

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792042

研究課題名(和文)長幹骨の内軟骨性骨化におけるレチノイン酸の機能解明

研究課題名(英文)Role of Cyp26b1 in endochondral bone formation

研究代表者

峯岸 芳樹(Minegishi, Yoshiki)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10467566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：レチノイン酸は胚発生において重要な機能を担う。その分解酵素であるCYP26はレチノイン酸濃度勾配を胚の各組織に生じさせ、様々な器官のパターニングを制御している。しかしながら生後の組織レチノイン酸濃度分布については明らかにされていない。

我々はCyp26b1が特異的に軟骨細胞で欠失しているCyp26b1 cKOマウスの解析から、増殖軟骨細胞の分裂が減少することで成長板が早期閉鎖を起こすことを明らかにした。またCyp26b1 cKOマウスにビタミンA欠乏食を与えることで表現型が軽減することを確認した。これらより生後の成長板増殖軟骨細胞においてレチノイン酸が重要な役割をはたしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Retinoic acid (RA) plays important roles in embryonic development. CYP26 enzymes, which degrade RA, have specific expression patterns and produce a RA gradient. RA gradient regulates the patterning of the various structures in embryos. However, it has not been addressed whether a RA gradient also exists in organs after birth.

We found localized RA activities within the growth plate in juvenile mice. Cyp26b1 was specifically expressed in proliferative chondrocytes of the growth plate cartilage. The mice lacking Cyp26b1 specifically in chondrocytes (Cyp26b1 cKO) showed retardation of bone growth in the juvenile stage. Their growth plate cartilage showed decreased proliferation rates of proliferative chondrocytes. Feeding the Cyp26b1 cKO mice a vitamin A-deficient diet partially reversed these abnormalities. These results suggest that the RA distribution within the growth plate is responsible for the normal function of the growth plate and growing bones in juveniles.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：レチノイン酸 軟骨細胞 内軟骨性骨化

1. 研究開始当初の背景

ビタミンAの活性型代謝産物であるレチノイン酸(RA)は細胞分裂、ホメオスタシス、パターンニングなど多くの現象において重要な役割を果たしている。特に胚発生の段階では四肢、心肺、皮膚など多数の器官のパターンニングに関与していることが知られている。同時にRAは催奇形性因子としても知られている。RAの分解酵素であるCyp26b1のノックアウト(KO)マウスは組織においてRA濃度が高値となり、四肢の欠損や短縮を認める。しかしながらCyp26b1 KOマウスは四肢発生の初期段階で形態異常を認めてしまうため、正常の四肢発生において胚後期段階及び出生後のRAが内軟骨性骨化に及ぼす影響を解析することはできなかった。

2. 研究の目的

(1)Cyp26b1 flox マウスと増殖軟骨細胞特異的に Cre リコンビナーゼを産生する11Enh-Cre マウスを交配し、増殖軟骨細胞でCyp26b1 を欠失させたCyp26b1 cKO マウスを作製することで、その表現型解析を行い、四肢長管骨の内軟骨性骨化に及ぼすRAの役割について解析する。

(2)成長板軟骨におけるレチノイン酸の濃度勾配の有無を調べることで、in Vivo において軟骨細胞の分化に及ぼすレチノイン酸の作用について解析する。

3. 研究の方法

(1) Cyp26b1 flox/flox マウスと増殖軟骨細胞特異的に Cre リコンビナーゼを産生する11Enh-Cre マウスを交配し、増殖軟骨細胞でCyp26b1 を欠失させたCyp26b1 cKO マウス(Cyp26b1 f/f; 11Ehh-Cre マウス)を作製する。

E14.5、E18.5、P7、P14、P21、P28、P42での表現型を解析する。全身形態を観察するとともに、脛骨近位成長板軟骨を川本法により凍結切片を作成し、顕微鏡下で組織の形態を観察する。

(2)凍結切片を作成した脛骨近位成長板軟骨を上部と下部にわけてレーザーマイクロダイセクション(LMD)によりmRNAを回収し、野生型マウスにおける軟骨関連因子の発現をリアルタイムPCRを行い確認する。

また脛骨近位成長板軟骨で発現するタンパクに関して免疫染色を行う。

(3)表現型の解析はX線写真、組織切片のアルシアンブルー&アリザリンレッド染色、サフラニンO染色を行い、上腕骨、大腿骨、脛骨の表現型解析を野生型マウスとCyp26b1 cKO マウスで行う。

