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

Title	骨形成性毛細血管からみた内軟骨性骨化の新しい概念
Sub Title	Osteogenic capillaries : new aspect of endochondral ossification
Author	松尾, 光一(Matsuo, Kōichi) 黒田, 有希子(Kuroda, Yukiko)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	中耳の耳小骨と内耳の骨迷路は哺乳動物の成獣では高い石灰化度を示すが、発生過程で硬い骨を作る細胞機構は不明である。本研究では、聴覚に関連する骨の高度な石灰化をもたらす骨芽細胞は、骨基質としてI型に加えII型コラーゲンを産生していることを見出した。通常、I型コラーゲンは骨芽細胞が、II型のコラーゲンは軟骨細胞が産生する。しかも一般的な骨芽細胞が緑色蛍光タンパク質で光るマウスでも、耳の骨の骨芽細胞は光らなかった。耳の骨芽細胞は、骨細胞に変化するなどの性質から、軟骨細胞ではないことが明らかになった。「聴覚骨芽細胞」は、II型コラーゲンを発現する新たな骨芽細胞であると結論付けた。 Auditory ossicles in the middle ear and bony labyrinth of the inner ear are highly mineralized in adult mammals. Cellular mechanisms underlying formation of dense bone during development are unknown. Here, we found that osteoblast-like cells synthesizing highly mineralized hearing-related bones produce both type I and type II collagens as the bone matrix, while conventional osteoblasts and chondrocytes primarily produce type I and type II collagens, respectively. Furthermore, these osteoblast-like cells were not labeled in a "conventional osteoblast"-specific green fluorescent protein mouse line. Type II collagen-producing osteoblast-like cells were not chondrocytes as they express osteocalcin, localize along alizarin-labeled osteoid, and form osteocyte lacunae and canaliculi. Therefore, we conclude that these type II collagen-producing hypermineralizing osteoblasts (named auditory osteoblasts) represent a new osteoblast subtype.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (B) (一般) 研究期間 : 2017 ~ 2020 課題番号 : 17H04015 研究分野 : 骨代謝学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17H04015seika

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.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2017～2020
課題番号：１７Ｈ０４０１５

研究課題名（和文）骨形成性毛細血管からみた内軟骨性骨化の新しい概念

研究課題名（英文）Osteogenic capillaries - new aspect of endochondral ossification

研究代表者
松尾　光一（MATSUO, Koichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：４０２２９４２２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,700,000円

研究成果の概要（和文）：中耳の耳小骨と内耳の骨迷路は哺乳動物の成獣では高い石灰化度を示すが、発生過程で硬い骨を作る細胞機構は不明である。本研究では、聴覚に関連する骨の高度な石灰化をもたらす骨芽細胞は、骨基質としてI型に加えII型コラーゲンを産生していることを見出した。通常、I型コラーゲンは骨芽細胞が、II型のコラーゲンは軟骨細胞が産生する。しかも一般的な骨芽細胞が緑色蛍光タンパク質で光るマウスでも、耳の骨の骨芽細胞は光らなかった。耳の骨芽細胞は、骨細胞に変化するなどの性質から、軟骨細胞ではないことが明らかになった。「聴覚骨芽細胞」は、II型コラーゲンを発現する新たな骨芽細胞であると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
耳小骨が硬いことにより音の伝導効率が良くなること、蝸牛骨が硬いことにより、蝸牛の構造的な安定性が増すものと考えられており、本研究はそのような硬い骨を生み出す骨芽細胞が、これまで知られていた骨芽細胞とは異なることを、いくつもの異なる研究手法を組み合わせて示した。実際に、骨の石灰化異常をきたす疾患では、難聴を認めるものも知られている。本研究は、骨代謝異常と難聴の関係を理解するための手がかりとなるものであるとともに、中耳や内耳で聴覚器を構成する骨組織に特化した骨芽細胞の存在が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Auditory ossicles in the middle ear and bony labyrinth of the inner ear are highly mineralized in adult mammals. Cellular mechanisms underlying formation of dense bone during development are unknown. Here, we found that osteoblast-like cells synthesizing highly mineralized hearing-related bones produce both type I and type II collagens as the bone matrix, while conventional osteoblasts and chondrocytes primarily produce type I and type II collagens, respectively. Furthermore, these osteoblast-like cells were not labeled in a "conventional osteoblast"-specific green fluorescent protein mouse line. Type II collagen-producing osteoblast-like cells were not chondrocytes as they express osteocalcin, localize along alizarin-labeled osteoid, and form osteocyte lacunae and canaliculi. Therefore, we conclude that these type II collagen-producing hypermineralizing osteoblasts (named auditory osteoblasts) represent a new osteoblast subtype.

