

ミルク由来ペプチドによる
骨・軟骨成長への影響に関する研究

令和5年度

三重大学大学院地域イノベーション学研究科
博士前期課程地域イノベーション学専攻
山田将大

目次

第1章 本研究の背景と目的

1-1 本研究の社会的背景	6
1-2 骨形成のメカニズムについて	7
1-3 ミルク由来ペプチドについて	7
1-4 骨研究モデルとしてのゼブラフィッシュについて	7
1-5 本研究の目的	8

第2章 実験方法

2-1 ミルク由来ペプチドのゼブラフィッシュへの投与試験	
2-1-1 ゼブラフィッシュの飼育及び採卵	10
2-1-2 ミルク由来ペプチド投与試験	10
2-2 アルシアンブルー・アリザリンレッドによる二重染色	
2-2-1 二重染色試薬の調製	10
2-2-2 組織の固定	11
2-2-3 染色	11
2-2-4 漂白	11
2-2-5 クリアリング	11
2-2-6 顕微鏡での撮影及び骨・軟骨画像解析	11
2-3 RNA 抽出, 逆転写酵素, 定量的リアルタイムによる骨芽細胞・軟骨細胞マーカー を中心とした遺伝子発現解析	
2-3-1 Total RNA 抽出, cDNA 合成	12
2-3-2 リアルタイム PCR	12

第3章 結果と考察

3-1 ミルク由来ペプチド投与 21 日目におけるゼブラフィッシュのアルシアンブルー・アリザリンレッドによる骨・軟骨二重染色の結果	15
3-2 ミルク由来ペプチド投与 21 日目におけるゼブラフィッシュの標準体長	18
3-3 リアルタイム PCR によるミルク由来ペプチド投与 14, 21 日目におけるゼブラフィッシュの骨芽細胞・軟骨細胞マーカーを中心とした遺伝子発現解析	20
3-4 その他の実験過程における結果	25
3-5 今後の予定	26

第4章 総括	28
--------	----

参考文献	29
------	----

謝辞	30
----	----

Research on the effects of milk-derived peptides on bone and cartilage growth

Masahiro Yamada

March 2024

1. Introduction

The “bones” serve as a foundation for a child's hundred-year life, and it is crucial to nurture bone health during early childhood to prevent future issues such as fractures, osteoporosis, lower back pain, and bunions. Additionally, fostering bone development, which forms the basis for dental health, contributes to achieving well-aligned teeth. However, there is a current trend of declining bone density in children, leading to increased rates of bone fractures, insufficient permanent teeth, and enamel hypoplasia. Therefore, we focused on the growth period, which is the foundation of body building and the key to supporting healthy body building, and conducted research on the effects of supplementation with “milk-derived peptides”, which are a new peptide material derived from milk protein, on bones during the growth period. We believed that if we could demonstrate that “milk-derived peptides” have the ability to promote ossification during growth and promote the growth of individuals, it could be useful for the bone health of people all over the world, especially children.

2. Experimental

There is a research report that examined the effects on bones of zebrafish by administering *Lactobacillus rhamnosus*, a component of the human gut microflora [1]. Using this research report as a reference, we administered “Milk-Derived Peptides” to zebrafish larvae, a model for the growth period and the effects on bone formation and growth were examined through double staining with Alcian Blue and Alizarin Red [2] as well as expression analysis of relevant genes.

100 juvenile zebrafish on the second day after fertilization were transferred to a case containing 250 mL of breeding water, and administration of milk-derived peptides at concentrations of 0 (Control), 0.3, 1, 3, 10, and 33 $\mu\text{g/mL}$ were started, and the continuous experiment was conducted for a period of 21 days. After 21 days of administration, double staining with Alcian blue and alizarin red [2] was conducted, and standard-length measurements were taken. Analysis of Alizarin Red staining intensity was performed using ImageJ based on the obtained bone staining images (in red). Additionally, the expression levels of marker genes for osteoblasts and chondrocytes in zebrafish were analyzed using real-time PCR at 14 and 21 days after the start of administration.

3. Results and Discussion

From the results of double staining with Alcian Blue and Alizarin Red and the amount of alizarin red staining using ImageJ from the obtained bone staining image (red), compared to the control, zebrafish administered with milk-derived peptides had better bone formation. It was observed that the formation was promoted. Furthermore, the results of body length measurements (standard-length) showed that zebrafish treated with milk-derived peptides tended to grow taller than controls. In addition, the best values were obtained in zebrafish treated with milk-derived peptides at 3 $\mu\text{g/mL}$, so it is deemed necessary to investigate whether 3 $\mu\text{g/mL}$ is the optimal concentration for promoting bone formation and growth in future studies.

The results of gene expression analysis focusing on osteoblast and chondrocyte markers showed a slight increase in the gene expression of osteoblasts and chondrocytes in zebrafish administered with milk-derived peptides compared to the control. However, since almost no significant results were obtained, we thought it necessary to repeat the experiment.

4. Conclusions

From the findings of this study, it has been identified that supplementation with milk-derived peptides has the potential to promote bone formation and growth. In the future, we will study the dose response of milk-derived peptides, re-experiment gene expression analysis focusing on osteoblast and chondrocyte markers, and study the differentiation effects on osteoblasts through the administration of milk-derived peptides using MC3T3-E1 cells.

Acknowledgment

I would like to express my sincere gratitude to Professor Norihiro Nishimura, and everyone in Nishimura Laboratory at Graduate School of Regional Innovation Studies, Mie University, who contributed to this study.

References

- [1] Francesca Maradonna, Giorgia Gioacchini, Silvia Falcinelli, et al., Probiotic Supplementation Promotes Calcification in *Danio rerio* Larvae: A Molecular Study. PLOS ONE, 2013, 8, e83155.
- [2] Walker M.B., Kimmel C.B., A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. Biotech Histochem, 82, 23–28.

第 1 章

本研究の背景と目的

1. 本研究の背景と目的

1-1. 本研究の社会的背景

「骨」は子どもの100年の人生を支えていくものであり、将来の骨折、骨粗鬆症、腰痛、外反母趾などに悩まされないために、そして歯の土台となる骨を育てて歯並びをよくするために、幼児期の「骨育」が重要である。しかし現在子どもの骨密度が低下傾向にあり、独立行政法人日本スポーツ振興センターの「学校の管理下の災害－基本統計－」によると、図1のように、子どもの骨折発生件数は20年前に比べると約1.4倍に増えていることがわかった[1]。さらには、日本小児歯科学会「永久歯先天欠如の発生頻度に関する調査研究」によると、近年、永久歯の数が足りなかったり、歯が黄ばんで欠けたりするエナメル質形成不全になっている子どもが10人に1人いる、という調査報告もあった[2]。

