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

Title	軟骨原基を形成する形態形成関連因子の三次元的解析
Sub Title	Three-dimensional analysis of morphogenetic factors forming cartilage primordia
Author	依田, 昌樹(Yoda, Masaki)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	軟骨原基が形成される時期は間葉系組織中に血管の侵入はないことから、軟骨原基の形態形成関連因子を産生しているのは軟骨原基周囲の間葉系細胞であると考えられる。胎生期の軟骨原基および周囲に存在する間葉系細胞の可視化をおこなった結果、軟骨原基の発現が部位ごとに異なることが分かった。また、組織学的観察により軟骨原基と周囲の細胞群の境界面にPDGFRα陽性細胞の局在が明らかとなり、成長因子であるPDGFの関与が示唆された。三次元的解析から軟骨を可視化できることができ、今後の免疫染色を併用した形態形成因子の局在解明に関する知見が得られた。 Since there is no invasion of blood vessels into the mesenchymal tissues at the time when the cartilage primordia are formed, it is suggested that the mesenchymal cells around the cartilage primordia are producing the morphogenetic factors related to the cartilage primordia. As a result of visualizing the cartilage primordia in the embryonic period and surrounding mesenchymal cells, it was found that the expression of cartilage primordia was different in each site. Moreover, histological observation revealed the localization of PDGFRα-positive cells at the interface between the cartilage primordia and the surrounding cell group, suggesting the involvement of PDGF. The cartilage could be visualized from the three-dimensional analysis, and the findings regarding the localization elucidation of morphogenetic factors using immunostaining were obtained.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2017～2019 課題番号：17K08548 研究分野：整形外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K08548seika

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　２ 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ０８５４８

研究課題名（和文）軟骨原基を形成する形態形成関連因子の三次元的解析

研究課題名（英文）Three-dimensional analysis of morphogenetic factors forming cartilage primordia

研究代表者
依田　昌樹（YODA, Masaki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：３０４６４９９４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：軟骨原基が形成される時期は間葉系組織中に血管の侵入はないことから、軟骨原基の形態形成関連因子を産生しているのは軟骨原基周囲の間葉系細胞であると考えられる。胎生期の軟骨原基および周囲に存在する間葉系細胞の可視化をおこなった結果、軟骨原基の発現が部位ごとに異なることが分かった。また、組織学的観察により軟骨原基と周囲の細胞群の境界面にPDGFRα陽性細胞の局在が明らかとなり、成長因子であるPDGFの関与が示唆された。三次元的解析から軟骨を可視化できることができ、今後の免疫染色を併用した形態形成因子の局在解明に関する知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　組織および器官の形態は本来三次元で理解されるべきものである。本研究の着想および手法は軟骨原基だけでなく組織の形態形成を解明する上で有用である。軟骨原基の形態形成機構を明らかにすることで、人工的に必要な形へと骨組織を形成することが期待できる。本研究の結果は、治療が困難である骨形成性疾患および軟骨・骨再建における新規治療法への応用に向けた基礎的知見の提供が一部出来たと考えている。

研究成果の概要（英文）：Since there is no invasion of blood vessels into the mesenchymal tissues at the time when the cartilage primordia are formed, it is suggested that the mesenchymal cells around the cartilage primordia are producing the morphogenetic factors related to the cartilage primordia. As a result of visualizing the cartilage primordia in the embryonic period and surrounding mesenchymal cells, it was found that the expression of cartilage primordia was different in each site. Moreover, histological observation revealed the localization of PDGFRα-positive cells at the interface between the cartilage primordia and the surrounding cell group, suggesting the involvement of PDGF. The cartilage could be visualized from the three-dimensional analysis, and the findings regarding the localization elucidation of morphogenetic factors using immunostaining were obtained.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学　三次元解析　形態形成　細胞間相互作用

※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、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