研究分野：骨代謝学

キーワード：耳小骨　聴覚骨芽細胞　ミネラリゼーション　蝸牛

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

18 世紀の昔から、骨は血管系によって作られるとされてきた（von Haller, Opera minora, 1763）。骨は、内軟骨性骨化により軟骨が骨に置換されてできるもの（長管骨、椎骨、頭蓋底、耳小骨など）と、膜性骨化によって軟骨を介さずにできるもの（頭蓋冠など）に大別される。この区別はマクロなもので、例えば長管骨では、成長板の軟骨細胞が骨端側で増殖し、骨幹側で肥大化して吸収され骨化するので長軸方向に内軟骨性骨化がおこり、横径の成長は皮質骨の膜性骨化でおこる。

長管骨の成長板については、長年にわたり多くのことが解明されてきた。成長板の軟骨細胞が肥大化して血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を産生し、血管侵入が誘導されること（Gerber et al., Nat Med, 1999）、成長板直下の軟骨・骨移行部には特徴的な形態の毛細血管がみられること（Hunter and Arsenault, Anat Rec, 1990; Aharinejad et al, Anat Rec, 1995）、さらに、エンドムチン強陽性の血管内皮細胞（Type H 血管）が肥大軟骨細胞層に侵入することなど（Kusumbe et al, Nature, 2014）、内軟骨性骨化における微小血管の構造や関連分子が明らかになってきた。成長板の肥大軟骨細胞層には、血管とともに破軟骨細胞（破骨細胞と本質的に同じ）が侵入して軟骨基質を除去すると考えられる。しかし、軟骨基質が除去されてできた空間に、つまり軟骨基質上に、最初に骨基質を分泌する骨芽細胞の実体については明らかになっていなかった。

研究代表者は、成長せずに内軟骨性骨化で骨化する耳小骨を解析し、「骨形成性毛細血管」（osteogenic capillary）を見出した。これは骨芽細胞がペリサイト（血管周皮細胞）のように血管内皮細胞からなる管腔の外に接する毛細血管構造で、軟骨内ではこの毛細血管の周囲に骨形成がおこり、血管内腔が徐々に狭まっていった（Matsuo et al, Development, 2015）。骨芽細胞を緑色蛍光タンパク質（GFP）で可視化できる *Col1*-GFP トランスジェニックマウスで、驚くべきことに耳小骨の骨芽細胞は GFP 陰性だった。このような背景のもと本研究では、ミクロな内軟骨性骨化のメカニズムを解明するために、毛細血管と骨芽細胞に着目した。

２．研究の目的

長管骨や耳小骨など多くの骨は、無血管の軟骨に血管が侵入し、軟骨基質が骨基質に置換されて形成される（内軟骨性骨化）。血管侵入に伴い軟骨基質が除去されたところに、最初に骨基質を添加する骨芽細胞は、骨基質の上に骨基質を付加する通常の骨芽細胞と教科書的には同一である。しかし耳小骨を用いた独自の解析により、骨形成性毛細血管周囲では「内軟骨性骨芽細胞」とでも呼ぶべき特殊な細胞が骨形成を促していることがわかってきた。そこで本研究では、通常の骨芽細胞とは異なる「内軟骨性骨芽細胞」が、骨形成性毛細血管を構成して、軟骨基質上に骨基質を添加するという仮説を実験的に証明することを目的とした。

３．研究の方法

（１）「内軟骨性骨芽細胞」について、次の３つの作業仮説を設定し、実験を開始した。
仮説１．耳小骨だけでなく、長管骨の成長板の軟骨・骨移行部に、「骨基質上の骨芽細胞」と異なる「内軟骨性骨芽細胞」が存在して軟骨基質上に骨基質を分泌する。
仮説２．「内軟骨性骨芽細胞」は、軟骨細胞系譜の細胞である。
仮説３．「内軟骨性骨芽細胞」の分化には、破軟骨細胞（破骨細胞）が必要である。