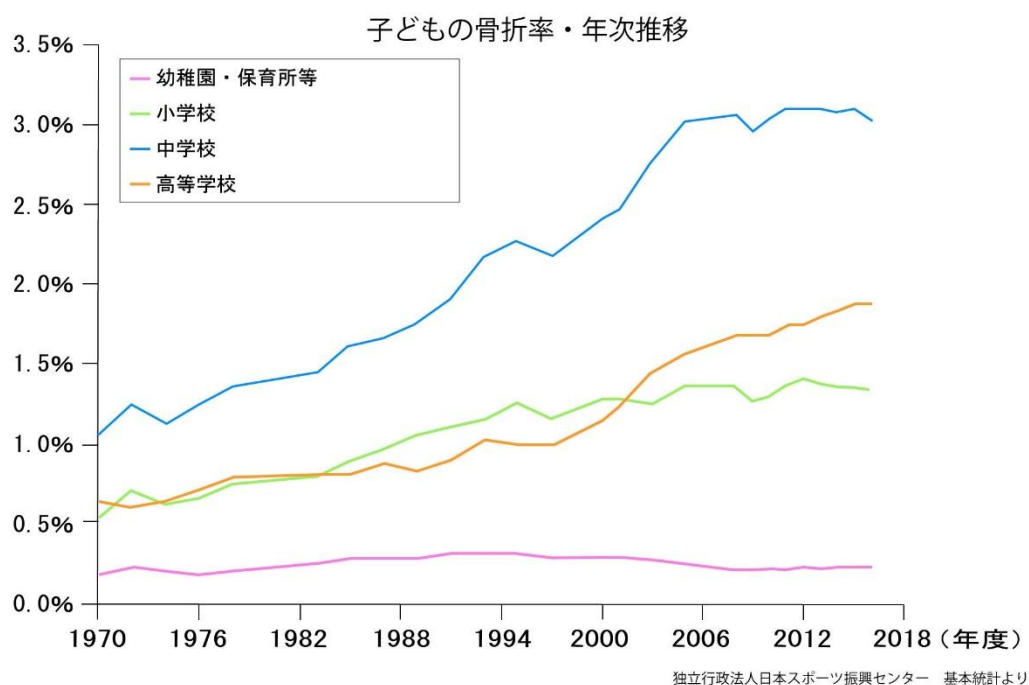


図1 子どもの骨折率・年次推移[1]

1-2. 骨形成のメカニズムについて

骨形成のメカニズムは、大きく「軟骨内骨化」と「膜内骨化」に分類される。「膜内骨化」は頭蓋骨のような扁平骨の形成や長管骨が太さを増す機序に関与する。しかしながら、多くの骨は軟骨が形成され、その軟骨が骨へと置換されるというプロセスを経る「軟骨内骨化」により形成され、特に骨伸長に関してはこの機序が重要となる。主に軟骨層を維持して増殖していく軟骨細胞の供給源となる「静止軟骨細胞層」、骨を伸ばす土台となる軟骨細胞を増加させる「増殖軟骨細胞層」、肥大化しアポトーシス(管理・調節された細胞の自殺)を呈していく「肥大軟骨細胞層」と層別化された細胞群へと変化することで、いわゆる「成長軟骨」を形成し、骨伸長がなされることとなる[3]。

また、骨は成長が終わった後も常にリモデリング(古い骨組織が吸収されて新しい骨組織が形成される現象)が行われ、この役割を担っているのが破骨細胞と骨芽細胞である。骨のリモデリングは、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の繰り返しによって行われ、骨芽細胞の減少等によって両者の働きにアンバランスが生じると、骨粗鬆症のような骨代謝疾患を招く原因となる[4]。

1-3. ミルク由来ペプチドについて

ミルク由来ペプチドは2009年に牛乳のたんぱく質から新規ペプチド素材として開発された原料であり、牛乳由来であるため水に溶けやすく、免疫力の指標となる「IL-12」の産生を高める作用を持ち、免疫力活性化作用を持つ乳酸菌・プロポリスなど他の素材よりも強く、免疫賦活能および抗アレルギー作用があることが明らかになっている。ミルク由来ペプチドには、数多くのペプチド(アミノ酸が2~50個程度つながったもの)が含まれており、ペプチドは生体を調節する作用を有することから、健康維持に対して非常に多くのポテンシャルがあると考えられている[5]。しかし、骨形成・骨成長への効果についてはまだ報告されていない。

1-4. 骨研究モデルとしてのゼブラフィッシュについて

ゼブラフィッシュは脊椎動物であり、ヒトと同様に骨芽細胞・破骨細胞が存在し、骨・軟骨の発生・成長・疾患のモデル動物として、マウス・ラットに続く第3のヒト疾患モデル動物として近年注目されている。ゼブラフィッシュとヒトゲノムとの多くの構造的および機能的遺伝子類似性があり、ゼブラフィッシュではヒト遺伝子の71.4%が骨関連遺伝子を含む少なくとも1つのオルソログを持っていることが明らかになっている[6]。ま

た、ゼブラフィッシュの骨の形成と再構築に関与する細胞は、多くの点で哺乳類の細胞と類似しており、骨芽細胞や単核破骨細胞と多核破骨細胞の両方が含まれている[7]。前述の IL-12 を初め、様々な免疫細胞・サイトカインもヒトと共通しており、本研究テーマに適したモデル動物だと考えた。

骨疾患・骨成長のモデルとしては、鱗に存在する破骨細胞を用いた骨粗鬆症治療薬探索[8]や乳酸菌による骨芽細胞活性化作用[9]など数々の報告がある。これらのうち後者の乳酸菌による骨芽細胞活性化作用[9]では、ヒトの腸内細菌叢の1種である「ラクトバチルス・ラムノサス」をゼブラフィッシュに投与することによる骨の影響を検証する研究となっている。この研究では、アルシアンブルー・アリザリンレッドの二重染色により、「ラクトバチルス・ラムノサス」の投与がゼブラフィッシュ稚魚の骨格形成を促進することが実証され、リアルタイム PCR により、骨代謝に関与する一連の重要な遺伝子の発現の変化が報告された。

1-5. 本研究の目的

本研究は、体づくりの土台となり、健康な体づくりを支えるカギとなる成長期に着目し、「ミルク由来ペプチド」の補給による成長期の骨に対する影響について研究をした。具体的に、成長期のゼブラフィッシュ稚魚に「ミルク由来ペプチド」を与えることで、アルシアンブルー・アリザリンレッドの二重染色や関連遺伝子の発現解析により、骨形成・骨成長への効果について検証を行った。

第 2 章

実験方法

2. 実験方法

2-1. ミルク由来ペプチドのゼブラフィッシュへの投与試験

2-1-1. ゼブラフィッシュの飼育及び採卵

ゼブラフィッシュ(野生型 AB 系統 ; Zebrafish International Research Center)は, 国際的なガイドラインに準拠した標準的な操作ガイドラインに従って, 当研究室で飼育および維持された。また, 発育段階と体長に基づいて Gemma Micro 75-300 (SKRETTING 社)で給餌した。メスとオスのペアは個別に産卵させて, 稚魚は水槽内で 28°C, 14 時間の明期と 10 時間の暗期サイクルでの条件下で飼育され, 約 6 か月齢まで成長し, 繁殖用として使用された。水槽を 5~10 個用意し, 1 個の水槽につきメスを 2 匹及びオスを 3 匹入れて受精させて, 翌朝受精卵を収集し, 飼育水 (0.3 ×Danieau's solution; [17.4 mM NaCl(関東化学社), 0.21 mM KCl(和光純薬工業社), 0.12 mM MgSO₄(ナカライテスク社), 0.18 mM Ca(NO₃)₂(ナカライテスク社), 1.5 mM HEPES pH 7.2(ナカライテスク社)]) に入れ 28°C環境下で飼育開始した。

2-1-2. ミルク由来ペプチド投与試験

受精後 2 日目の稚魚 100 個体を 250 mL の飼育水を入れたケースに移し, それぞれ 0(Control), 0.3, 1, 3, 10, 33 μg/mL のミルク由来ペプチドを曝露投与開始し, 飼育水は毎日半分量(125 mL)を交換し, 21 日間継続試験を行った。なお投与開始後 4 日目よりヒルガタワムシ(キョーリン社)による給餌を開始し(Mary Ann Liebert. 2018;15: 291-294), 6 日目より Gemma Micro 75 (SKRETTING 社)を給餌した。

