

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861496

研究課題名(和文) 脱分化軟骨細胞Lineage tracing法開発による軟骨細胞脱分化過程の解析

研究課題名(英文) Analysis of the dedifferentiation process of chondrocytes using Time-lapse observation with new lineage tracing technique

研究代表者

峯岸 芳樹 (Minegishi, Yoshiki)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・助教

研究者番号：10467566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 生体の軟骨組織から採取された軟骨細胞の初代単層培養を行うと線維芽細胞様の細胞が増殖することが知られている。この細胞は軟骨細胞が脱分化することで生じたものと考えられているが、実際その起源は明らかではなかった。

我々はこの軟骨培養時に出現する線維芽細胞様細胞の起源を探求するために脱分化した軟骨細胞を可視化する新規のlineage tracing法を開発した。この手法を用いることで軟骨細胞の脱分化する過程を解析した。また脱分化には細胞増殖は必須ではないことを明らかにした。

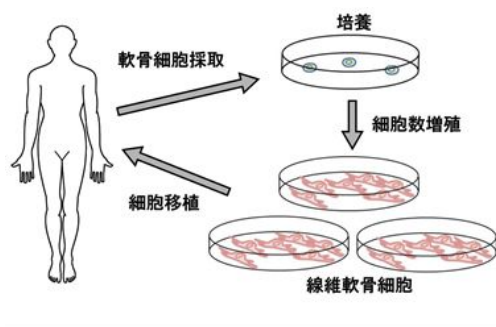
研究成果の概要(英文)：When chondrocytes prepared from cartilage are expanded in monolayer culture, fibroblast-like cells gradually prevail. Although these prevailing fibroblast-like cells are believed to emerge because of the dedifferentiation of chondrocytes, the definite origin of the prevailing fibroblast-like cells has not been determined. We herein examined whether the prevailing non-chondrocytic cells observed after monolayer expansion culture arise from dedifferentiating chondrocytes or are the result of the overgrowth of fibroblasts that are present at the start of the culture. We also evaluated whether chondrocytes dedifferentiate because they proliferate or because they are cultured in monolayers.

研究分野：軟骨細胞

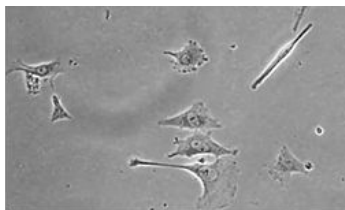
キーワード：軟骨細胞 脱分化 lineage tracing

1. 研究開始当初の背景

軟骨組織は自己修復能力が乏しいため、外傷や変形性膝関節症などにより生じた軟骨組織の欠損に対する治療法の一つとして、自家軟骨細胞移植が行われている。形成外科分野では小耳症に対して切除予定の患側耳介軟骨細胞を体外で培養し、増殖させた後に体内に戻して軟骨塊を形成させ、治療に使用する報告がある。軟骨欠損が広範囲にわたる場合、軟骨欠損部を被覆するためには多量の細胞数が必要となる。この際には細胞数を増やすために軟骨細胞を採取した後に ex Vivo で細胞培養を行う。



軟骨細胞は細胞数を増やすために継代を繰り返すとその過程で本来の小さく多角形の形態から、肥大していきつつ線維状の形態へと変化していき、軟骨としての性質を失っていく。



軟骨特異的のマーカである 2 型コラーゲンの産生は著明に減少し、その代わりに線維化のマーカである 1 型コラーゲンの産生が上昇して、脱分化を起こしてしまう。培養時に軟骨細胞が軟骨としての性質を維持するための培養方法として浮遊培養や 3 次元培養などの手法が開発されているが、単層培養と比較して手間がかかり、細胞数を増やすためには効率が優れないことが問題となっている。

軟骨細胞を単層培養すると脱分化を起こすことにはコンセンサスがあるといえるが、軟骨細胞採取の際に純粋に軟骨細胞のみを単離することは手技上難しく、周囲組織に含まれる滑膜、靭帯、軟骨膜、筋、線維芽細胞の混在がどうしても問題となっている。培養当初から混在していた細胞が細胞増殖速度の違いから優位的に増殖してくることで線維芽細胞様の細胞が多数を占めるようになっており、初代軟骨細胞を単層培養した際に生じてくる線維芽細胞様の細胞

