

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09820

研究課題名（和文）血管発生・発達を基軸として軟骨吸収細胞セプトクラストのライフサイクルを探る

研究課題名（英文）The lifecycle of septoclasts in vascular development and growth

研究代表者

天野 修（Amano, Osamu）

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：60193025

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では成獣マウスの脛骨近位骨端板組織でセプトクラストはインテグリン 2を介して軟骨基質にも接着し、基質吸収の足場を形成していることが示唆された。また、セプトクラストと隣接する血管内皮細胞の基底膜が不連続であることがわかり、セプトクラストによる軟骨基質貪食と毛細血管伸長が連動していることが強く示唆された。胎児マウスのメッケル軟骨吸収過程においてもセプトクラストが関与していることが明らかになり、頭蓋底と顎関節においても解析を進行している。また、セルソーティングにより骨端板組織よりペリサイトとセプトクラストの単離と遺伝子変動の解析を進行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は国際学術雑誌2編に公表された。本研究では、軟骨内骨化とメッケル軟骨消失過程における軟骨吸収細胞septoclastと血管内皮細胞と軟骨基質との関連を明らかにした。この結果は、血管網の発達や変化が発生や生理的な変化のみならず、組織再生にも応用されうる重要な知見の提供に寄与できる。また、セルソーティングによりセプトクラストを単離し培養する実験が進行中で、ペリサイトからセプトクラストの分化機構を明らかにできれば、血管系が重要な骨発生や骨吸収との調節機構の解明にも伸展でき、近年特に知見が増加している脳血管のペリサイトについて多くの情報を共有できる。

研究成果の概要（英文）：The present study suggests that septoclasts also adhere to cartilage matrix via integrin 2 and form a scaffold for substrate resorption in the proximal tibial epiphyseal plate tissue of adult mice. In addition, the basement membrane of endothelial cells adjacent to septoclasts was found to be discontinuous, strongly suggesting that phagocytosis of cartilage matrix by septoclasts is linked to capillary elongation. The involvement of septoclasts in the process of Meckel's cartilage resorption in mouse embryo was also revealed, and analysis is ongoing in the cranial base and the TMJ. Isolation of pericytes and septoclasts from epiphyseal plate using cell sorting and analysis of genetic variation are also in progress.

研究分野：口腔解剖学 口腔組織発生学

キーワード：セプトクラスト 血管内皮細胞 表皮型脂肪酸結合蛋白 軟骨内骨化 マウス

1. 研究開始当初の背景

軟骨内骨化の過程で生じる軟骨吸収では、多核の破軟骨細胞に加えて、非石灰化軟骨基質を吸収する単核のセプトクラストが重要な役割を果たすことが分かってきた (Lee et al. 1995, Nakamura and Ozawa 1996)

セプトクラストは表皮型脂肪酸結合タンパク (E-FABP/FABP5) を特異的に発現し、胎生期では骨外の血管周皮細胞(ペリサイト)に由来することを明らかにした (Bando et al. 2014, 2018)。また、E-FABP はレチノイン酸とも結合し、セプトクラストは骨端板に含まれている脂肪酸やレチノイン酸によって増殖や細胞死が調節されていることも明らかにした (Bando et al. 2017)。

一方、網膜血管形成にはレチノイン酸が VEGF を介して関与していることや、軟骨内骨化の場には軟骨細胞が分泌した VEGF が豊富に存在することから、セプトクラストの分化や軟骨吸収部への移動・分布、その結果としての軟骨吸収能は血管形成と深く関わっていると考えられる。

2. 研究の目的

本課題では、「セプトクラストの発生・分化、移動、軟骨吸収は血管系の発生・発達と密接に関連する」との仮説を検証し、セプトクラストの血管と密接したライフサイクルを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) セプトクラストと血管系の形態学的関係の解析

マウスの骨端板、メッケル軟骨、下顎頭軟骨の発生・成長過程において、E-FABP をマーカーにセプトクラストと毛細血管のペリサイト (PDGFR を指標) の位置関係を、発生段階を詳細に追って免疫組織化学的に明らかにする。

(2) セプトクラストの分化・増殖因子の解明

培養したペリサイトについて、脂肪酸やレチノイン酸の影響を解析し、セプトクラストへの分化がみられるかどうかを観察する。セプトクラストを直接分離することは難しいので、マウス胎仔脛骨原基や下顎組織からセプトクラストを含むペリサイトを PDGFR を標識としてセルソーターで分離・培養し、E-FABP 陽性群と陰性群の差を比較・解析する。