（２）通常の骨芽細胞を可視化するために、緑色蛍光タンパク質 GFP を発現するトランスジェニックマウス(2.3 kb の *Col1* プロモータで GFP 遺伝子を転写する。Matsuo et al, Development, 2015 で報告）を用いた。「骨形成性毛細血管」を見出した耳小骨と、長管骨の成長板を比較解析した。

（３）仮説上の「内軟骨性骨芽細胞」は、*Col1*-GFP マウスにおいて GFP 陰性で骨芽細胞のマーカー陽性の細胞として定義したために、*Col1*-GFP 陰性骨芽細胞を特異的に可視化し、同定するためのマーカーが必要であった。そこで、*Col1*-GFP 陰性骨芽細胞が内軟骨性骨化を行う耳小骨を用いて陽性マーカーを探索した。

（４）生後 5 週齢までのマウスの解析データを得るために、耳小骨の内軟骨性骨化の過程を生後のマウスで経時的に組織学の手法を用いて解析した。内軟骨性骨化の過程で、無血管の軟骨組織に血管と破骨細胞（破軟骨細胞）が侵入し軟骨を除去する過程、骨芽細胞マーカー（アルカリホスファターゼとオステオカルシン）陽性で *Col1*-GFP 陰性細胞が出現し、骨形成を行う過程を詳細に観察した。耳小骨だけでなく、内耳の壁を構成する骨についても解析した。

（５）上記仮説３．「内軟骨性骨芽細胞の分化には、破軟骨細胞（破骨細胞）が必要である」を検証するために、破骨細胞を欠く RANKL ノックアウトマウスを解析した。実際、破骨細胞マーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ陽性の破骨細胞は、このマウスには認められない。この RANKL ノックアウトマウスで、細い毛細血管が軟骨原基に侵入するか、血管腔は拡張するか、ア

ルカリホスファターゼ陽性細胞は出現するか、オステオカルシン陽性細胞が取り巻く骨形成性血管が出現するかを検討した。

（6）「聴覚骨芽細胞」が軟骨細胞系譜の細胞であるかを検討した（修正された仮説２）。放射光施設 SPring-8（兵庫県）におけるX線顕微鏡を用いたトモグラフィーにより、「聴覚骨芽細胞」は、形態学的に軟骨とことなり、骨基質の中に骨細胞として埋まることが観察された（東北大学との共同研究）。

（7）骨芽細胞でありながら、*Col1*-GFP 陰性であることを説明するために、コラーゲンの組成を質量分析法で解析した（岡山大学との共同研究）。免疫染色や In situ ハイブリダイゼーション法によっても、コラーゲンの種類を確認した。

（8）耳小骨の骨基質の特性を明らかにするために、qBEI 法（定量的 Backscattered Electron Imaging）を用いて内軟骨性骨化過程のカルシウム含量を、耳小骨と長管骨を比較して定量した（オーストリア、ボルツマン骨学研究所との共同研究）。

（9）耳小骨の骨基質の無機成分であるアパタイトの配向性を、耳小骨と長管骨を比較して定量した（大阪大学との共同研究）。

４．研究成果

（1）研究の主な成果

中耳の耳小骨と内耳の骨迷路が、マウスの成獣のみならず、生後３週齢でも高い石灰化度を示すことを確認した。発生過程で硬い骨を作る細胞機構は不明であった。本研究では、聴覚に関連する骨の高度な石灰化をもたらす骨芽細胞は、骨基質としてI型に加えII型コラーゲンを産生していることを見出した。通常、I型コラーゲンは骨芽細胞が、II型のコラーゲンは軟骨細胞が産生する。しかも通常の骨芽細胞が緑色蛍光タンパク質で光るようにしたマウスでも、耳の骨の骨芽細胞は光らなかった。耳の骨芽細胞は、骨細胞に変化し、骨細管ネットワークを構築するなどの性質から、軟骨細胞ではないことが明らかになった。聴覚骨芽細胞は、II 型コラーゲンを発現する新たな骨芽細胞であると結論付けた。qBEI 法により、石灰化の速度や緩やかであるものの、耳小骨は長管骨と比べて高度の石灰化（hypermineralization）を示すことが分かった。また、耳小骨は長管骨に比較して、アパタイトの高い配向性を示すことが分かった。

