

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08136

研究課題名(和文) 成長軟骨板に依存する長管骨発生プロセスの理解：組織系譜解析によるアプローチ

研究課題名(英文) Developmental role of growth plate derived osteogenic lineage cell during long bone elongation process

研究代表者

原口 竜摩 (Haraguchi, Ryuma)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00423690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヘッジホッグ(Hh)シグナルは、軟骨細胞が産生する分泌性シグナルの一つとして骨格形成に必須であることが報告されているが、それが標的とする細胞及びそれが連なる組織系列は未だ不明である。本研究において成長板由来のHhシグナル応答細胞の骨伸長過程における動態を調べた結果、Hhシグナルを受容した細胞は、成長板内の肥大軟骨細胞層及び成長板から一次海綿骨への移行部から骨格の長軸方向に沿って移動し、最終的に海綿骨や皮質骨の骨芽細胞及び骨細胞へと分化することがわかった。本研究により、成長板からのHhシグナル応答が、将来の骨格形成に寄与する前駆細胞プールの維持や増幅に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The endochondral ossification process at the growth plate is governed by paracrine signals secreted from terminally differentiated chondrocytes (hypertrophic chondrocytes), and hedgehog signaling is one of the best known regulatory signaling pathways in this process. We carried out genetic lineage tracing with the use of Gli1CreERT2 mice line in order to follow the fate of hedgehog signal-responsive cells during endochondral bone formation. Gli1CreERT2 genetically labeled cells are detected in hypertrophic chondrocytes and osteo-progenitors at the chondro-osseous junction (COJ); these progeny then commit to the osteogenic lineage in periosteum, trabecular and cortical bone along the developing longitudinal axis. Our study show, for the first time, evidence of the developmental contribution of endochondral progenitors under the influence of epiphyseal chondrocyte-derived secretory signals in longitudinally growing bone.

研究分野：骨形成及び骨代謝

キーワード：成長板軟骨 ヘッジホッグ 遺伝子改変マウス genetic lineage tracing 組織系譜解析 骨形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

成長軟骨板の増殖・分化および骨置換によって、骨格系の大部分を占める長管骨は発達する。従来の研究は、初期胚子の未分化間葉細胞の凝集から軟骨細胞の分化・成熟に至る成長軟骨板そのものの発生過程に主眼が置かれ、その後の発育期での骨化プロセスについては未だ不明な点が多い。骨短縮・骨変形を特徴とする成長板早期閉鎖症や発育期成長板障害による骨形成不全など、長管骨の発達は成長軟骨板に強く依存するとされ、成長板と骨形成プロセスとを結びつける分子実体の解明が望まれていた。そのような中、長管骨の骨化プロセスに関与する成長板由来の分子実体としてヘッジホッグシグナル経路の存在が明らかとなる (Maeda et al., 2007 PNAS)。ヘッジホッグシグナルは、胎児期での軟骨原基の発生に必須とされる分子経路である。そのリガンドの一つインディアンヘッジホッグ (Ihh) は成長板軟骨細胞においても産生されるが、長管骨が急激に伸長する発育期の役割は不明であった。Maeda らは、成長板特異的な Ihh 遺伝子欠損マウスの症状解析より、成長板軟骨細胞からのヘッジホッグシグナルが、成長板の増殖や分化だけでなく、成長板の軟骨基質が骨組織へと置き換わる長管骨内での骨リモデリング過程に必須であることを見いだした。この報告により、これまで成長軟骨板に依存すると考えられてきた長管骨の発生機序の一端がはじめて実験的に示されることとなるが、成長板由来の液性シグナルの標的細胞が如何なるもので、それらがどのように長管骨の発生に組み込まれているのかは未だ不明であり、依然として成長軟骨板からのシグナル刺激を受けて長管骨の骨化プロセスに直接寄与する細胞実体の解明が焦点となっている。