(3) 骨端板形成後のセプトクラスト増殖機構の解明

脂肪酸欠乏食飼育マウスにおける、骨端板周囲の毛細血管、ペリサイト、セプトクラストの配置、サイズ、形態、数の変化を解析する。

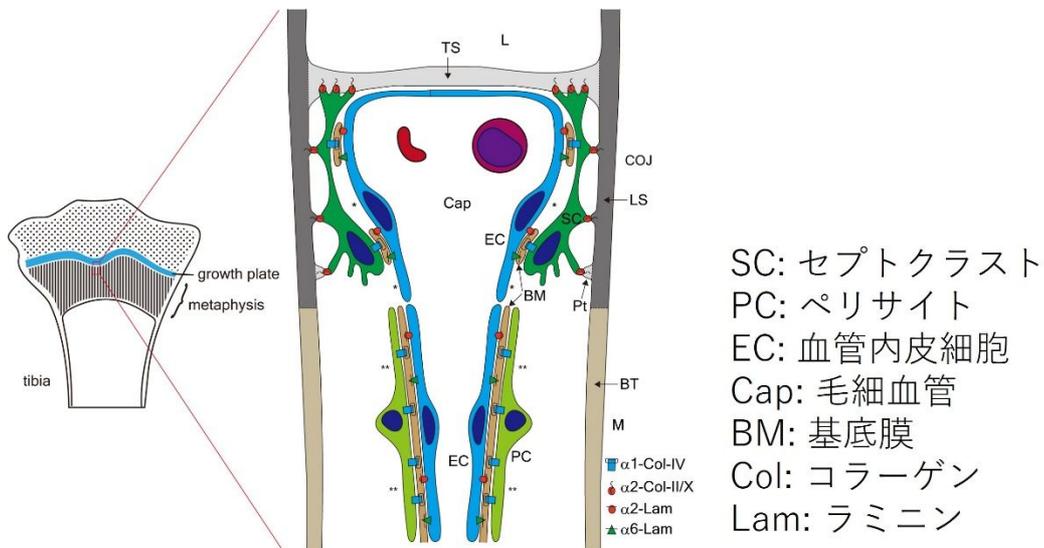
4. 研究成果

(1) 骨端板セプトクラストと血管系の形態学的関係の解析

成獣マウスの脛骨近位骨端板組織に対し免疫組織化学的検討を行い、毛細血管内皮細胞とセプトクラストまたはペリサイトの間の位置関係を詳細に調べた。

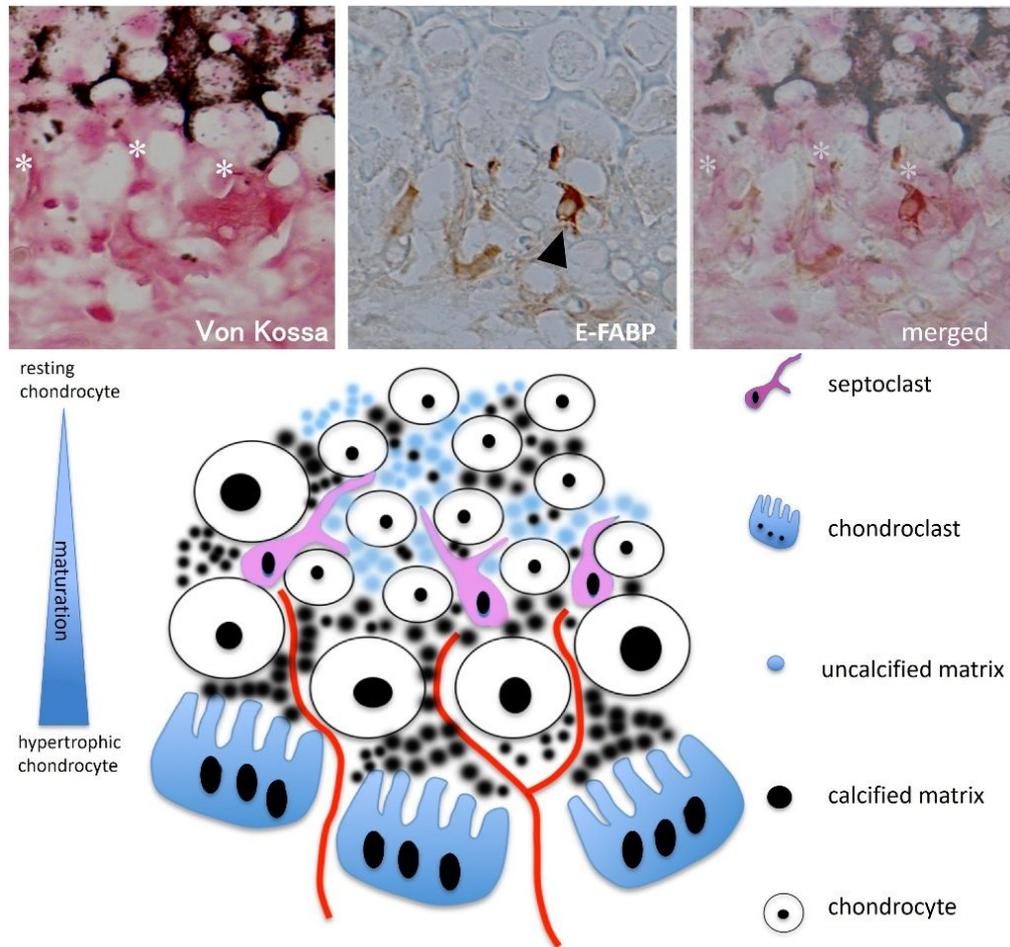
その結果、骨端板骨軟骨境界部でセプトクラストは血管内皮細胞に不連続な基底膜を介して隣接していたが、細胞接着性タンパクであるインテグリン 2 を介して軟骨基質にも接着し、基質吸収の足場を形成していることが示唆された。脛骨近位骨端板の骨軟骨境界部では、セプトクラストと血管内皮細胞の間に基底膜は断裂して不連続であるのに対し、直下のペリサイト(血管周皮細胞)と血管内皮細胞の間には連続した基底膜が存在することがわかった。