(4)生じた表現型の原因を調べるためBrdU染色を行い、野生型マウスとCyp26b1 cKO マウスで成長板軟骨細胞の細胞分裂を調べる。

(5) Cyp26b1 cKO マウスは軟骨細胞においてレチノイン酸濃度が高度となっていることが考えられるため、親マウスとなるCyp26b1 flox/flox マウスと11Enh-Cre マウスにビタミンA欠乏食を2か月間投与し、出生してくるCyp26b1 cKO マウスがレスキューされるかを確認する。

4. 研究成果

(1) 増殖軟骨細胞で特異的にCyp26b1 が欠失したCyp26b1 cKO マウス(Cyp26b1 f/f; 11Ehh-Cre マウス)を作製し、その表現型を調べた。胎生期(E14.5、E18.5)では野生型と比較して明らかな違いは認めなかった(図1)。

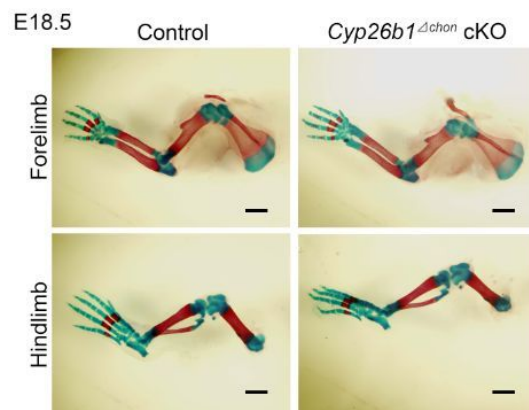


図1 E18.5におけるマウス上下肢

出生直後も明らかな違いは認めなかったが、出生後2週目頃より徐々に相違を認めはじめ、Cyp26b1 cKO マウスでは身長・体重の減少を認めた。それに伴い上腕骨・大腿骨・脛骨は優位をもってCyp26b1 cKO マウスで短縮していた(図2)。

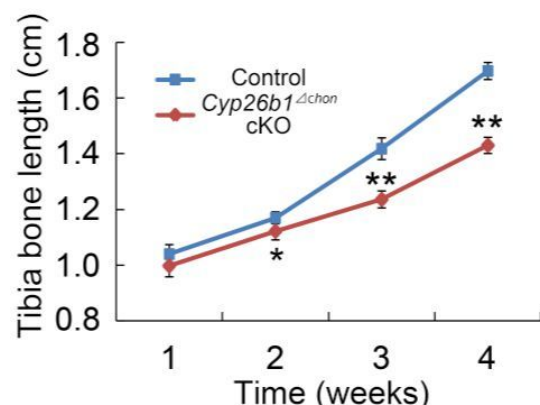


図2 成長に伴う脛骨長の推移

脛骨近位の成長板の組織切片をみると生後2週目では野生型マウスとCyp26b1 cKO マウスでは明らかな違いを認めないが、3週目よりCyp26b1 cKO マウスでは成長板中央部に局限して薄くなっていた。4週目になると中央部では完全に成長板が消失し、成長板の早

期閉鎖を認めた(図 3)。

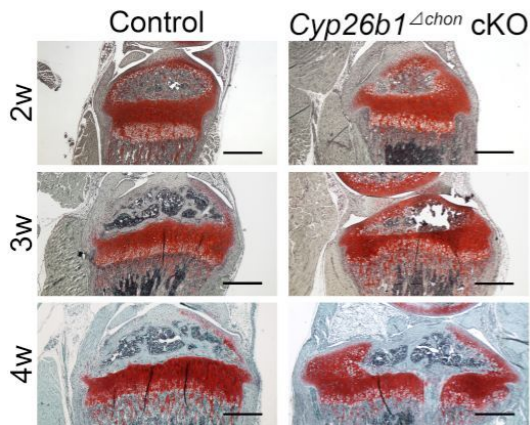


図 3 成長に伴う脛骨近位成長板の形態の変化

(2) Cyp26b1 cKO マウスで認めた成長板の菲薄化は、増殖軟骨細胞層が減少することにより生じており、肥大軟骨細胞層には変化を認めなかった。

成長板の菲薄化が起こる要因を解析するため、形態学的に明らかな変化を未だ認めない生後 1 週の野生型マウスと Cyp26b1 cKO マウスの脛骨近位成長板の BrdU 染色を行ったところ、Cyp26b1 cKO であきらかな染色性の低下を認めた(図 4)。BrdU labeling index では野生型マウスが 48%程度であったのに対して、Cyp26b1 cKO マウスは 29%程度であった。表現型が明らかになる生後 3 週目でも優位に Cyp26b1 cKO マウスで BrdU labeling index の減少を認めた。

