諸先輩方、後輩諸君に感謝いたします。

最後に、博士課程に進学することを快く受け入れてくださり、私の研究生活を経済面だけでなく、精神的にも支えてくださった両親と弟に深く感謝いたします。

萬徳晃子