

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

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：生命情報 専攻
Department of
学生氏名：萬徳晃子
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 教授
Academic Advisor(main)
指導教員(副)：川上厚志 准教授
Academic Advisor(sub)

要旨(和文 2000 字程度)
Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

【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、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つが、その詳しいメカニズムは不明である。従来研究に用いられてきた哺乳類の骨組織は、複雑であるために解析が難しく、骨モデリングの細胞学的な機構の解析のためにはよりシンプルな解析系が必要とされてきた。

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。メダカは体が透明であり、トランスジェニック (Tg) ラインを用いることで骨モデリングに関わる細胞の動態を *in vivo* において観察することができる。

メダカの破骨細胞は、歯足骨と呼ばれる、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】メダカの咽頭歯には歯足骨と咽頭歯から成る成熟歯と、未熟な咽頭歯を持つ歯胚が存在していた。それぞれの発生ステージを細かく分類するために水平切片を作製したところ、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** 側に配置されていた。

骨二重標識法によって歯足骨の代謝を観察した。結果、歯足骨は常に成熟歯列の **posterior** 側で形成され、**anterior** 側で吸収されていた。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。また、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ことがわかった。

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 ラインを用いて組織解析を行った。その結果、骨芽細胞は列の形成面に特に集中して局在し、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 より前には出現せず、成熟歯のステージが進むごとに数が

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 GFP を発現する Tg ラインを作製し、*TRAP*-DsRed とのダブル Tg ラインを作製した。組織解析の結果、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破骨細胞に分化することが分かった。*c-fms-a*-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破骨細胞前駆細胞が接触している様子が確認された。

また骨芽細胞と破骨細胞の骨モデリングにおける機能を調べるためにそれぞれの細胞の機能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を作製した。結果、変異体において破骨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幅が増加していた。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。

また *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。破骨細胞の減少はアポトーシスによって起こっていた。

【考察と結論】歯足骨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、生涯にわたって骨モデリングを起こす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、その機能は骨芽細胞によって調節を受けているということが明らかになった。

正常な骨モデリングを行うには適切な位置で骨吸収を行うことが重要である。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 で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。このことから、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いうことが示唆された。また、骨芽細胞の除去により破骨細胞がアポトーシスを起こしたことから、骨芽細胞は破骨細胞に対して生存因子を産生し、その生存を調節することで骨吸収能の調節を行っていることが示唆された。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生存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。

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 1 copy 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：	萬徳晃子	
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	教授
Academic Advisor(main)		
指導教員(副)：	川上厚志	准教授
Academic Advisor(sub)		

要旨(英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Bone modeling is the process that shapes skeletal elements for appropriate bone morphology and mass, and it is coordinated by osteoblasts and osteoclasts. However, the interaction between osteoblasts and osteoclasts in mammalian bone modeling is yet to be defined, because it is difficult to estimate the behavior of these cells *in vivo*. Here, we showed the important role of osteoblasts for controlling osteoclasts in bone modeling during tooth replacement in medaka pharyngeal teeth, coupled with an *TRAP-GFP/osterix-DsRed* transgenic line to visualize osteoblasts and osteoclasts. In the turnover of the row of attachment bones which support pharyngeal teeth, these bones were resorbed at the posterior side where most developed functional teeth were located, and generated at the anterior side where teeth were newly erupted, which caused continuous tooth replacement. In the cellular analysis, osteoclasts and osteoblasts were located at attachment bones separately, since mature osteoclasts were localized at the resorbing side and osteoblasts gathered at the generating side. These properties in turnover of attachment bones correspond to bone modeling. To demonstrate the role of osteoclasts in tooth replacement, we established medaka made deficient in *c-fms-a* by TALEN. *c-fms-a* deficient medaka showed hyperplasia of attachment bones along with reduced bone resorption accompanied by a low number of TRAP-positive osteoclasts, indicating an important role of osteoclasts in bone modeling of attachment bones. Furthermore, nitroreductase-mediated osteoblast-specific ablation induced apoptosis of osteoclasts, indicating that osteoblasts were essential for survival of osteoclasts for the proper turnover. Taken together, our results suggested that the medaka attachment bone provides the model to understand the cellular mechanism for bone modeling, and that osteoblasts act in the coordination of bone morphology by supporting 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 1 copy 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).