

Title	左右対称性の骨格が形成される細胞機構の理解に向けて
Sub Title	Understanding of the cellular mechanisms that form the symmetric skeleton
Author	松尾, 光一(Matsuo, Koichi) 河合, 克宏(Kawaai, Katsuhiko) 黒田, 有希子(Kuroda, Yukiko) 神崎, 晶(Kanzaki, Sho)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	動物の骨格は概ね左右対称に形成され、歩行や走行などの運動を効率化している。左右対称性骨格の基盤となる、1) 骨芽細胞の「細胞キラリティ」(互いに鏡像の右回り型や左回り型の細胞のこと)と2) 「トランスペアリング」(皮質骨を挟んで破骨細胞と骨芽細胞が向かい合って皮質骨の形態変化を起こすこと)の解明を進めた。細胞培養による「細胞キラリティ」の定量解析法を開発し(論文投稿中)、マウスの骨微細構造との関係性を追究した。骨内膜に骨形成が起る「内形成性」と骨外膜に骨形成が起る「外形成性」の2方向のトランスペアリングが存在することを示し、論文発表した(Kurodaら, Development, 2024)。 Animal skeletons are generally symmetrically formed to facilitate efficient locomotion, such as walking and running. We have been working to elucidate 1) "cellular chirality" (clockwise or counterclockwise cells that are mirror images of each other) of osteoblasts, and 2) "trans-pairing" (osteoclasts and osteoblasts facing each other across cortical bone, causing morphological changes in cortical bone), which are the basis of the symmetrical skeleton. We developed a method for quantitative analysis of "cellular chirality" by cell culture (Weng et al, manuscript submitted) and pursued its relationship to bone microstructure in mice. We demonstrated two directions of trans-pairing: "endo-forming" or bone formation in the endosteum and "peri-forming" or bone formation in the periosteum of bone. We published these results with potential morphological and cellular mechanisms (Kuroda et al., Development, 2024).
Notes	研究種目: 基盤研究 (B) (一般) 研究期間: 2021 ~ 2024 課題番号: 21H03060・ 23K21467 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_23K21467seika

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.

令和 7 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21H03060・23K21467

研究課題名（和文）左右対称性の骨格が形成される細胞機構の理解に向けて

研究課題名（英文）Understanding of the cellular mechanisms that form the symmetric skeleton

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） 13,400,000 円

研究成果の概要（和文）：動物の骨格は概ね左右対称に形成され、歩行や走行などの運動を効率化している。左右対称性骨格の基盤となる、1）骨芽細胞の「細胞キラリティ」（互いに鏡像の右回り型や左回り型の細胞のこと）と2）「トランスペアリング」（皮質骨を挟んで破骨細胞と骨芽細胞が向かい合って皮質骨の形態変化を起こすこと）の解明を進めた。細胞培養による「細胞キラリティ」の定量解析法を開発し（論文投稿中）、マウスの骨微細構造との関係性を追究した。骨内膜に骨形成が起こる「内形成性」と骨外膜に骨形成が起こる「外形成性」の2方向のトランスペアリングが存在することを示し、論文発表した（Kurodaら, Development, 2024）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

左右対称な骨格は、哺乳動物や脊椎動物に広く認められる。本研究で解析した「細胞キラリティ」がもし、左右の骨格で鏡像であったならば、骨格の左右対称性は細胞レベルで理解できたであろう。しかし、実際のところは、細胞の種類で細胞キラリティが決まっているようであり、個々の細胞キラリティだけでは左右の骨格の対称性を理解できないことが明らかになってきた。つまり、「トランスペアリング」を含む、より高次の、細胞よりも大きなスケールで、骨格の左右対称性の形成が制御されていると考えられる。動物の左右対称性骨格は、左右非対称な要素（細胞や微小構造）から成り立っているという新たな視点に到達した。

研究成果の概要（英文）：Animal skeletons are generally symmetrically formed to facilitate efficient locomotion, such as walking and running. We have been working to elucidate 1) “cellular chirality” (clockwise or counterclockwise cells that are mirror images of each other) of osteoblasts, and 2) “trans-pairing” (osteoclasts and osteoblasts facing each other across cortical bone, causing morphological changes in cortical bone), which are the basis of the symmetrical skeleton. We developed a method for quantitative analysis of “cellular chirality” by cell culture (Weng et al, manuscript submitted) and pursued its relationship to bone microstructure in mice. We demonstrated two directions of trans-pairing: “endo-forming” or bone formation in the endosteum and “peri-forming” or bone formation in the periosteum of bone. We published these results with potential morphological and cellular mechanisms (Kuroda et al., Development, 2024).