以上のように、当初想定した「内軟骨性骨芽細胞」を追究する過程で、「聴覚骨芽細胞」という聴覚系の骨を形成する特殊な骨芽細胞を同定することができた(Kuroda et al, 2021, Journal of Bone Mineral Research)。

（2）得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまで、ヒトを含む動物の成獣では、耳小骨の骨密度が高いことは知られていたものの、その理由は不明であった。今回の研究で、骨をつくる骨芽細胞そのものが、耳小骨では長管骨などの通常の骨とは異なることが分かった。さらに耳小骨や骨迷路の骨基質が、II 型コラーゲンを含む特殊なものであることも分かった。

国内外では、軟骨細胞系譜と骨芽細胞系譜との境界があいまいであるというデータが報告されており、軟骨細胞が骨芽細胞に分化し得るとされるようになっている。本研究の、「聴覚骨芽細胞」の細胞系譜は不明であるものの、観察される限りにおいては、軟骨細胞からの連続的な変化は認められなかった。現時点では、「聴覚骨芽細胞」は、いわゆる軟骨細胞とは異なる、真正の骨芽細胞であるとか考えるのが妥当と思われる。

本研究は、骨代謝異常と難聴の関係を理解するための手がかりとなるだけでなく、聴覚系でのみ、特殊な骨芽細胞が出現するメカニズムはなにか、*Col1*-GFP 陰性骨芽細胞は、聴覚系以外には存在しないのか、など新たに解明すべき課題を生み出したともいえる。

（3）今後の展望

「聴覚骨芽細胞」は *Col1*-GFP 陰性であるものの、II 型コラーゲンだけでなくI型コラーゲンも産生している。これは、トランスジェニックマウスの作製で用いられたマウス *Col1* 遺伝子プロモータの断片が、2.3 kb と短いためかも知れない。類似のラット 2.3 kb *Col1* プロモータを用いて作製された、*Col1*-CFP マウスを用いて、「聴覚骨芽細胞」に蛍光タンパク質が発現するかどうかを解析する準備を進めている。またオステオカルシンプロモータを用いたレポータマウスを用いる準備も進めている。これらのレポータマウスを組み合わせて解析力を高めることができると考えられる。

「聴覚骨芽細胞」が形成した骨の石灰化度が高くなるメカニズムを明らかにするために、この細胞集団をセルソーティングで分取することを計画している。また、長管骨成長板で、軟骨基質の上に最初に骨基質を載せる骨芽細胞や、長管骨の骨外膜の骨芽細胞が *Col1*-GFP 陽性であるかどうかなどの課題も、新たなレポータマウスを駆使すれば解明できるものと思われる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Edamoto M, Kuroda Y, Yoda M, Kawaai K, Matsuo K.	４．巻 9
２．論文標題 Trans-pairing between osteoclasts and osteoblasts shapes the cranial base during development	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-38471-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Matsuo K, Ji S, Miya A, Yoda M, Hamada Y, Tanaka T, Takao-Kawabata R, Kawaai K, Kuroda Y, Shibata S.	４．巻 120
２．論文標題 Innervation of the tibial epiphysis through the intercondylar foramen	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Bone	６．最初と最後の頁 297-304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2018.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Kuroda Y, Kawaai K, Hatano N, Wu Y, Takano H, Momose A, Ishimoto T, Nakano T, Roschger P, Blouin S, Matsuo K.	４．巻 -
２．論文標題 Hypermineralization of hearing‐related bones by a specific osteoblast subtype	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbmr.4320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計16件（うち招待講演　3件／うち国際学会　6件）

１．発表者名 Koichi Matsuo, Masaki Yoda, Yukiko Kuroda, Katsuhiko Kawaai, Yanlin Wu, Hidekazu Takano, Atsushi Momose.
２．発表標題 Osteoclast-Osteoblast “Trans-pairing” across Cortical Bone Shapes Developing Long Bones.
３．学会等名 米国骨代謝学会（ASBMR）（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名
松尾光一