骨が形成されるメカニズムは大きく分けて膜性骨化と内軟骨性骨化の２つが存在する。頭蓋骨および鎖骨などの扁平骨の形成を除き、骨を形づくり成長させるメカニズムの基本は内軟骨性骨化によるものであり、基となる軟骨原基の形成が重要である。骨の形態は、この軟骨原基の形に依存しているといってもよい。軟骨原基の形成は未分化な間葉系細胞の凝集が起点となり、その後軟骨原基内の細胞が段階的に成熟軟骨細胞へと分化することから軟骨原基は大きくなっていく。これまでの研究で軟骨原基形成はホメオティック遺伝子群の発現が制御していることが示されている。軟骨原基が形成される時期は、まだ筋肉、神経、血管を形成する細胞の流入が起こっておらず、軟骨原基の形態形成を直接誘導している因子は軟骨原基周囲の間葉系細胞が産生している可能性が高い。そこで「軟骨原基周囲の間葉系細胞群が、軟骨原基の形状を決定する」といった仮説を立てた。これまで、軟骨原基周囲の間葉系細胞が産生する形態形成関連因子は同定されていない。また、これら形態形成関連因子が軟骨原基の伸長およびパターン形成が生じる時期にどのように分布しているか明らかにされていない。この形態形成関連分子の分布を理解するためには、これまでの二次元的な解析による評価だけでなく、形態形成関連因子の三次元的な局在を視覚化することが必要である。この三次元的視覚化により軟骨原基の伸長方向とそれを誘導する因子の位置関係が明確となり、軟骨原基形態形成のより一層な理解が深まると考え研究の立案に至った。

２．研究の目的

骨を形づくるメカニズムは最初に形成される軟骨原基の骨化（内軟骨性骨化）により生じ、軟骨原基の形態に依存した骨が形成される。軟骨原基の形態は長管骨のように単純なものから、耳小骨のように特異なものまであり、それぞれ異なる形態形成関連因子が存在している可能性がある。また、軟骨原基が形成される時期は間葉系組織中に血管の侵入はないことから、軟骨原基の形態形成関連因子を産生しているのは軟骨原基周囲の間葉系細胞であると考えられる。さらに、軟骨原基と形態形成関連分子との情報伝達を理解するためには、形態形成関連分子の局在が三次元的に把握される必要がある。そこで本研究は、軟骨原基周囲に存在する間葉系細胞が産生する形態形成関連因子の分布を三次元的に解析し、軟骨原基の形態形成機構を解明することを目的とした。

３．研究の方法

(1)　組織特異的レポーターマウスの作製

マウス胎児の軟骨発現および間葉系細胞を可視化するために、Cre-loxP システムで組織特異的に赤色蛍光を発現する 2 系統のレポーターマウスの作製を行った。軟骨特異的レポーターマウス（以下、Col2/Tomato マウス）は 2 型コラーゲンプロモーター下で Cre 酵素を発現する遺伝子改変マウスと Tdtomato マウスの交配により作出し、同様に間葉系細胞の可視化には PDGFRαプロモーター下で Cre酵素を発現誘導できるマウス(Pα/Tomato マウス)を使用し作出した。マウス胎児（E10.5-E13.5）は採取後、蛍光実体顕微鏡下で観察し赤色蛍光を発するものを試料とした。

(2)　組織学的解析

マウス新仔（P3）およびマウス胎児は E10.5 から E13.5 に採取した。Pα/T マウスは採取する前日にタモキシフェンを母体に投与し Cre 酵素の発現を誘導した。採取した個体は 4%パラホルムアルデヒド（PFA）/PBS で一晩固定後包埋し、川本法により薄切し、免疫染色を行った。

(3)　骨格標本

マウス胎児（E10.5-E13.5）を採取し、全身の骨格標本をアリザリンレッドとアルシアンブルー染色により評価した。

(4)　透明化処理

マウス胎児の 3 次元的解析のため、個体は 4%PFA/PBS で固定後透明化処理を行った。今回、透明化試薬として Scale/S（Hama et al., Nat. Neurosci., 2015)、CUBIC（Tainaka et al., Cell Rep., 2018）法を用いた。また、レポーターマウスの蛍光タンパク質検出以外にホールマウント免疫染色も行い発現パターンを解析した。

(5)　μCT 解析

マウス胎児は、採取後に 4%PFA/PBS+1%グルタールアルデヒドで固定後、ルゴール溶液にて 5 日間染色しμCT 解析を行った。管電流 200μA、管電圧 90kV で撮像を行い、画像解析ソフトにより立体構築した。

４．研究成果

本研究では、骨形成の基盤となる軟骨原基形成をかかわる因子を解析することを目指した。さらに、その因子の三次元的解析を行うことを最終目標と定め実験を行った。

(1)　新仔（P3）の耳小骨および周囲に存在する間葉系様細胞群の境界面には PDGFRα陽性細胞の膜が存在した。

ツチ骨は成獣では完全に空気中に露出しているが、生後 3 日ではツチ骨は周囲をゼリー状の間葉系細胞群と接している。これは、胎生期に生じた軟骨原基と周囲の間葉系細胞群との境界