セプトクラストの基底膜の不連続性は同部に特異的で、セプトクラストにより開放された軟骨小腔への毛細血管の進入との関連が強く示唆され、セプトクラストによる軟骨基質貪食と毛細血管伸長が連動していることが強く示唆された。以上の成果を Bando et al. J Anat. (2023) 242:831-845. に公表した。



(2) メッケル軟骨セプトクラスト

メッケル軟骨消失過程においてもセプトクラスト(E-FABP を指標)、ペリサイト (PDGFR を指標)、血管内皮細胞(エンドムチンを指標)、破骨細胞(TRAP を指標)、石灰化軟骨基質(von Kossa 染色を指標)の形態と位置関係を詳細に調べ、侵入する血管の先端でセプトクラストがメッケル軟骨吸収面に存在する未石灰化軟骨基質を吸収し、そのやや後方で破骨細胞が石灰化軟骨基質を吸収する役割分担をしていることが明らかとなった。以上の成果を Sakashita et al. Histochem. Cell Biol. (2022) 157:169-580 に公表した。



(3) セプトクラストの分化・増殖因子の解明

骨端板組織から、セプトクラストとペリサイトが共に platelet-derived growth factor receptor- (PDGFR) を発現し、セプトクラストのみがさらにインテグリン 2 を発現(ペリサイトはインテグリン 2 陰性)していることを応用し、セルソーティングにより PDGFR 陽性細胞からインテグリン 2 共陽細胞をほぼ単離できた。単離した細胞はセプトクラストのマーカーの epidermal type-fatty acid binding protein (E-FABP) と cathepsin B の発現が特に強いことも分った。現在、同細胞に特異的な他の遺伝子変動について解析中である。