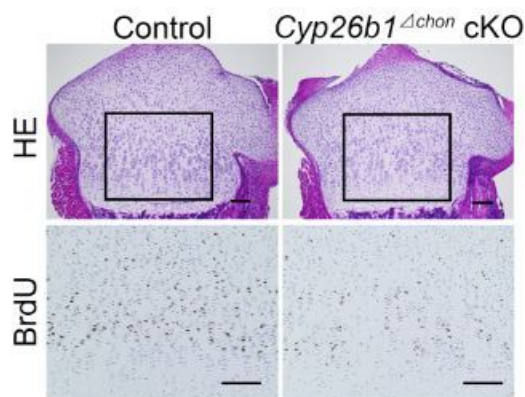


図 4 生後 1 週目における脛骨近位の成長板軟骨の BrdU 染色

(3) 野生型マウスと Cyp26b1 cKO マウスでの CYP26B1 の発現を調べるため免疫染色を行った。正常では CYP26B1 は増殖軟骨細胞に強く発現していることが明らかになった(図 5)。

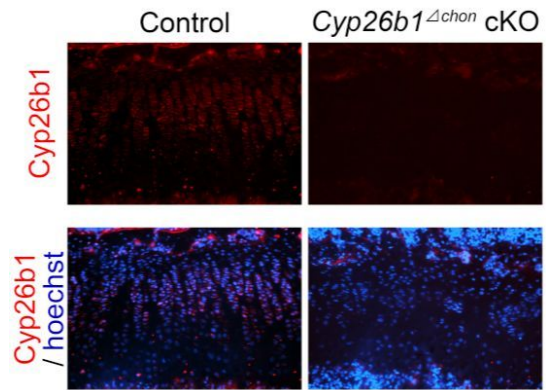


図 5 3 週齢マウスの脛骨近位成長板における CYP26B1 の発現

(4) 成長板の上部(PCZ)と下部(HCZ)にわけて LMD で mRNA を回収し、リアルタイム PCR を行って軟骨マーカーを調べたところ上部で Col2a1 が、下部で Col10a1、MMP13、Runx2 が高かった。

また Cyp26b1 の発現は上部で優位に高かった。

レチノイン酸のレポーターマウスである RARE-LacZ マウスの成長板から同様に mRNA を回収し、リアルタイム PCR でベータガラクトシダーゼを調べたところ成長板の下部で高値であった(図 6)。

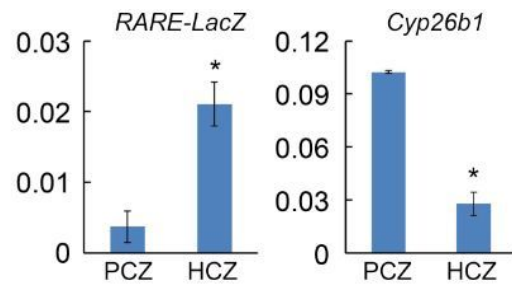


図 6 成長板各部位のリアルタイム PCR

このことより軟骨成長板では Cyp26b1 の発現によりレチノイン酸濃度が制御され、増殖層よりも肥大層でレチノイン酸濃度が高いことが明らかになった。

(5) Cyp26b1 cKO マウスの親マウスとなる Cyp26b1 flox/flox マウスと 11Enh-Cre マウスにビタミン A 欠乏食を 2 か月間投与した後に交配し、Cyp26b1 cKO マウスを作成した。

Cyp26b1 cKO マウスでの高レチノイン酸状態が緩和されたため、成長板が早期閉鎖する表現型は完全ではないが、部分的に救済された。

BrdU 染色し、細胞増殖を調べたところ BrdU labeling index も普通飼食を食べたコントロールと比較して、ビタミン A 欠乏食を食べたマウスでは著明に改善を認めた(図 7)