研究分野：骨代謝学

キーワード：細胞キラリティ 左右対称 左右相称 骨芽細胞 破骨細胞 トランスペアリング

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格は高度な左右対称性を示す。長管骨の骨幹部は、円筒形に近い軟骨原基が内軟骨性骨化の過程を経て骨化した後、円形の断面が様々な形に変容して成長し、左右対称性に稜や縁、粗面などができる。膜性骨化で形成される頭蓋骨も正中面を境に左右対称性に形成されて成長する。骨の高度な左右対称性の形態形成メカニズムを理解することは、骨形態異常の外科的な修復や、骨・軟骨の再生医療の基盤となりうる。さらに、左右対称性は、多くの生物に普遍的な特徴であり、骨の解析を通じて、左右対称性の形態形成の細胞機構は何かという根源的な「問い」に答えを与えることができるかもしれないと考えられた。

2. 研究の目的

「骨が左右対称性に形作られる形態形成の細胞機構は何か」に答えるために、軟骨原基を形成して骨化する骨格パターン形成の段階と、骨化した骨が成長しながら、その形が改変していく、骨の変容成長の段階に分けて考える。骨格パターン形成では、胎児期に、左右対称性の大きな骨格が形成される。それに対し骨の変容成長では、胎児期や生後に、筋肉などの骨周囲の臓器・組織の成長と同調して一体となって、それぞれの骨に特徴的な形状を獲得していく。これら二つの段階の骨形態形成の細胞機構を明らかにするために、左右対称性の骨格パターン形成を説明する「細胞キラリティ仮説」(軟骨細胞や骨芽細胞には、鏡像の右回り細胞と左回り細胞が存在して、左右対称の骨格を形成している)と、パターン形成後の骨の左右対称性の変容成長を説明する「トランスペアリング仮説」(皮質骨を挟んだ破骨細胞と骨芽細胞の対合メカニズムが存在して、成長過程で周囲組織の形態にตอบสนองし、骨が左右対称性に変容しながら成長する)を証明することを本研究の目的とした。

(1)「細胞キラリティ仮説」: 骨は、大きな大腿骨から小さな耳小骨まで左右対称である。一方、生体を構成する分子のレベルでは、完全な左右対称性はあり得ない。DNA の二重らせん構造や、タンパク質を構成する α ヘリックス、アクチン線維はどれも右らせん構造をとっており、分子レベルで左右対称な高次構造は作れない(右らせんの鏡像は左らせんであるから)。本研究では、当初、骨格を形成する軟骨細胞や骨芽細胞のレベルで、左右対称な構造をしていることを想定し、正中面(矢状面)の左右で、骨格を形成する細胞に鏡像関係があるという細胞キラリティ仮説を立てた。左右相称動物の基本構造と言える骨格の左右対称性に取り組み、細胞レベルのキラリティを骨格の形作りと関連付けるために、右側の骨格を形成する細胞と、左側の骨格を形成する細胞とは左右対称である可能性を追究した。

(2)「トランスペアリング仮説」: 申請時まで、破骨細胞と骨芽細胞の関係が相互依存的であることが明らかになっていた。破骨細胞の分化に骨芽細胞が必要であることを示す「共存培養系」が確立され、骨芽細胞が発現する、破骨細胞分化に必須なサイトカイン RANKL が発見された。逆に、骨芽細胞の活性化には破骨細胞が必要であり、骨吸収の後に、骨芽細胞が骨吸収窩を埋め戻す「カップリング」機構が解析された。破骨細胞に由来するカップリング因子の解明が進み、当研究室が明らかにしたリガンド ephrin-受容体 Eph (Zhao et al, 2006) を含め、様々な分子が骨芽細胞の活性化に寄与していることが示されていた。それまで知られていた、破骨細胞と骨芽細胞の相互作用は、骨の同一面(シス)におけるものであり、相互作用の結果も同一の骨表面に起こる。骨リモデリングにおけるカップリングは、骨の形態を維持するメカニズムであり、骨の形づくりの推進力とはならない。RANKL の発現は、骨吸収面を生み出すので、骨を削る機構の一端であるものの、RANKL 発現部位の空間的な制御の理解は不十分である。さらに、吸収窩以外の骨形成面についても、荷重のかかる部位で骨形成が促進すること以外、骨形成面の空間的制御は十分に理解されていない。