の起源については今まで明らかではなかった。

2. 研究の目的

この問題を解明する手段として lineage tracing の手法が有効であると考えた。11 型コラーゲンの発現部位に GFP タンパクを産生する、すなわち今まさに軟骨である細胞が蛍光される *Col11a2-EGFP* マウスと、11 型コラーゲンの発現部位で Cre リコンビナーゼを発現し、同部位で特異的に遺伝子が組み換えられることで YFP タンパクを産生する、すなわち今まさに軟骨である、もしくはかつて軟骨であった細胞が蛍光される *Col11a2-Cre; Rosa-stop^{fllox}-EYFP* マウスとの 2 つの系統のマウスから軟骨細胞を採取し同条件で単層細胞培養を行う。その比較を行い、相違しているところを抽出することで脱分化した軟骨細胞の同定が可能となる手法を開発する。その手法を用いて、培養経過を自動撮影することができる BioStation CT で軟骨細胞培養が脱分化していく過程を位相差像と蛍光像で Time-lapse 撮影を行うことにより軟骨細胞の形態的变化、蛍光性の変化を経時的に観察し、軟骨細胞の脱分化の過程・メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) 脱分化軟骨細胞の lineage tracing の手法の作成

Col11a2-EGFP マウスでは 11 型コラーゲンの発現部位に GFP タンパクを産生する、すなわち今まさに軟骨である細胞が蛍光される。*Col11a2-Cre; Rosa-stop^{fllox}-EYFP* マウスでは 11 型コラーゲンの発現部位で Cre リコンビナーゼを発現し、同部位で特異的に遺伝子が組み換えられることで YFP タンパクを産生する。すなわち今まさに軟骨である、もしくはかつて軟骨であった細胞が蛍光される。マウスの交配・繁殖によりこれら 2 つの系統のマウスを作製する。

生後 3 週齢においてマウス後肢膝関節の凍結切片を作成し、ヘマトキシリン&エオジン染色と蛍光顕微鏡にて GFP もしくは YFP 蛍光の局在を観察した。

(2) 軟骨細胞の初代単層培養による脱分化過程の解析

2 つの系統の 5 日齢マウスの股関節軟骨、膝関節軟骨を採取して、線維組織を除去後、コラーゲナーゼ処理を行い、軟骨細胞を分離した。8.0x10⁴ 個の軟骨細胞を 6 ウェルディッシュに播種し、37 °C で 7 日間単層培養を行い、細胞増殖と形態・蛍光性の変化の過程を BioStation CT で 4 時間毎の経時撮影を行った。また単層培養 2 日目と 6 日目で細胞を回収し、軟骨マーカーと線維化マーカーについてリアルタイム PCR を行った。

(3) 脱分化軟骨細胞の再分化過程の観察

Col11a2-EGFP マウスから採取した軟骨細胞は単層培養し脱分化することで蛍光性を消失するが、軟骨への分化を促すことで再び蛍光性をとり戻すことができることを確認した。

セミコンフルエントとなった脱分化軟骨細胞を継代する際に単層培養ではなく浮遊培養をおこなった。また軟骨細胞への分化を促す化合物としてサイトカラシン B を培養液に混合した。

(4) 細胞増殖を停止した際の軟骨細胞脱分化の過程の解析

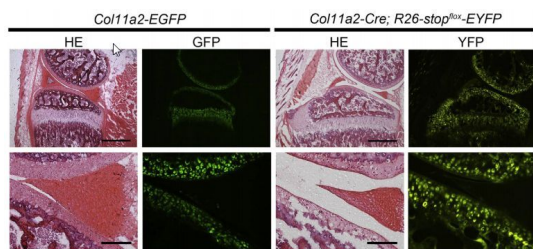
軟骨細胞の脱分化の過程には細胞増殖が必要なのかを検討するため、マイトマイシン C 添加により細胞増殖を停止させた状態で *Col11a2-EGFP* マウスと *Col11a2-Cre; Rosa-stop^{fllox}-EYFP* マウスから採取した軟骨細胞を 8.0×10^4 個の軟骨細胞を 6 ウェルディッシュに播種し、37 で 7 日間単層培養を行い、細胞増殖と形態・蛍光性の変化の過程を BioStation CT で 4 時間毎の経時撮影を行った。また単層培養 2 日目と 6 日目で細胞を回収し、軟骨マーカーと線維化マーカーについてリアルタイム PCR を行った。

4. 研究成果

(1) 脱分化軟骨細胞の lineage tracing の手法の作成

3 週齢の *Col11a2-EGFP* マウスにおいて GFP 蛍光性は関節軟骨、成長板において認められた。骨、半月板、滑膜、筋肉、皮膚では蛍光性を認めなかった。