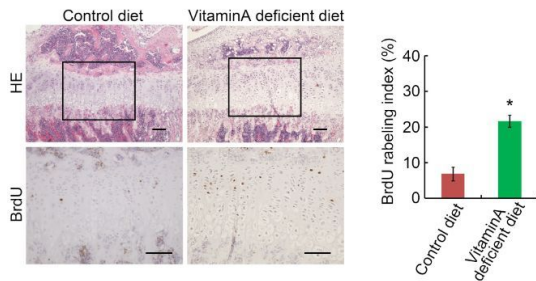


図7 普通餌食とビタミンA欠乏餌食を食った3週齢Cyp26b1 cKOマウスのBrdU染色とlabeling index

これらよりビタミンAはパターンニングが起る胚早期だけでなく、胚の後期や出生後の内軟骨性骨化を規制する重要な因子で有ることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 14 件)

第 22 回形成外科基礎学術集会

2013 年 11 月 7~8 日、新潟

Time-lapse 撮影を用いた

軟骨細胞脱分化過程の観察

峯岸芳樹、細川互、妻木範行

第 14 回運動器科学研究会

2013 年 9 月 13~14 日、東京

Time-lapse observation of

the differentiation process in mouse chondrocytes using

chondrocyte-specific reporters

峯岸芳樹、細川互、妻木範行

5th European Plastic Surgery Research Council

2013 年 8 月 22-25 日、ハンブルク、ドイツ

Role of retinoic acid for endochondral bone formation

Yoshiki Minegishi, Ko Hosokawa, Noriyuki Tsumaki

Cira retreat 2013

2013 年 3 月 13-14 日、大津

Role of Cyp26b1 in endochondral bone formation

Yoshiki Minegishi, Yasuo Sakai, Ko Hosokawa, Hideki Yoshikawa, Noriyuki Tsumaki

The 7th Bone Research Seminar

2013 年 2 月 15~16 日、東京

Role of Cyp26b1 in chondrocyte proliferation and differentiation

Yoshiki Minegishi, Yasuo Sakai, Ko Hosokawa, Hideki Yoshikawa, Noriyuki Tsumaki

第 21 回形成外科基礎学術集会

2012 年 10 月 4~5 日、猪苗代

レチノイン酸は生体内において成長板

増殖軟骨細胞の細胞増殖を抑制する

峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、妻木範行

第 13 回運動器科学研究会

2012 年 9 月 14~15 日、京都

軟骨細胞増殖・分化における

Cyp26b1 の役割

峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、吉川秀樹、妻木範行

第 30 回骨代謝学会

2012 年 7 月 19~21 日、東京

軟骨細胞増殖・分化に及ぼす

Cyp26b1 遺伝子の機能の解析

峯岸芳樹、吉川秀樹、妻木範行

COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES, Bone and Cartilage: from Development to Human Diseases

2012 年 6 月 11~15 日、蘇州、中国

Role of Cyp26b1 in endochondral bone formation

Yoshiki Minegishi, Yasuo Sakai,

Ko Hosokawa, Hideki Yoshikawa,
Noriyuki Tsumaki

第 25 回日本軟骨代謝学会

2012 年 3 月 9～10 日、名古屋
内軟骨性骨化における Cyp26b1 遺伝子の
役割

峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、吉川秀樹、
妻木範行

第 3 回 Orthopedic Research Club

2011 年 10 月 22 日、木更津
レチノイン酸が内軟骨性骨化に及ぼす
機能の検討

峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、吉川秀樹
妻木範行

第 41 回骨・カルシウム代謝研究会

2011 年 10 月 14 日、京都
内軟骨性骨化における Cyp26b1 の
役割の解析

峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、吉川秀樹、
妻木範行

第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会

2011 年 10 月 6～7 日、東京
内軟骨性骨化におけるレチノイン酸
の役割の解析

峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、妻木範行

第 12 回運動器科学研究会

2011 年 9 月 2～3 日、高知
内軟骨性骨化における Cyp26b1 の役割

峯岸芳樹、坂井靖夫、細川互、吉川秀樹、
妻木範行

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯岸 芳樹 (MINEGISHI, Yoshiki)
福井大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 10467566