本研究では、皮質骨の表裏、すなわち骨外膜と骨内膜の間で起こる破骨細胞と骨芽細胞の相互作用に着目した。当研究室では、頭蓋底の骨において「脳組織からの圧迫を受けて骨吸収面が生み出され、その反対面(咽頭側)に骨形成面が作られる」ことを見出しており (Edamoto et al, 2019)、少なくともマウスでは、四肢の長管骨でも成長中の骨の表裏にそれぞれ、破骨細胞と骨芽細胞が広がり、成長に伴う骨形態の改変が行われる部位があることが分かった。この「トランスペアリング」を、骨の変容成長における左右対称性構築メカニズムと捉えて詳細な解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)細胞キラリティの検出 細胞のキラリティを検出する技術として、ポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いたマイクロプリンティングにより、ファイブロンネクチンをスタンプし、その上でコンフルエントまで培養した細胞がどのように配列するかによって、「右回り(時計回り)細胞」と「左回り(反時計回り)細胞」とに分類した。発生時期を変えて、新生仔マウスの左右の頭蓋骨などから細胞を調製し、左右を対比させながら、細胞キラリティを検出した。骨格の左右と細胞キラリティの関係を特定し、3Dの骨形態形成との関係を解明した。

(2) PDMS スタンプによるマイクロプリンティングの代替となる、ハイスループットなマイクロパターン作成方法である「テープ法」を開発し、細胞キラリティ判定実験の再現性と効率の向上を行った。

(3). 細胞キラリティによる骨格形成の3D 解明

細胞レベルの3D イメージングの手法を用いて、左右対称性の骨格形成と細胞キラリティの関係を生体内で解析した。X 線位相トモグラフィ（東北大学多元物質科学研究所 百生敦研究室との共同研究）を駆使して、骨細胞の空間的配置を解析して、細胞キラリティの生体内での存在を観察するとともに、細胞キラリティが実際に、骨格の左右対称性の形態形成の基盤になっているかどうか検討した。

(4) 破骨細胞と骨芽細胞の可視化による組織学および立体的解析

長管骨は円柱状の軟骨原基として胎児期に形成され内軟骨性骨化を経て、長軸方向と骨外膜方向に成長する。マウス下肢の骨の横断面（輪切り）の連続切片を作製し、破骨細胞、骨芽細胞、骨吸収面、骨形成面を免疫組織化学やレポーターマウスを駆使して可視化し、トランスペアリングの現象を記述した。さらに、tomato-lectin を静脈注射することにより、血管網の可視化を行った。ライトシート顕微鏡（Z1, Carl Zeiss）を用いて、透明化したサンプルの3D 撮像を行い解析した。

(5) 筋肉などの骨周辺臓器の解析

マウス下肢をリンタングステン酸で染色し、X 線マイクロトモグラフィで骨周囲の筋肉を、骨の成長過程で解析し、筋肉による骨の圧迫部位を明らかにした。

(6) 筋肉の圧迫による RANKL 発現の解析

破骨細胞分化誘導の時空間制御を明らかにするために、マウス下肢の横断面の組織学切片を用いて、RANKL 遺伝子を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検出した。RNAscope 法により検出感度を向上させることで、吸収面を生じる RANKL 発現を起こす細胞が骨外膜に存在することを明らかにした（骨細胞ではなかった）。筋肉による圧迫というメカニカルストレスを想定して RANKL 発現部位との対応を検討した。

(7) 筋肉の萎縮の骨変容成長への影響の解析

筋肉の形態が骨の形態を変容させていれば、片側の筋肉を萎縮させると、骨格の左右対称性が乱れるはずである。これを実験的に示すために、生後2週齢のマウスの大腿骨レベルで右の坐骨神経切除術を施行し、生後4週齢のマウスで、筋肉と骨の形態を解析した。骨の左右対称性が、筋肉などの周囲組織の左右対称性に同調して受容的に生じていることを示した。