(4) 骨端板形成後のセプトクラスト増殖機構の解明

マウスでは、成長期に軟骨内骨が急速に進行して閉鎖する頭蓋底軟骨と、二次軟骨である顎関節の下顎頭軟骨について免疫組織化学的に調べ、両部にもセプトクラストが存在することが分った。しかし、骨端板と比較してその細胞形態や分布様式・密度には特異性が認められたので、詳細の解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Onozawa G, Nagasaka A, Bando Y, Sakiyama K, Yamamoto N, Amano O	4. 巻 Online
2. 論文標題 Specific localization of fibroblasts at the intercalated duct in the major salivary glands of rats	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2024.02.004	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 Nagasaka A, Sakiyama K, Bando Y, Onozawa G, Amano O	4. 巻 65
2. 論文標題 Live imaging observation of elevation of the anterior palatal shelf in mouse embryos	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 224 ~ 229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12851	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 Nagasaka A, Sakiyama K, Bando Y, Yamamoto M, Abe S, Amano O	4. 巻 23
2. 論文標題 Spatiotemporal gene expression regions along the anterior-posterior axis in mouse embryos before and after palatal elevation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5160 ~ 5160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23095160	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 Bando Y, Nagasaka A, Onozawa G, Sakiyama K, Owada Y, Amano O	4. 巻 242
2. 論文標題 Integrin expression and extracellular matrix adhesion of septoclasts, pericytes, and endothelial cells at the chondro osseous junction and the metaphysis of the proximal tibia in young mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 831 ~ 845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/joa.13820	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 Bando Y, Sakashita H, Nagasaka A, Sakiyama K, Tokuda N, Iseki S, Owada Y, Amano O	4. 巻 64
2. 論文標題 Septoclasts expressing epidermal fatty acid-binding protein (E-FABP, FABP5) in endochondral ossification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 18-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.12.003	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 Sakashita H, Bando Y, Nagasaka A, Sakiyama K, Onozawa G, Taira F, Ogasawara Y, Owada Y, Sakashita HA, Amano O	4. 巻 in press
2. 論文標題 Spatial and chronological localization of septoclasts in the mouse Meckel's cartilage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-022-02085-1	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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 天野 修、坂東 康彦、長坂 新、坂下 英、崎山 浩司
2. 発表標題 口腔顎顔面発生における組織消失の形態と意義
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂東 康彦、小野澤 豪、鈴木 海登、長坂 新、崎山 浩司、大和田 祐二、天野 修
2. 発表標題 骨端板軟骨吸収におけるseptoclast、ペリサイト、血管内皮細胞と細胞外マトリックスの接着とその意義
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂東 康彦、長坂 新、崎山 浩司、天野 修
2. 発表標題 マウス骨端板における septoclast、ペリサイト、血管内皮細胞のインテグリンの発現と細胞外マトリックスの接着
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 天野 修, 小野澤 豪, 平良 芙蓉子, 長坂 新, 坂東 康彦, 鈴木 海登, 崎山 浩司
2. 発表標題 唾液腺筋上皮細胞の分布と形態の機能的意
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野澤 豪、鈴木 海登、長坂 新、坂東 康彦、天野 修
2. 発表標題 ラット大唾液腺介在部導管の線維芽細胞 薄い線維層による鞘状構造物、
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂東 康彦、小野澤 豪、長坂 新、崎山 浩司、天野 修
2. 発表標題 表皮型脂肪酸結合タンパク (E-FABP/FABP5) を発現する非石灰化軟骨吸収細胞septoclast
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野澤 豪, 長坂 新, 坂東 康彦, 天野 修
2. 発表標題 ラット大唾液腺介在部導管周囲における線維芽細胞の特異的配列
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長坂 新, 崎山 浩司, 坂東 康彦, 小野澤 豪, 天野 修
2. 発表標題 マウス胎仔を用いた口蓋突起挙上に関わる遺伝子発現領域の時空間的变化の解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂東 康彦, 小野澤 豪, 長坂 新, 崎山 浩司, 大和田 祐二, 天野 修
2. 発表標題 マウス骨端板のseptoclastにおけるインテグリン 2の局在と細胞外基質との関連
3. 学会等名 日本解剖学会第110回関東支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂東 康彦, 小野澤 豪, 長坂 新, 崎山 浩司, 徳田 信子, 大和田 祐二, 天野 修
2. 発表標題 表皮型脂肪酸結合タンパク (E-FABP/FABP5) を発現するseptoclastの骨端板軟骨吸収における役割
3. 学会等名 第128日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂東 康彦, 小野澤 豪, 長坂 新, 崎山 浩司, 大和田 祐二, 天野 修
2. 発表標題 マウス成長板のseptoclastにおけるインテグリン 2の局在
3. 学会等名 日本解剖学会第109回関東支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂東 康彦, 小野澤 豪, 長坂 新, 崎山 浩司, 天野 修
2. 発表標題 マウス脛骨骨端板軟骨のseptoclastにおける integrin 2の局在
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂東 康彦, 小野澤 豪, 長坂 新, 崎山 浩司, 大和田 祐二, 天野 修
2. 発表標題 septoclastにおける integrin 2の局在と軟骨基質との関連
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021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
研究協力者	小野澤 豪 (Onozawa Go)	明海大学・歯学部・助教	

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