面が保存されている可能性があると考えられる。まず、ツチ骨の凍結切片を作成し免疫染色を行ったところ、ツチ骨を取り囲む多層の膜に PDGFRαが発現していることが明らかとなった。興味深いことに、その多層の膜のうち一番外側に存在する一層の膜のみ Sca-1 が発現していることが示された。一方、周囲の間葉系細胞群では PDGFRαはほぼ全ての細胞で発現が確認されたが、Sca-1 は細胞群を形成する一番外側のツチ骨と接している細胞のみ発現していた。このことから、境界面を規定する因子として Sca-1 が関与している可能性が示唆された。さらに、細胞分化の方向性を決定すると言われている Notch シグナルのリガンドの発現を調べたところ、リガンドである Jagged1 と Dll1 はツチ骨を取り囲む多層の膜上に存在していたが、その発現パターンは異なっていた。一方、周囲の細胞群は Jagged1 がほぼ全ての細胞で発現しているのに対し、Dll1 は一部の細胞のみ発現が確認された。

(2)　四肢と耳小骨では形態形成因子の発現時期にずれが生じていた

全身骨格標本の観察から、E13.5 では四肢の遠位端ですでに石灰化が始まっているのが観察されたが、耳殻および耳嚢は一部の軟骨形成のみが確認された。このことは、四肢と耳小骨の軟骨形態形成は発現するホメオボックス遺伝子の違いだけでなく、周囲に存在する間葉系細胞の種類および形態形成因子の発現時期にずれが生じていることが示唆された。

(3)　軟骨原基周囲の一部に PDGFRα陽性細胞の局在が認められた

E12.5 の横断面切片の免疫染色から Sox9 陽性細胞群の周囲の一部に PDGFRα陽性細胞の局在が明らかとなった。しかし、この段階では軟骨原基周囲すべてに PDGFRα陽性細胞が存在しておらず、成熟した軟骨もしくは石灰化した段階で周囲に PDGFRα陽性細胞が集積するものと推察された。このことから、軟骨原基はこの段階では独立した膜組織は構成していないことが示唆された。今後の課題として、時系列を追って PDGFRα陽性細胞の局在を追跡する必要があると考えられた。

(4)　三次元的解析から軟骨形成の立体的な把握が可能となった

E12.5 の胎児を用いた Scale/S 法と CUBIC 法の検討を行った結果、蛍光蛋白質検出に関してはどちらも透明化効率に大きな差はなかったが、免疫染色に関しては Scale/S の方が効率は良かった。レポーターマウスの蛍光蛋白質検出により、Col2/Tomato マウスおよび Pα/Tomato マウスともに脊椎から尾部、四肢および下顎に強い赤色蛍光が観察された。しかし、組織内部への抗体に浸透効率に問題が残る形となり今後の研究課題として残った。

(5)　μCT 解析から軟骨を含む軟組織の可視化ができた

胎児を液体窒素で凍結・融解後に固定することにより、I2KI 染色液の浸透を高め軟骨を含む軟組織の可視化が可能となった。今回使用した機器の解像度の限界により詳細な軟骨の局在を示すことはできなかったが、高解像度のμCT の使用により今後明らかにできると期待している。

本研究の結果から、軟骨原基とその周囲に存在する細胞群の境界面には PDGFRα陽性細胞の局在があると考えられた。この結果から、成長因子である PDGF がこの局在に関与していることがしさされた。また、他の因子に関しても検討を重ねたが、軟骨原基の周囲細胞の遺伝子解析は周囲細胞群の単離が困難であり期待できる結果が得られなかった。今後はレーザーマイクロダイセクション法などを用いて周囲細胞群を組織学的に分離し遺伝子解析を行う必要があると考えられた。

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　0件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Mizuno S, Yoda M, Kimura T, Shimoda M, Akiyama H, Chiba K, Nakamura M, Horiuchi K	４．巻 134
２．論文標題 ADAM10 is indispensable for longitudinal bone growth in mice	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Bone	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） 10.1016/j.bone.2020.115273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Koichi Matsuo, Shuting Ji, Ayako Miya, Masaki Yoda, Yuzuru Hamada, Tomoya Tanaka, Ryoko Takao-Kawabata, Katsuhiro Kawaai, Yukiko Kuroda, Shinsuke Shibata	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 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 －

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

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化する
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 Masaki Yoda, Yukiko Kuroda, Koichi Matsuo
２．発表標題 Bone Renovation of the Mouse Neonatal Fibula into the Adult Skeleton
３．学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research, Denver, CO, USA（国際学会）
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改変
３．学会等名 第35回日本骨代謝学会学術集会（福岡県福岡市）
４．発表年 2017年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

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