2-2. アルシアンブルー・アリザリンレッドによる二重染色

2-2-1. 二重染色試薬の調製

骨・軟骨二重染色は, Walker と Kimmel による方法[10]に従って行った。二重染色溶液は, 軟骨染色用のアルシアンブルー8GX (C. I. 742410) (コスモ・バイオ社)を Part A, 骨染色用のアリザリンレッド S (ABRAMN)を Part B とし, これら 2 つの Part を染色直前に混合したものである。Part A は, まず 70%エタノール(関東化学社)中の 0.4%アルシアンブルーのストックを作成した。この Part A を 70%エタノールで 20 倍希釈して 0.02%アルシ

アンブルーとし、100mM MgCl₂(関東化学社)を溶解し、最後に 0.01 倍量の Part B を加えた。

2-2-2. 組織の固定

受精後 23 日目(dpf; day post fertilization)のゼブラフィッシュ稚魚を 4% PFA(ファルマ社)で固定した。室温で 2 時間卓上小型振盪機(TAITEC 社)で振盪した後、固定液を除去し、ゼブラフィッシュ稚魚を 50%エタノール 1 mL で洗浄し、さらに室温で 10 分間卓上小型振盪機で振盪しながら 50%エタノール 1 mL で脱水した。

2-2-3. 染色

エタノールを除去した後、ゼブラフィッシュ稚魚に 2-2-1. で調製した二重染色溶液 1 mL を加え、室温で一晩ミニローテーター(AS ONE 社)で転倒攪拌した。

2-2-4. 漂白

色素は、3% H₂O₂(関東化学社)と 2% KOH(和光純薬工業社)を等量混合して作製した漂白溶液で除去された。1 mL の漂白溶液を加え、蓋を開けたままチューブを室温で 20 分間静置した。

2-2-5. クリアリング

20%グリセロール(関東化学社)と 0.25%KOH 溶液を連続的に交換して組織を透明にし、室温で一晩ミニローテーターで転倒攪拌した。溶液を 1 mL の 50%グリセロールと 0.25% KOH と交換し、室温で一晩ミニローテーターで転倒攪拌した。さらに溶液を 1 mL の 50%グリセロールと 0.1%KOH と交換し、4℃で保存した。

2-2-6. 顕微鏡での撮影及び骨・軟骨画像解析

ゼブラフィッシュ稚魚を倒立型顕微鏡 BZ-X710(株式会社キーエンス)で全身のカラー画像を取得し、観察及び体長測定を行った。また、ImageJ (Fiji distribution, NIH)の Colour Deconvolution 機能のうち“Alcian blue & H”を用いて Alizarin red(骨)の領域を抽出し、その領域における染色量(骨量)を定量した(図 2)。

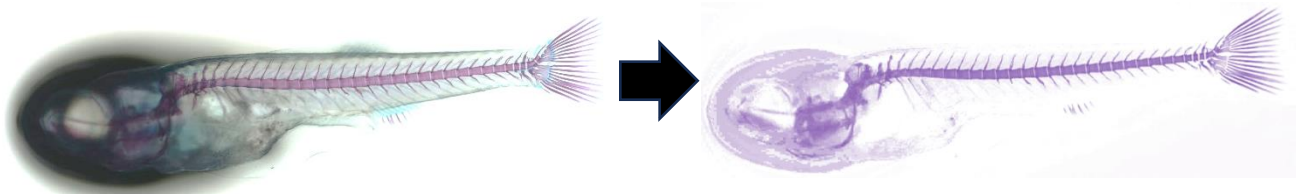


図2 ImageJによる Alizarin red(骨)の領域の抽出例

2-3. Total RNA 抽出, cDNA 合成, 定量的リアルタイムによる骨芽細胞・軟骨細胞マーカーを中心とした遺伝子発現解析

2-3-1. Total RNA 抽出, cDNA 合成

1 サンプルあたり 10~20 匹のゼブラフィッシュ稚魚をオーリング付きエンブティチューブ(エムエス機器社)に入れた。そこに Buffer RLT(QIAGEN 社)及びその 0.01 倍量の 2-メルカプトエタノール(SIGMA 社)の混合溶液 600 μ L を加えてジルコニアビーズ(TOMY 社)2 粒を入れ, ビーズ式ホモジナイザー(エムエス機器社)で 20 秒間ホモジナイズした後, テーブルトップ冷却遠心機で 6°C, 約 14000~15000 \times g の設定で 10 分間遠心分離した。得られた上澄み液から, RNeasy® Mini Kit (QIAGEN 社)をメーカーの説明書に従って使用して total RNA 抽出し, 50 μ L の RNase-free water で溶出した。最終的な RNA 濃度はバイオスペクトロメーター(Eppendorf 社)を使用して測定した。RNA は使用するまで-80°Cで保存された。

cDNA 合成には合計 0.2 μ g の Total RNA を使用し, gDNA Remover(東洋紡社)含有の 4 \times DN Master Mix(東洋紡社)を加えて Veriti™ サーマルサイクラー (Applied Biosystems 社) 上で 37°C で 5 分間処理し, 次に Nuclease-free Water(東洋紡社)及び 5 \times RT Master Mix II(東洋紡社)を加えて Veriti™ サーマルサイクラー上で 37°C で 15 分間, 50°C で 5 分間, 98°C で 5 分間, 4°C のサイクルで処理して cDNA に逆転写した。

2-3-2. リアルタイム PCR

PCR は SYBR Green 法を用いて StepOnePlus™ リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 社) 上で行った。反応は, サンプルごとに, 希釈(1/11)された cDNA 1 μ L, SYBR Green を蛍光試薬として含む 2 倍濃縮された PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems 社) 5 μ L, UltraPure™ Distilled Water (invitrogen 社) 3 μ L, 10 μ M のフォワードプライマー 0.5 μ L および 10 μ M のリバースプライマー 0.5 μ L を混合

し、96 ウェルプレート (Applied Biosystems 社) に 1 ウェルあたり合計 10 μ L 加えて行った。全ての反応におけるサーマルプロファイルは、50°C で 2 分間、95°C で 2 分間、その後 95°C で 3 秒間、60°C で 30 秒間、および 95°C で 15 秒間を 50 サイクルで行い、最後は 95°C で 15 秒間、60°C で 1 分間、および 95°C で 15 秒間行った。使用したプライマーは表 1 に示す。遺伝子発現データは、検量線法によって解析され、StepOne™ ソフトウェアバージョン 2.3 (Applied Biosystems 社) を用いてハウスキーピング遺伝子 β -アクチン (*actb*) で正規化された。

表 1 定量的 RT-PCR で使用されたプライマーの一覧[9]

Target gene	Full name	Sequence	Function
<i>runx2</i>	runt-related transcription factor 2	Forward 5'-CTCCTCAGACCGGAGCGCGT-3' Reverse 5'-GGCTGAAGGCTGCTGGACGG-3'	初期の骨芽細胞分化促進因子
<i>sp7</i>	Sp7 transcription factor	Forward 5'-AACCCAGCCCGTCCCGACA-3' Reverse 5'-CCGTACACCTTCCCGCAGCC-3'	初期の骨芽細胞分化促進因子
<i>bglqp</i>	bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein	Forward 5'-GCCTGATGACTGTGTGTCTGAGCG-3' Reverse 5'-AGTTCAGCCCTCTTCTGTCTCAT-3'	類骨(※)のマーカー
<i>mgp</i>	matrix Gla protein	Forward 5'-AACACAACCCCTACATCTACCGAA-3' Reverse 5'-GCGGGCTGAAGAAGGTCTGATAGG-3'	軟骨のマーカー
<i>actb</i>	β -actin	Forward 5'-GGTACCCATCTCCTGCTCCAA-3' Reverse 5'-GAGCGTGGCTACTCCTTCAC-3'	ハウスキーピング遺伝子

