慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Involvement of Notch signaling in initiation of prechondrogenic condensation and nodule formation in limb bud micromass cultures
Sub Title	軟骨結節の初期形成におけるNotchシグナリングの関与 : 肢芽細胞高密度培養系を用いた解析
Author	藤巻, 亮二(Fujimaki, Ryoji)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.4 (2006. 12) ,p.6-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20061202-0006

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Involvement of Notch signaling in initiation of prechondrogenic condensation and nodule formation in limb bud micromass cultures

（軟骨結節の初期形成におけるNotchシグナリングの関与－肢芽細胞高密度培養系を用いた解析－）

藤　巻　　亮　二

内容の要旨

Notchシグナリングは発生過程において様々な細胞の運命決定や組織の形態形成に関与している。しかしながら、軟骨形成におけるその役割は幾つかのin vivoの研究からその関与が疑われるが、詳細についてはいまだ明らかとなっていない。そこで本研究では、肢芽細胞高密度培養系を用いたin vitroの系で、Notchシグナリングの軟骨細胞分化、及び軟骨結節形成におけるその役割を解析した。

実験では胎生12.5日のC57BL6マウスの肢芽細胞を採取し2×10^7個/mlの細胞濃度で培養した。この培養系では軟骨細胞分化と結節形成がin vitroで再現される。この培養系における１）Notch関連遺伝子mRNAの系時的な発現をRT-PCRで計測し、２）活性型Notch1蛋白の局在を免疫染色法で調べた。また、この培養系にNotch シグナルの抑制剤であるγ-secretase 阻害剤（DAPT）を投与しその軟骨細胞分化と結節形成に対する影響を以下の実験を行い検討した。３）アルシアンブルー染色を行い染色領域、結節数、結節の直径を定量、４）Sox9，typeⅡコラーゲンα1鎖mRNAの発現量を半定量RT-PCRで計測、５）軟骨結節の形態的な変化を観察、６）BMP4，GDF5，Id1の蛋白発現量をウエスタンブロット法で定量した。以上をDAPT処理群とコントロール群で比較した。その結果、１）Notch1，2，3およびそのリガンドであるDelta1，Jagged1，2のmRNAは、結節形成が最も盛んになる培養３日から５日に最も高く発現した。２）活性型Notch1蛋白は軟骨結節に局在し軟骨結節の成熟が進むと結節の辺縁部により強く染色された。３）DAPT投与群ではコントロール群に比し約2.5倍アルシアンブルー染色領域が大きかった。結節数および結節の大きさは共にDAPT群で有意に増加していたが、結節数の増加がより顕著であった。４）Sox9およびtypeⅡコラーゲンα1鎖mRNAの発現量はDAPT群で高かった。５）DAPT投与群の軟骨結節の形状は辺縁が不明瞭であった。コントロール群では培養日数が進むと結節同士は接触しながらもその境界は保たれるのに対して、DAPT投与群では結節同士が融合しその境界は消失していた。６）DAPT投与群ではGDF5，Id1の蛋白発現量がコントロール群に比し増加していた。

軟骨結節の初期形成のメカニズムとそれに関わる遺伝子はあまり知られていない。今回の結果からNotchシグナルが軟骨細胞の初期分化を抑制し、さらに軟骨結節の境界形成に関与している事が示唆された。またこれらの分化や境界形成に対する役割はBMPシグナルと協調して行われている可能性が考えられた。

論文審査の要旨

Notchシグナリングは多様な細胞種の分化運命決定と組織の形態形成に関わっていることが知られているが、軟骨形成におけるその役割はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、肢芽間葉系細胞培養を用いたin vitroの実験系で軟骨形成におけるNotchシグナリングの役割を解析した。

肢芽間葉系細胞培養系におけるNotch関連遺伝子のmRNA発現を調べると、Notch1, 2, 3およびリガンドであるDelta1, Jagged1, 2は培養１日目から５日目にかけて高発現していた。この結果はNotchシグナリングが軟骨結節の初期形成期によく機能していることを示唆している。次に活性型Notch1蛋白の局在を免疫組織染色法で調べた。活性型Notch1蛋白は軟骨結節の初期形成期には結節部位に一致して発現が見られ、結節間の領域には発現が見られなかった。また軟骨結節の成熟が進むと活性型Notch1の発現は結節の辺縁部位に移行していた。次にNotchの阻害剤であるγ-secretase inhibitor（DAPT）を投与してその表現型を調べると、DAPTの投与により結節数、結節の大きさは共に増えて軟骨分化が亢進していた。軟骨分化のマーカーであるSox9，type Ⅱ collagenのmRNA発現、さらにBMP関連遺伝子であるGDF5, Id1の蛋白発現はDAPT投与により亢進していた。またDAPT投与群では結節の辺縁が不明瞭となり、軟骨分化の領域形成が正常に行われていなかった。この事実は、Notchシグナルを阻害することにより軟骨分化だけではなく軟骨結節の形態形成にも影響を与えることを示唆している。

審査では、まず実際の生体内でのNotchシグナルの役割に関する質問がなされた。それに対し軟骨細胞特異的にNotch1遺伝子をノックアウトした結果、表現型の異常は見られなかったと回答された。またその理由として、他の遺伝子によってその機能が代償されている可能性が高いと回答された。さらに、NotchとBMPの軟骨細胞での相関関係について質問がなされた。これに対し両者は軟骨形成においては拮抗的に働くことが示唆されたが、詳細な機序については今後さらに解析が必要であると回答された。次に軟骨結節の境界形成のメカニズムに関して質問がなされた。これに対し軟骨結節の境界形成に対して過去に着目した報告は少なく、その解析手法についても今後の検討課題であると回答された。

以上のように本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、軟骨細胞の初期分化をNotchシグナルが抑制する可能性を示した点、さらに軟骨結節の辺縁、領域形成という新しい視点を呈示し、それにNotchシグナルが関与する可能性を示唆した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者　主査　整形外科学　戸山　芳昭
　　病理学　岡田　保典　　発生・分化生物学　須田　年生
　　生理学　岡野　栄之
学力確認担当者：
　　審査委員長：岡田　保典

試問日：平成18年8月7日