3 週齢の *Col11a2-Cre; Rosa-stop^{fllox}-EYFP* マウスにおいて YFP 蛍光性は関節軟骨、成長板において認められた。骨、半月板、滑膜、筋肉、皮膚では蛍光性を認めなかった。しかしながら長幹骨の骨芽細胞では蛍光性を認めており、これは chondrocyte が骨芽細胞になったことを示唆した。

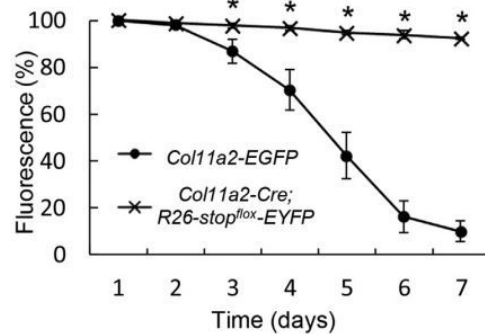


このことより *Col11a2-EGFP* マウスでは今まさに軟骨である細胞が、*Col11a2-Cre; Rosa-stop^{fllox}-EYFP* マウスでは今まさに軟骨である、もしくはかつて軟骨であった細胞が蛍光されることが示された。

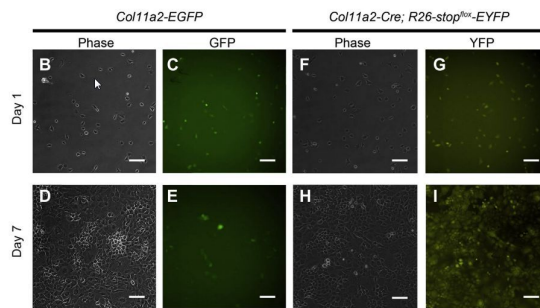
(2) 軟骨細胞の初代単層培養による脱分化過程の解析

Col11a2-EGFP マウスから採取した軟骨細胞では当初ほぼすべての細胞において GFP 蛍光性を認めていたが、培養日数が経過していくにしたがって GFP 蛍光性は減弱していき、7 日目には 12.5% 程度が蛍光性を示すのみであった。

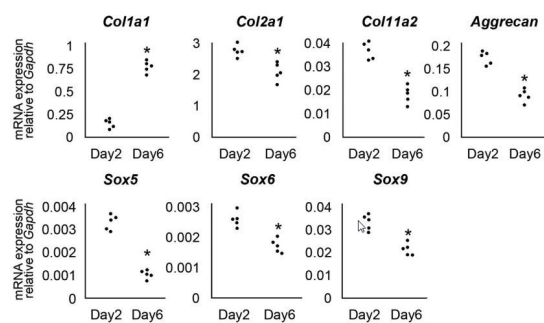
Col11a2-Cre; Rosa-stop^{fllox}-EYFP マウスから採取した軟骨細胞の培養では当初は同様にほぼすべての細胞で YFP 蛍光性を認めた。7 日目においても 95% の細胞において YFP 蛍光性が維持されていた。



また当初は小さく多角形な形態であったが、培養日数が経つにつれて大きく細長い繊維芽細胞様の形態になった。



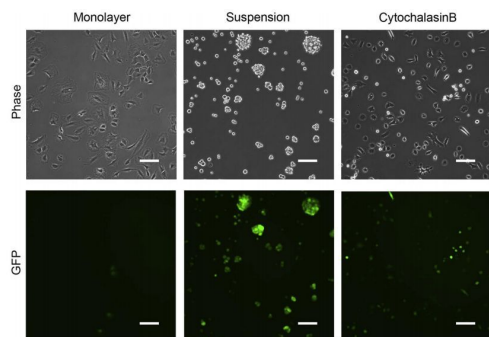
培養 2 日目と 6 日目の細胞を回収してリアルタイム PCR をおこなったところ、培養 2 日目においては軟骨マーカーである *Col2a1*、*Col11a2*、*Aggrecan*、*Sox5*、*Sox6*、*Sox9* が高く、培養 6 日目には線維化マーカーである *Col1a1* が高かった。



これにより軟骨細胞の初代単層培養で認める繊維芽細胞様細胞の増殖は軟骨細胞採取時における繊維芽細胞の混和が原因ではなく、軟骨細胞が脱分化していく過程で生じていることが明らかになった。