※類骨…骨芽細胞が作る骨を構成する組織で、石灰化した部分と骨芽細胞の間に存在する未石灰化部分のこと。

第 3 章

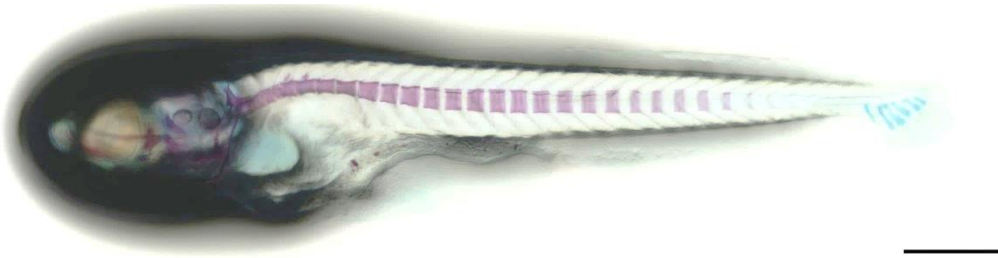
結果と考察

3. 結果と考察

3-1. ミルク由来ペプチド投与 21 日目におけるゼブラフィッシュのアルシアンブルー・アリザリンレッドによる骨・軟骨二重染色の結果

まずは顕微鏡で撮影したミルク由来ペプチド投与 21 日目におけるゼブラフィッシュの骨・軟骨二重染色後の画像を以下の図 3 に示す。

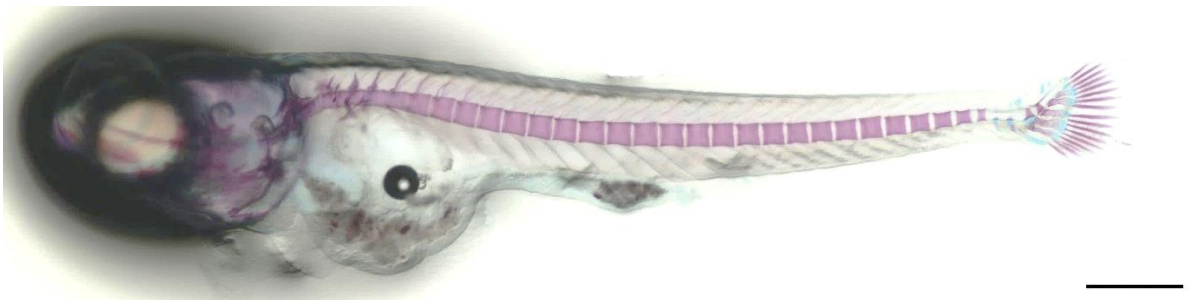
(a)



(b)



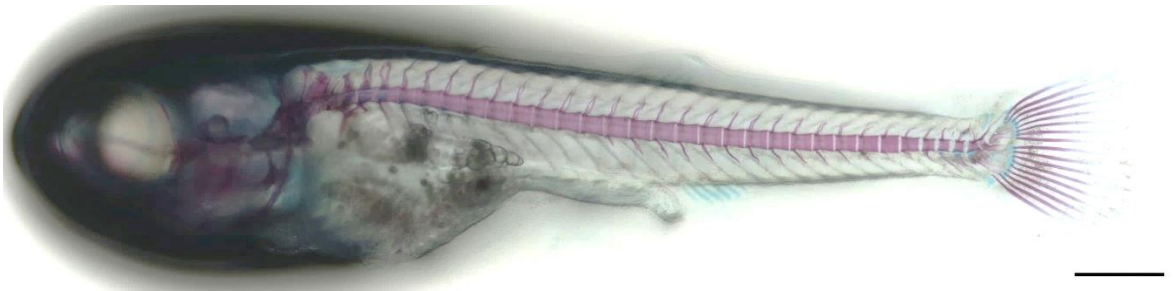
(c)



(d)



(e)



(f)

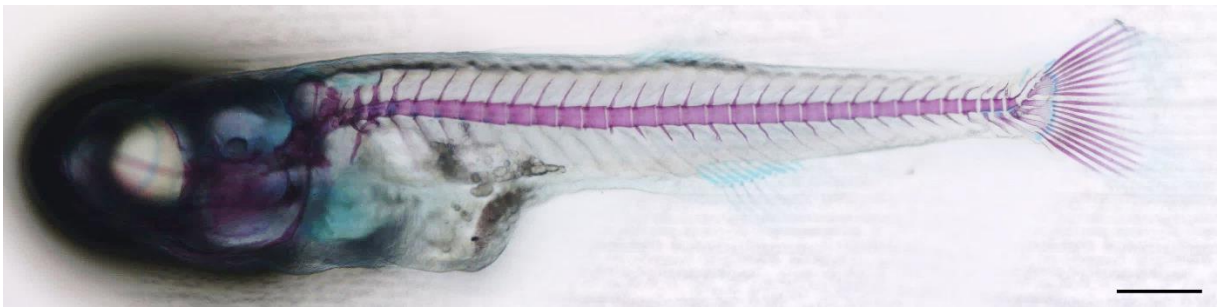


図3 (a)Control 及びミルク由来ペプチド(b)0.3, (c)1, (d)3, (e)10, (f)33 $\mu\text{g/mL}$ 投与したゼブラフィッシュ(投与後 21 日目)の骨・軟骨二重染色の画像

※スケールバー：500 μm

次に、図3のような骨・軟骨二重染色の画像から、ImageJの機能を用いて定量したミルク由来ペプチド投与21日目におけるゼブラフィッシュのアリザリンレッド染色量すなわち骨量(Area/Standard length)のグラフを以下の図4に示す。

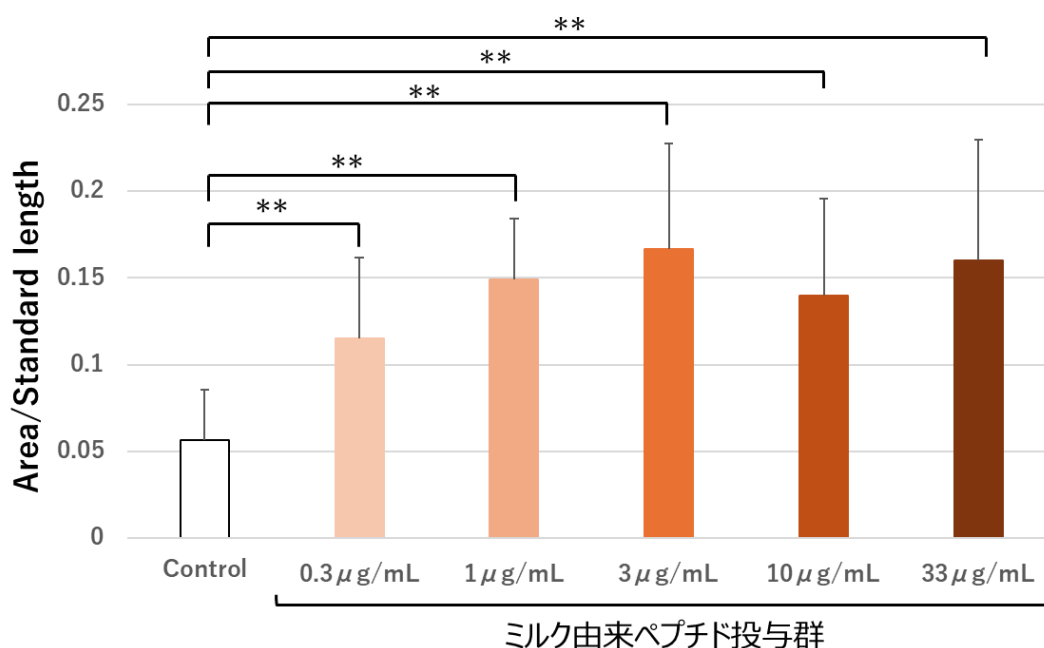


図4 ImageJによるミルク由来ペプチド投与21日目におけるゼブラフィッシュのアリザリンレッド染色量(Area/Standard length) ※n=10, **p<0.01