２．発表標題
マウス耳小骨のタルボ位相イメージング

３．学会等名
SPring-8シンポジウム（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
黒田有希子、河合克宏、松尾光一

２．発表標題
超石灰化骨芽細胞によって形成された骨はII型コラーゲンを含み骨密度が高くなる

３．学会等名
第37回日本骨代謝学会学術集会

４．発表年
2019年

１．発表者名
松尾光一、黒田有希子、河合克宏、百生敦、姫しゅうてい

２．発表標題
内軟骨性骨化で形成される耳小骨は軟骨原器より小さい

３．学会等名
第37回日本骨代謝学会学術集会

４．発表年
2019年

１．発表者名
松尾光一

２．発表標題
X-ray Talbot imaging from bone to tunicate

３．学会等名
The 15th Symposium of Japanese Research Community on X-ray Imaging Optics（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
Yukiko Kuroda, Koichi Matsuo.

２．発表標題
Hypermineralization of bones by Col2a1-expressing osteoblasts.

３．学会等名
ASBMR 2018 Annual Meeting（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
Yanlin Wu, Hidekazu Takano, Karol Vegso, Masato Hoshino, Koichi Matsuo, Atsushi Momose.

２．発表標題
X-Ray phase nano-tomography by FZP-based X-ray microscopy combined with Talbot interferometry.

３．学会等名
X-Ray Microscopy (XRM2018)（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
呉彦霖、高野秀和、Karol Vegso、星野真人、松尾光一、百生敦

２．発表標題
高回折効率FZPを用いたTalbot干渉計型X線位相顕微鏡.

３．学会等名
第32回日本放射光学会年会

４．発表年
2019年

１．発表者名
依田昌樹、黒田有希子、松尾光一

２．発表標題
マウス腓骨における骨形成部位は成長に伴い変移する.

３．学会等名
第36回日本骨代謝学会学術集会

４．発表年
2018年

１．発表者名
姫しゅうてい、依田昌樹、田中智哉、高尾亮子、黒田有希子、芝田晋介、松尾光一

２．発表標題
シュワン細胞可視化マウスにおける脛骨近位骨端の痛覚神経の解析

３．学会等名
第36回日本骨代謝学会学術集会

４．発表年
2018年

１．発表者名
黒田有希子、依田昌樹、松尾光一

２．発表標題
骨密度の高い骨はII型コラーゲンを産生する「超石灰化骨芽細胞」によって作られる

３．学会等名
第36回日本骨代謝学会学術集会

４．発表年
2018年

１．発表者名
Yukiko Kuroda, Ayako Sakamoto, Masaki Yoda, Yanlin Wu, Hidekazu Takano, Atsushi Momose, Koichi Matsuo.

２．発表標題
A novel osteoblast subpopulation initiates endochondral ossification by forming osteogenic capillaries.

３．学会等名
American Society for Bone and Mineral Research 2017 Annual Meeting（国際学会）

４．発表年
2017年

１．発表者名
Masaki Yoda, Yukiko Kuroda, Koichi Matsuo.

２．発表標題
The Primary Trabecular Bone Becomes Lamellar by Continuous Parathyroid Hormone Infusion

３．学会等名
American Society for Bone and Mineral Research 2017 Annual Meeting（国際学会）

４．発表年
2017年

１．発表者名
Koichi Matsuo

２．発表標題
Developmental bone biology inspired by interferometric x-ray phase imaging

３．学会等名
X-ray and Neutron Phase Imaging with Gratings (XNPIG) 2017（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2017年

１．発表者名
黒田有希子、依田昌樹、松尾光一

２．発表標題
Collallow骨芽細胞は内軟骨性骨化で働く新たな骨芽細胞群である

３．学会等名
第35回日本骨代謝学会学術集会

４．発表年
2017年

１．発表者名
依田昌樹、黒田有希子、松尾光一

２．発表標題
マウス腓骨における内軟骨性骨化後の断面形状の変化

３．学会等名
第35回日本骨代謝学会学術集会

４．発表年
2017年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕
Laboratory of Cell and Tissue Biology
http://wp4.matsuo-lab.com/

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	黒田　有希子 (Kuroda Yukiko) (70455343)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストリア	Ludwig Boltzmann Institute of Osteology			