(3) 脱分化軟骨細胞の再分化過程の観察

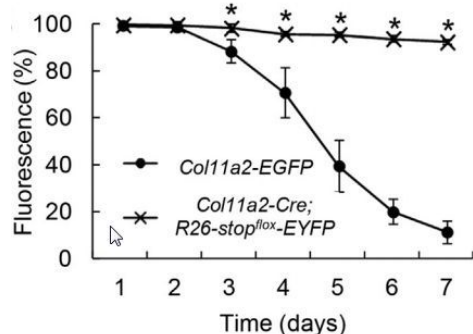
Col11a2-EGFP マウスから採取した軟骨細胞は単層培養するにより蛍光性を失ったが、継代の際に浮遊培養を行うと細胞塊は強い GFP の蛍光性を取り戻した。また継代時にサイトカラシン B を培養液に混合すると細胞単体のままでも GFP 蛍光性を取り戻した。



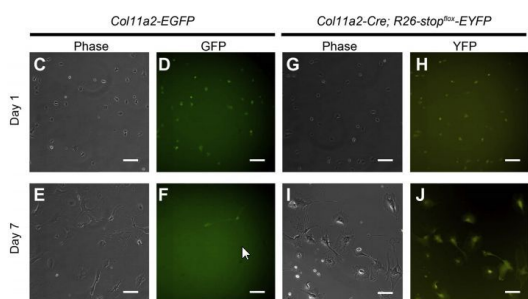
これにより *Col11a2-EGFP* レポーターは軟骨としての性質を確認するツールとして効果的に機能していることが確認された。

(4) 細胞増殖を停止した際の軟骨細胞脱分化の過程の解析

Col11a2-EGFP マウスから採取した軟骨細胞では当初ほぼすべての細胞において GFP 蛍光性を認めていたが、培養日数が経過していくにしたがって GFP 蛍光性は減弱していった。*Col11a2-Cre; Rosa-stop^{fllox}-EYFP* マウスから採取した軟骨細胞の培養では当初は同様にほぼすべての細胞で YFP 蛍光性を認めた。7日目においてもほとんど YFP 蛍光性を消失しなかった。

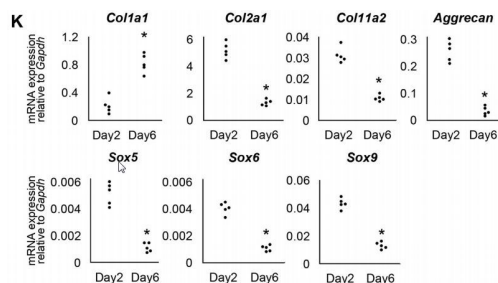


また当初は小さく多角形な形態であったが、培養日数が経つにつれて大きく細長い繊維芽細胞様の形態になった。



培養 2 日目と 6 日目の細胞を回収してリアルタイム PCR をおこなったところ、培養 2 日目

においては軟骨マーカーである *Col2a1*、*Col11a2*、*Aggrecan*、*Sox5*、*Sox6*、*Sox9* が高く、培養 6 日目には線維化マーカーである *Col1a1* が高かった。



これにより細胞増殖を伴わなくても、軟骨細胞は線維化をおこしていくことが明らかになった。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Yoshiki Minegishi, Yasuo Sakai, Yasuhito Yahara, Haruhiko Akiyama, Hideki Yoshikawa, Ko Hosokawa, Noriyuki Tsumaki.

Cyp26b1 within the growth plate regulates bone growth in juvenile mice.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有.454, 2014, 12-18

[学会発表](計 3 件)

峯岸芳樹、中井國博

レチノイン酸による成長板軟骨細胞の増殖・分化制御機構の解析

第 24 回形成外科基礎学術集会

2015 年 10 月 8-9 日

岩手県民会館 (岩手県盛岡市)

Yoshiki Minegishi

The dedifferentiation process of mouse chondrocytes with chondrocyte-specific reporters

7th European Plastic Surgery Research Council

2015 年 8 月 27-30 日

ハンブルク (ドイツ)

峯岸芳樹、中井國博

細胞増殖停止時の軟骨細胞脱分化過程 time-lapse 観察

第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会

2014 年 10 月 9-10 日

キッセイ文化ホール (長野県松本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯岸 芳樹 (MINEGISHI, Yoshiki)

福井大学・学術研究院医学系部門 (附属病院部)・助教

研究者番号: 1 0 4 6 7 5 6 6