図3のミルク由来ペプチド投与21日目におけるゼブラフィッシュの骨・軟骨染色の画像から、Controlと比較し、ミルク由来ペプチドを投与したゼブラフィッシュの方が尾鰭の部分までしっかりと赤く染まっている様子が見られ、つまり骨形成が促進している様子が見られた。また、図4のImageJによるゼブラフィッシュのアリザリンレッド染色量のグラフからも、Controlと比較し、ミルク由来ペプチドを投与したゼブラフィッシュの方がアリザリンレッド染色量が多いことが数値による有意差のあるデータからも表されており、つまり骨形成が促進していることがわかった。仮設としては、濃度が大きければ大きいほど骨形成の促進がより大きくなり、グラフは右肩上がりになることを考えていたが、図4より3 $\mu\text{g/mL}$ から10 $\mu\text{g/mL}$ にかけてアリザリンレッド染色量が下がっており、3 $\mu\text{g/mL}$ が最良の濃度なのか、この濃度よりも大きいと毒性を示し始めるのか、この点は検討が必要だと考えた。

3-2. ミルク由来ペプチド投与 21 日目におけるゼブラフィッシュの標準体長

まず、今回測定したゼブラフィッシュの「標準体長」とは、以下の図5のようにゼブラフィッシュの吻端(上顎の前の部分)から尾鰭の付け根(最後端の椎骨)までの長さのことを指す。「全長」ではなく尾鰭の長さを含めない「標準体長」を測定した理由としては、尾鰭は損傷しやすく、「全長」では正確なゼブラフィッシュの大きさを測定するのが困難となるためである。

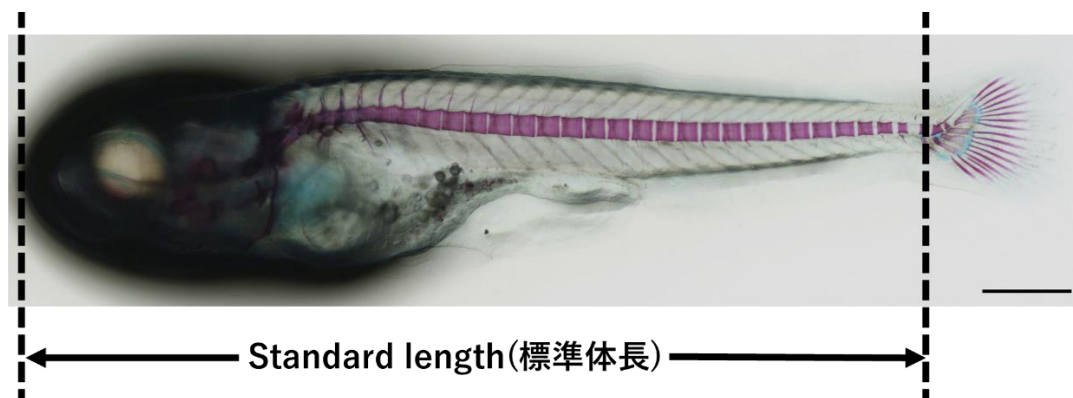


図5 ゼブラフィッシュの Standard length(標準体長) ※スケールバー : 500 μ m

次に、測定したミルク由来ペプチド投与 21 日目におけるゼブラフィッシュの標準体長の平均値のグラフを図6に示す。

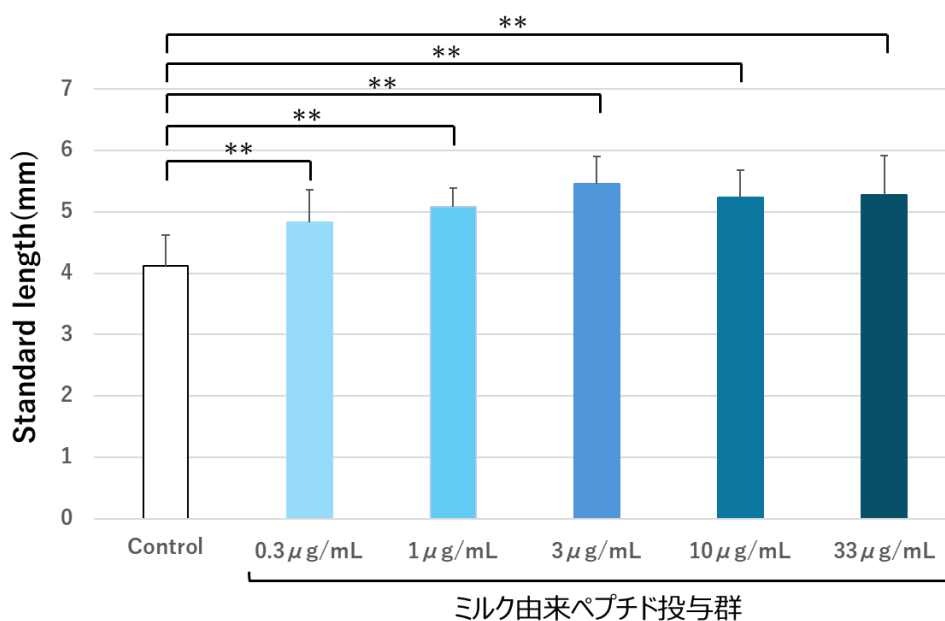


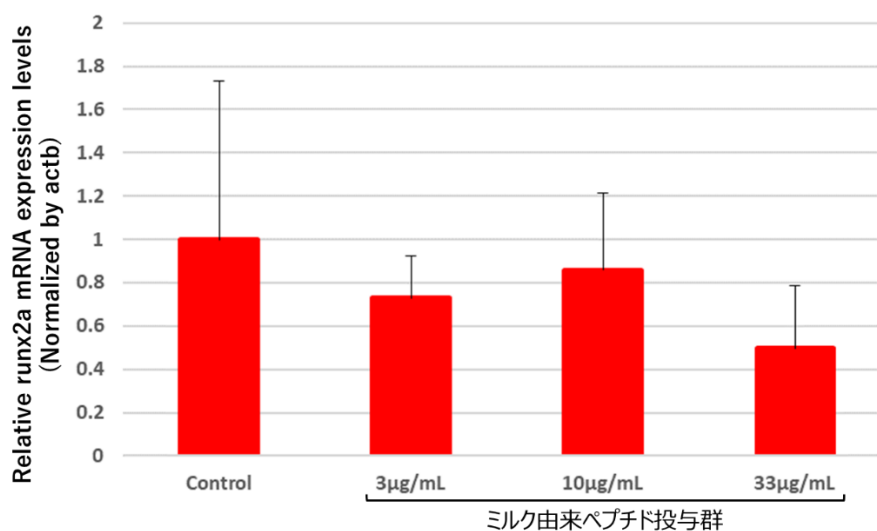
図6 ミルク由来ペプチド投与 21 日目におけるゼブラフィッシュの Standard length(標準体長) ※n=10, **p<0.01