(8) 骨を挟んで骨形成面の裏側に骨吸収面が生じるメカニズムの解析

皮質骨を貫くかたちで毛細血管が骨外膜と骨内膜をつないでいることが知られている。骨内外でおこるトランスペアリングを仲介するメカニズムとして、皮質骨内血管のチャンネルが機能していると想定される。皮質骨内管腔構造の3D 可視化を行った。破骨細胞が反対側の骨表面の骨形成を惹起するメカニズムとして、骨外膜の骨芽細胞前駆細胞（Gli1 陽性）が管腔構造を通じて骨髓側に移動して、骨内膜形成性のトランスペアリングを起こすことを示した。

(9) トランスペアリングの方向転換の解析

骨外膜に骨形成面、骨内膜に骨吸収面ができるトランスペアリング状態が、逆転して骨内膜に骨形成面、骨外膜に骨吸収面のできる成長モードに転換することがある。この方向転換が頻繁に起こることを組織学的に示した。

(10) nano-CT で皮質骨貫通の管腔構造を撮像し、定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) 「細胞キラリティ仮説」：400 個以上の高密度の2次元のマイクロパターンを35 mm ディッシュ中に作成するための「テープ法」を開発し、細胞集団の配列から細胞キラリティを定量的に判定する実験系を確立し、筋芽細胞や骨芽細胞の細胞株でテープ法の最適化を行った（Weng Q et al, 論文投稿中）。初代培養細胞へ応用し、細胞レベルの「ホモキラリティ」を解析した。新生仔マウス頭蓋骨由来の初代骨芽細胞の細胞キラリティを解析結果から、左右の頭蓋骨由来の骨芽細胞は、由来に関わらず左回りであった。この結果から、細胞レベルの「ホモキラリティ」（鏡像と重ならない）の概念に到達した（図1）。また、骨芽細胞のホモキラリティによると考えられる、微細な非対称構造を探索し、いくつかの候補を得た。

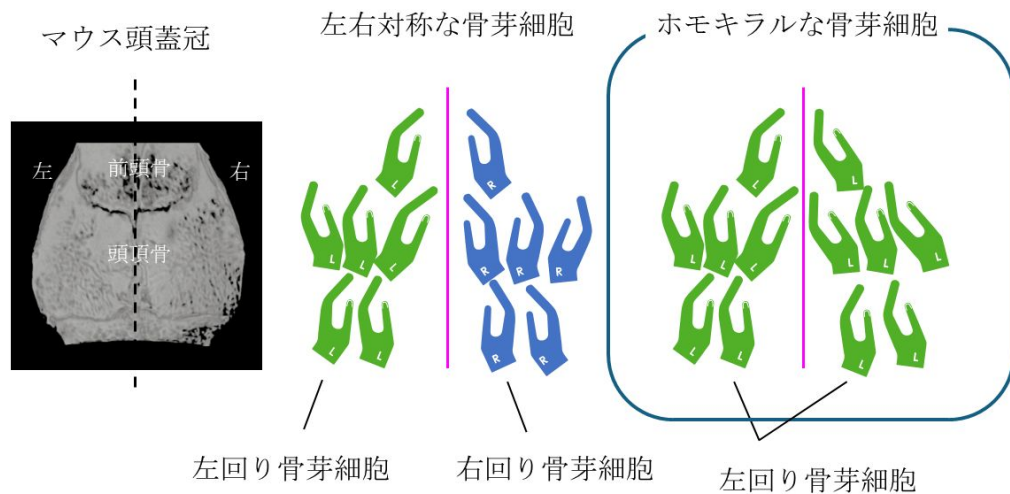


図1. 左右対称な骨芽細胞による左右対称性構築という「細胞キラリティ仮説」とホモキラルな骨芽細胞の概念図

(2)「トランスペアリング仮説」：骨の変容成長の段階に関し、皮質骨が周囲の臓器の変化に応じて吸収され、対面の皮質骨が形成される「内形成性トランスペアリング」が起きるメカニズムを解明した。鏡像的な骨周囲環境で骨格が左右対称になるメカニズムとして、破骨細胞と骨芽細胞が皮質骨を挟んで、骨内膜に骨形成が起こる「内形成性」と骨外膜に骨形成が起こる「外形成性」の2方向のトランスペアリングが存在することを示した。具体的には、マウスの腓骨が筋肉に圧迫されている部分は、皮質骨が骨内膜側へ、その反対側の皮質骨は骨外膜側へドリフトして骨が変容成長することが分かり、「内形成性」の皮質骨には多くの管腔構造が存在し、骨外膜にある骨芽細胞の前駆細胞が、骨内膜側の骨形成部位へ移動する通路として機能していると考えられた。これらの結果を、腓骨を研究対象とした論文として発表した (Kuroda Y et al, Development, 2024)。さらに、腓骨以外の肋骨などへ対象を移して解析を進めたところ、トランスペアリングの一般性が確認でき、またその新たな制御機構が解明できた (Kuroda et al, 未発表)。