ミルク由来ペプチド投与 21 日目におけるゼブラフィッシュの標準体長の平均値のグラフから、Control と比較し、ミルク由来ペプチド投与したゼブラフィッシュの方が体長が伸びている傾向を示す有意差のあるデータが得られたことがわかった。この結果から、3-1 での骨形成の促進に引き続き、ミルク由来ペプチド投与によって骨成長も促進することが考えられる。また、3-1 と同様に、濃度が大きければ大きいほど骨成長が促進して標準体長の値が大きくなり、グラフは右肩上がりになることを考えていたが、図 6 より $3\mu\text{g/mL}$ から $10\mu\text{g/mL}$ にかけて標準体長の平均値が下がっており、 $3\mu\text{g/mL}$ が最良の濃度なのか、この濃度よりも大きいと毒性を示し始めるのか、この点は検討が必要だと考えた。

3-3. リアルタイム PCR によるミルク由来ペプチド投与 14, 21 日目におけるゼブラフィッシュの骨芽細胞・軟骨細胞マーカーを中心とした遺伝子発現解析

ミルク由来ペプチド投与後 2 週間目 (16dpf), 3 週間目 (23dpf) のゼブラフィッシュのリアルタイム PCR による各細胞マーカーの遺伝子発現結果 (Control を 1 とした) を以下の図 7~10 に示す。

(a)



(b)

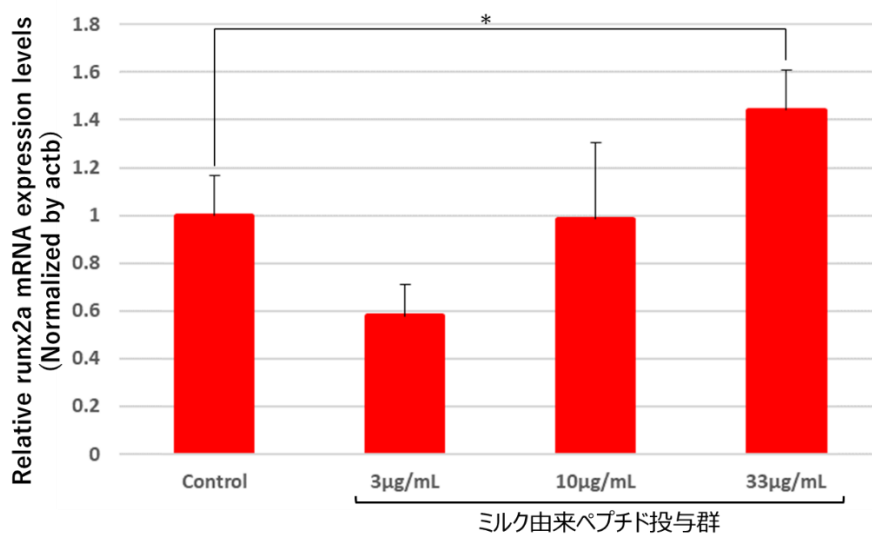
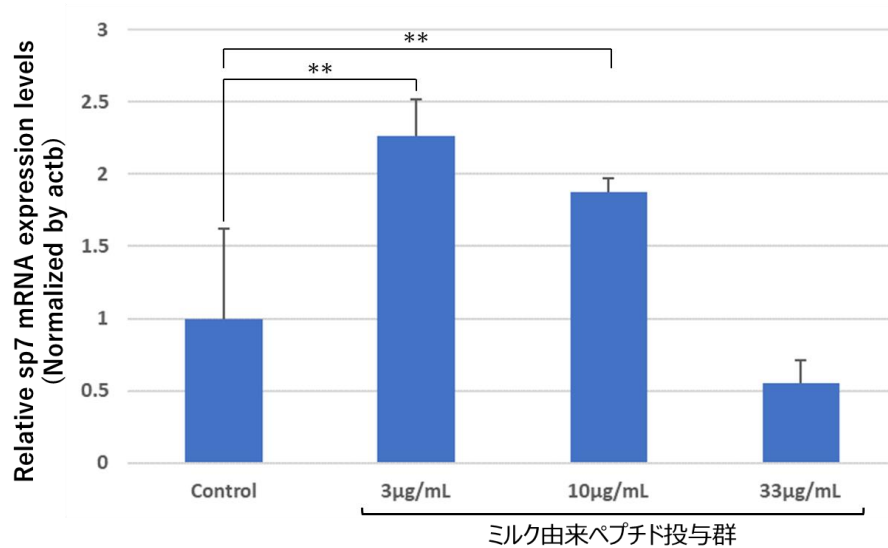


図 7 (a)16dpf, (b)23dpf のゼブラフィッシュの runx2a の mRNA 発現レベル ※* $p < 0.05$

(a)



(b)

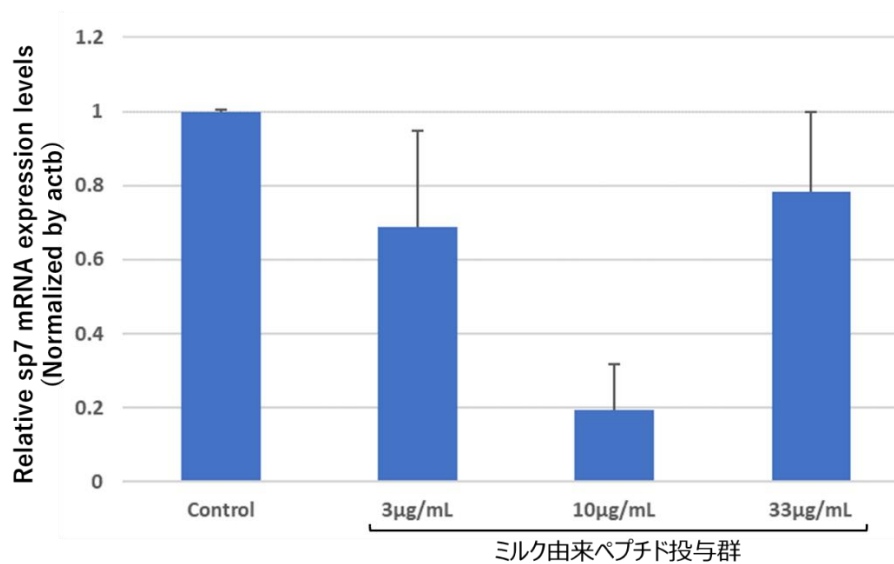
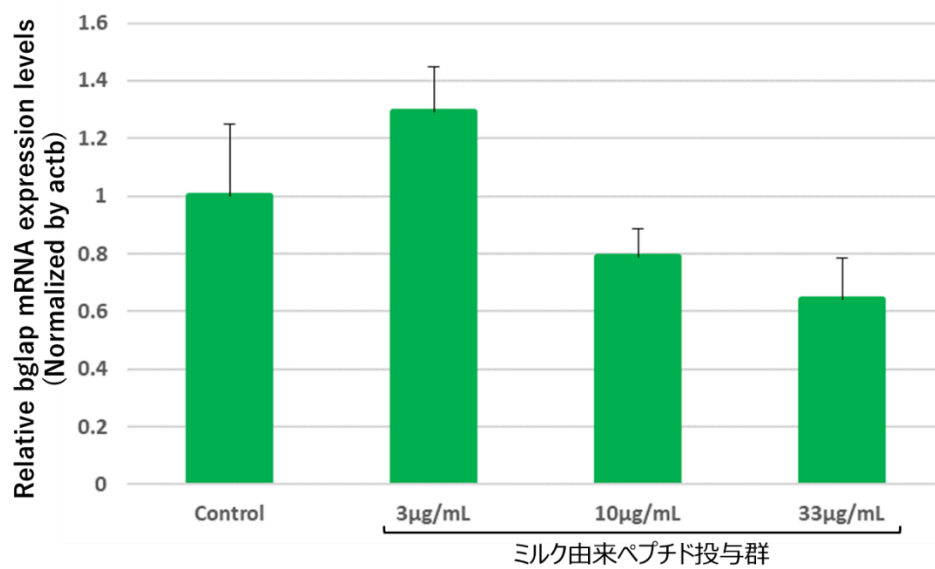


図 8 (a) 16dpf, (b) 23dpf のゼブラフィッシュの sp7 の mRNA 発現レベル

**p<0.01

(a)



(b)

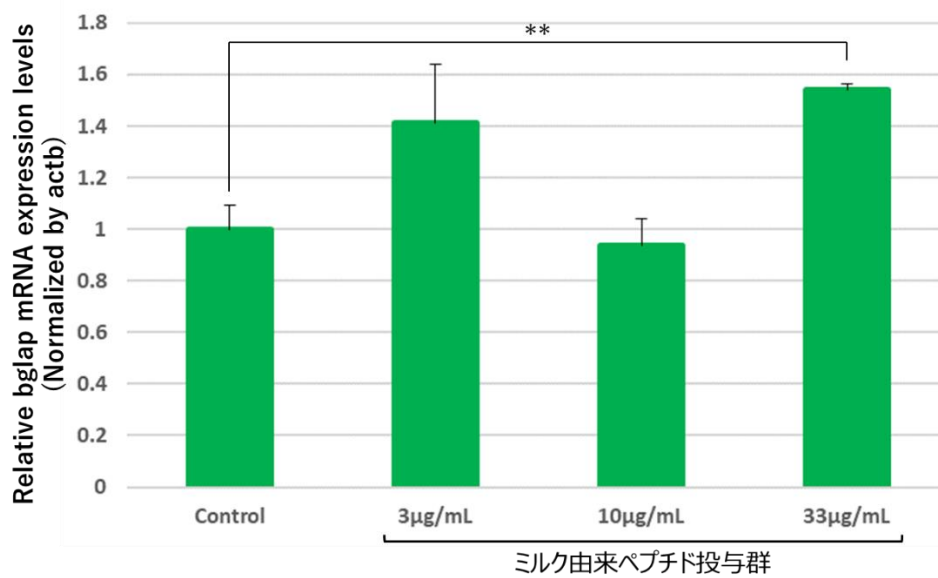
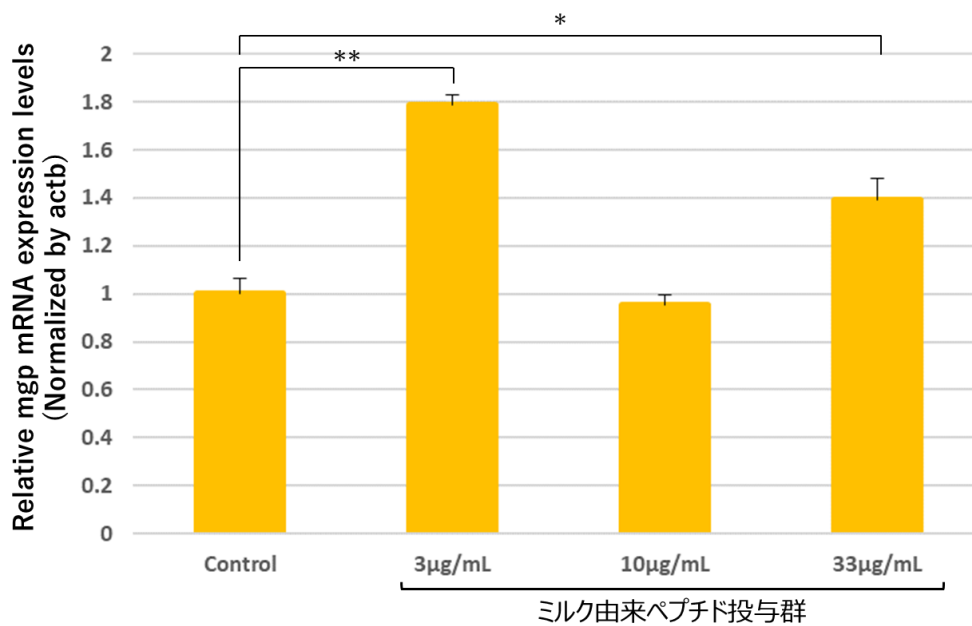


図9 (a) 16dpf, (b) 23dpf のゼブラフィッシュの bglap の mRNA 発現レベル

**p<0.01

(a)



(b)

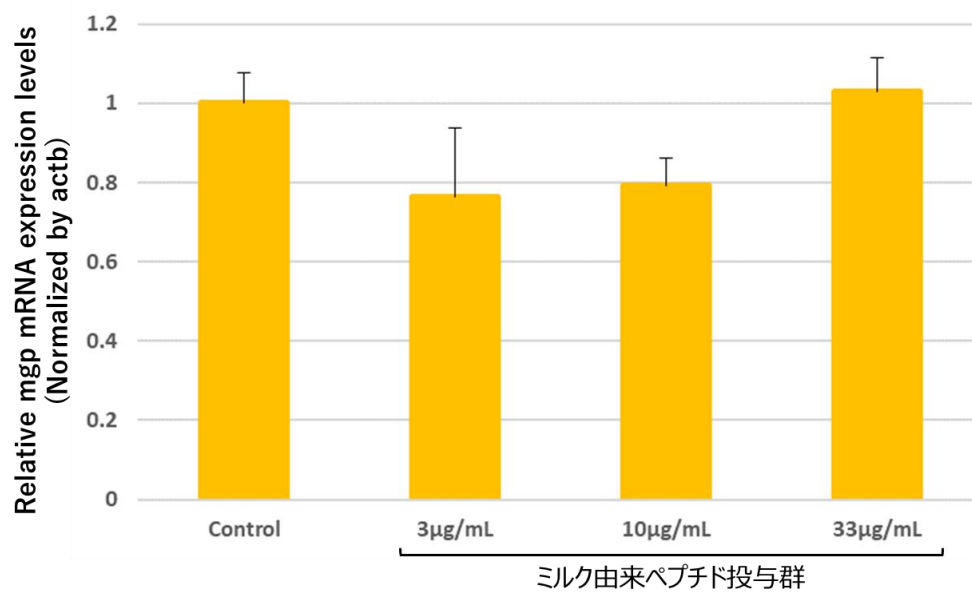


図 10 (a) 16dpf, (b) 23dpf のゼブラフィッシュの mgp の mRNA 発現レベル

※* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

まずは図 7, 8 から, 初期の骨芽細胞分化促進因子である runx2a は Control と比較し, 23dpf のミルク由来ペプチド 33 μ g/mL 投与したゼブラフィッシュにおいて発現量が有意に増加しており, 同じく初期の骨芽細胞分化促進因子である sp7 に関しては 16dpf のミルク由来ペプチド 3 μ g/mL 及び 10 μ g/mL 投与したゼブラフィッシュにおいて発現量が有意に増加していた。これらのことから, 初期の骨芽細胞の分化と骨形成に関与する runx2a, sp7 のうち, ミルク由来ペプチド投与したゼブラフィッシュにおいて sp7 が runx2a に先立って大きく発現し, その後 runx2a の発現が大きくなるという形で骨形成が促進している様子が見られたことがわかった。

次に図 9 から, 類骨のマーカーである bglap は Control と比較し, 23dpf のミルク由来ペプチド 33 μ g/mL 投与したゼブラフィッシュにおいて発現量が有意に増加していた。このことから, 成長段階に伴ってミルク由来ペプチド投与したゼブラフィッシュの方が類骨が増加したことが考えられる。

次に図 10 から, 軟骨のマーカーである mgp は Control と比較し, 16dpf においてミルク由来ペプチド 3 μ g/mL 及び 33 μ g/mL 投与したゼブラフィッシュにおいて発現量が有意に増加していた。このことから, 成長の初期段階でミルク由来ペプチド投与したゼブラフィッシュの方が軟骨が増加したことが考えられる。