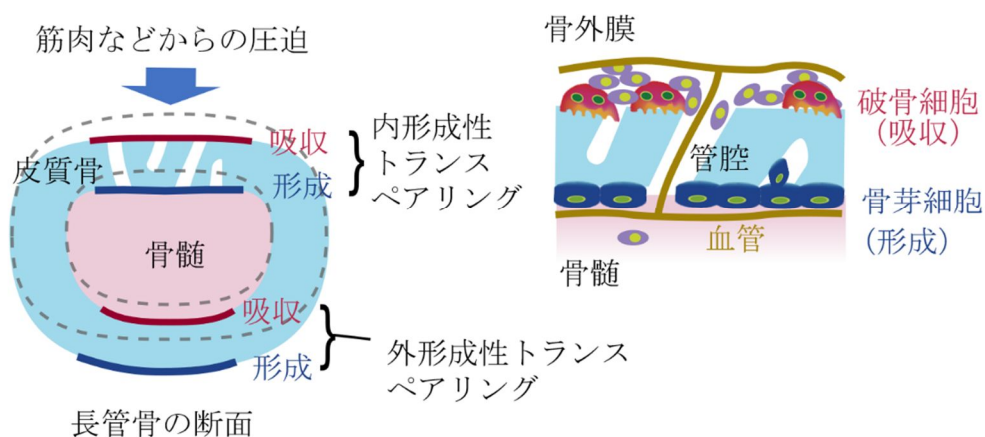


図2. トランスペアリングによる形態変化は左右対称性に骨を変形させるメカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuroda Yukiko, Yoda Masaki, Kawaai Katsuhiro, Tatenuma Motoharu, Mizoguchi Toshihide, Ito Shinichirou, Kasahara Masataka, Wu Yanlin, Takano Hidekazu, Momose Atsushi, Matsuo Koichi	4. 巻 151
2. 論文標題 Developing long bones respond to surrounding tissues by trans-pairing of periosteal osteoclasts and endocortical osteoblasts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Development	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） 10.1242/dev.202194	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒田有希子, 河合克宏, 依田昌樹, 館沼元春, 百生敦, 松尾光一
2. 発表標題 皮質骨を挟んで向かい合った骨芽細胞と破骨細胞の「トランスペアリング」により長管骨は周囲の臓器形態に適合する
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松尾光一, 宇佐美心手, 田口育武, 宮本諭, 黒田有希子, 野路しのぶ, 百生敦, 吉田光輝, 尾上弘晃, 河合克宏
2. 発表標題 骨芽細胞キラリティを反映する頭蓋冠と腓骨の微細形態
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松尾光一, 宇佐美心手, 田口育武, 宮本諭, 河合克宏, 黒田有希子, 吉田光輝, 尾上弘晃
2. 発表標題 ホモキラルな骨芽細胞が左右対称な骨格を形作る
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒田有希子、河合克宏、依田昌樹、百生敦、松尾光一
2. 発表標題 筋肉の発達に応答した皮質骨形態変化は「内向きトランスベアリング」によって生み出される
3. 学会等名 第42回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾光一、黒田有希子、河合克宏、依田昌樹、百生敦
2. 発表標題 破骨細胞と骨芽細胞の内向きトランスベアリングで長管骨は周囲の形状変化に協調応答する
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021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/ 医学研究科委員 研究者プロフィール https://www.med.keio.ac.jp/research/faculty/9-67710/
--

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	河合 克宏 (KAWAAI Katsuhiko) (00553653)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	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）・講師 (32612)	
研究分担者	神崎 晶 (KANZAKI Sho) (50286556)	独立行政法人国立病院機構（東京医療センター臨床研究センター）・聴覚・平衡覚研究部・室長 (82643)	

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
---------	---------