また, どの細胞マーカーであっても, またどの濃度, どの段階であっても, Control と比較してミルク由来ペプチド投与したゼブラフィッシュの方が遺伝子発現が大きくなり, ミルク由来ペプチド投与によって骨芽細胞及び軟骨細胞が増加する結果が見られることを仮説としていたが, どの図を見ても Control と比較して発現量が下がってしまったものはいくつかあり, 骨芽細胞・軟骨細胞マーカーを中心とした遺伝子発現解析に関しては有意な結果が得られなかった。果たして今回の結果が正しいのかを確認するため, またハウスキーピング遺伝子 actb においてデータのバラつきが生じていたため, 再実験が必要だと考えている。

3-4. その他の実験過程における結果

最初の投与試験では、0(control), 100, 300 μ g/mL の濃度で行っていた。しかし、これらの濃度だと僅か数日後に多くのゼブラフィッシュが死亡してしまい毒性が強く出てしまうことがわかった。そこで、濃度を小さくして投与試験を行った。

次の投与試験では、0~33 μ g/mL の濃度で個体数を約 8~20 個体にして投与試験を行ったが、個体差による骨形成・骨成長度合いの差異が生じ、データのバラつきが大きくなってしまい、ミルク由来ペプチドの投与によって骨形成・骨成長が促進する可能性が示せたとしても、有意差のあるデータが得られなかった。そこで、個体差によるデータのバラつきを小さくするために、ミルク由来ペプチド投与の 21 日間の継続試験の中で骨の発生が投与後 14 日目(16dpf)に観察され始めたことから、16dpf からミルク由来ペプチド投与試験を開始し、23dpf までの 1 週間の継続試験という形で投与期間を短くして行った。しかし、データのバラつきは小さくならず、有意差のあるデータは得られなかった。また、データのバラつきは染色過程によるバラつきの可能性についても考えたことがあり、卓上小型振盪機での振盪による染色から、染色溶液がよりうまく混ざり合うミニローターでの転倒攪拌による染色に切り替えた。しかし、データのバラつきは解消されなかったため、データのバラつきの原因は染色過程によるバラつきではなく、やはり個体差によるバラつきであると考えた。これらの過程から個体差によるバラつきを小さくするためには、ゼブラフィッシュ稚魚の個体数(n 数)を約 100 個体に増加させる必要があると考えた。

3-5. 今後の予定

今回の骨・軟骨二重染色及び標準体長測定の結果から、骨形成においても骨成長においてもミルク由来ペプチド $3\mu\text{g/mL}$ 投与において最も優れた値が得られたことや、今回の実験での最小濃度であるミルク由来ペプチド $0.3\mu\text{g/mL}$ 投与の場合にも骨形成・骨成長が促進する傾向が見られたことがわかった。これらの結果から、 $3\mu\text{g/mL}$ が果たして最良の濃度なのか、この濃度よりも大きいと毒性を示し始めるのか、骨形成・骨成長が促進する最小の濃度はどれくらいなのかを確認する必要があると考えた。そこで、ミルク由来ペプチド投与による骨形成・骨成長にプラスの効果をもたらす最小の濃度を確かめるために、さらに低濃度でのミルク由来ペプチド投与試験を行い、並びに毒性試験によって毒性を示さない最大の濃度も確認するという形で、ミルク由来ペプチドのドーズレスポンスについての検討を行う予定である。

また、今回は骨芽細胞・軟骨細胞マーカーを中心とした遺伝子発現解析においては、有意な結果が得られなかったため、実験操作過程を再度綿密に確認して原因を追究しつつ、再度検討を行う。

さらには、今回はゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 実験を行ったが、次は細胞を用いた *in vitro* 実験も行い、ミルク由来ペプチド投与によって骨代謝に関与する細胞の1つである骨芽細胞の形成や機能を促進するかについての検討を行う。具体的には骨芽細胞に分化させるための前駆細胞として MC3T3-E1 細胞(マウス頭蓋骨由来細胞株)を用いて、分化因子下で培養することにより骨芽細胞へと分化させ、そこにミルク由来ペプチドを投与し、分化の指標となるアルカリホスファターゼ (ALP) 染色での染色度合いによってミルク由来ペプチド投与による骨芽細胞への分化作用について検討を行う予定である。

第 4 章

総括

総括

本研究では、「ミルク由来ペプチド」の補給による成長期の骨に対する影響について研究を行うために、成長期のゼブラフィッシュ稚魚に「ミルク由来ペプチド」を与えることで、アルシアンブルー・アリザリンレッドの二重染色や関連遺伝子の発現解析により、骨形成・骨成長への効果について検証を行った。

ミルク由来ペプチド投与 21 日目におけるアルシアンブルー・アリザリンレッドの二重染色の結果及び標準体長の結果から、ミルク由来ペプチド投与によって骨形成・骨成長が促進する傾向が見られた。一方で骨芽細胞・軟骨細胞マーカーを中心とした遺伝子発現解析からは、あまり有意なデータが得られなかった。

今後はさらに低濃度でのミルク由来ペプチド投与試験及び毒性試験によるミルク由来ペプチドのドーズレスポンスについての検討、リアルタイム PCR による骨芽細胞・軟骨細胞マーカーを中心とした遺伝子発現解析においてより正確な値を得るための再実験、MC3T3-E1 細胞を用いたミルク由来ペプチド投与による骨芽細胞への分化作用についての検討を予定している。

参考文献

- [1] 『学校の管理下の災害－基本統計－』（独立行政法人日本スポーツ振興センター）
(2019)
- [2] 「永久歯先天欠如の発生頻度に関する調査研究」（一般社団法人日本小児歯科学会）
(2007-2008)
- [3] 上田晃三, 清野佳紀, 骨の成長・発達. バイオメカニズム学会誌, 2008, 32, 57-60.
- [4] 山田志津香, 林善彦, 骨芽細胞分化と骨形成に関する転写因子とシグナル伝達機構.
生体医工学, 2006, 44, 490-495
- [5] 【特許文献】 特開 2009-263255 号公報
- [6] Kerstin Howe, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, et al., The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. nature, 2013, 496, 498-503.
- [7] P. Eckhard Witten, Ann Huysseune, A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleostfish, with special emphasis on osteoclasts and their function. Biol. Rev., 2009, 84, 315-346.
- [8] Liqing Zang, Kazuhiro Kagotani, Hiroko Nakayama, et al., 10-Gingerol Suppresses Osteoclastogenesis in RAW264.7 Cells and Zebrafish Osteoporotic Scales. Front Cell Dev Biol., 2021, 9, 588093.
- [9] Francesca Maradonna, Giorgia Gioacchini, Silvia Falcinelli, et al., Probiotic Supplementation Promotes Calcification in Danio rerio Larvae: A Molecular Study. PLOS ONE, 2013, 8, e83155.
- [10] Walker M.B., Kimmel C.B., A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. Biotech Histochem, 82, 23-28.

謝辞

本研究をするにあたりご指導，ご鞭撻頂いた西村訓弘教授，島田康人先生，臧黎清先生，中山寛子様，その他西村研究室の方々に心より感謝いたします。

特に直接ご指導いただいた島田先生，臧先生には，ご迷惑をおかけしてしまったことも多々ありましたが，たくさんの助言を頂き感謝の言葉に尽きます。本当にありがとうございました。

研究においては未熟者であった私にとっては，先生方，西村研究室の皆様方のおかげで，たくさんのことを学び，多くのことを経験することができた２年間であったと感じております。こちらの研究室で得た知識，経験は大切にしていきたいと思います。

配属から今までの研究生生活に関わったすべての方々にこの場を借りて御礼申し上げます。