### 2. 研究の目的

申請者は、個体発生に必須のシグナル系であるヘッジホッグ (Hh) シグナルが活性化された細胞を、Genetic Lineage Tracing (GLT) 法によってレポーター標識し、マウス生体内で長期的に観察できるシステムを構築している。成長軟骨板周辺では、Hh リガンドの発現による同シグナル経路の活性化が予想されるが、GLT法により Hh シグナルを受容した細胞をレポーター分子で可視化した申請者の最近の研究で、成長板軟骨基質辺縁の細胞のみが Hh シグナルに応答することが判明した。また、それらの細胞を長期的に追跡することで、成長板由来の Hh シグナル受容細胞が骨基質の支持細胞へ最終的に分化することも明らかになりつつある。この発見の重要なポイントは、成長板由来の Hh シグナルに応答した特定の細胞系列が、長管骨の骨化プロセスに直接寄与しうる細胞実体である可能性を示唆している点にある。これを実証するためには、成長板由来の Hh シグナル受容細胞が、発生に伴い刻々と形態を変化させる長管骨の骨リモデリングプロセスに組み込まれていることを、細胞個々の動態や分子特性の両面から明確にする必要がある。本研究では、GLT法による細胞追跡実験を軸とした解析系で成長軟骨板を基軸とする長管骨の骨化プロセスの解明に迫る。

### 3. 研究の方法

Genetic Lineage Tracing (GLT) 法による長管骨での細胞系譜追跡を研究計画の骨子とした。

(実験計画 1)

マウスでは、生体内において特定の細胞集団を可視化し、その運命を追跡する手法が確立されている。本実験計画では、Hh シグナルの直接標的分子 Gli1 の遺伝子座に CreER が挿入された Gli1creER マウスを、Rosa-EGFP レポーターマウスと交配し、成長板由来の Hh シグナルに応

答する細胞を遺伝的に EGFP で永久標識する。

(1) 骨端部において二次骨化中心が形成され、成長板が形態的に明確となるマウス生後3週齢での発育期におけるタモキシフェン(TM)投与を行う(授乳中の母体へTM投与)。Hhシグナル受容細胞をレポーター標識したマウスを経時的に採取し、長管骨の脱灰骨組織標本を作製する。EGFP標識細胞の組織分布を精査することで、成長板からのHhシグナルを受容した細胞系列が長管骨の骨化プロセスに寄与する機序を示す細胞系譜地図を作製する。

(2) 長管骨内部には、骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮、骨髄間質細胞といった骨形成・骨代謝に関わる機能的に多様化した細胞成分が存在する。長管骨内部に分布する標識細胞の細胞特性を調べるため、各種分化マーカー抗体とレポーター分子に対するEGFP抗体を用いた蛍光多重染色を、解析(1)で得られる組織切片で試行することで、細胞系譜地図に分子特性情報を付与する。

#### (実験計画2)

実験計画1で明らかになった長管骨形成への関与が推察される成長板由来のHhシグナル受容細胞についての遺伝子発現プロファイリング解析を行なう。実験計画1と同条件で標識を行った骨標本から凍結切片を作製した後、レーザーマイクロダイセクション(LMD)法によって、長管骨の各種細胞成分を分別採取する。EGFP標識細胞(Hhシグナル受容細胞)を含む組織片をFACSソーティングによりEGFP陽性及びEGFP陰性細胞へと分別した後、各細胞分画から抽出したRNAをもとに、DNAマイクロアレイ解析および定量性RT-PCR解析を行なう。これらを精査することで、成長板由来のHhシグナル受容細胞が長管骨の骨組織構築へ寄与する際に重要となる分子カスケードを同定する。

(1) 長管骨内のEGFP陽性及び陰性細胞において、発現変動を見せる分子をDNAアレイ解析により同定する。さらに、骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮細胞、間質細胞といった各細胞におけるEGFP陽性細胞同士を比較対象とした検討も行うことで、成長板由来のHhシグナル受容細胞から機能的に特化した各細胞系列が生ずる分子基盤の同定も試みる。

(2) 解析(1)より得られた抽出RNAを用いて定量性PCR解析を行なう。DNAアレイ解析により絞り込まれた分子及び骨形成・骨代謝経路に關与する既知の分子カスケードについての発現変動解析を行なう。

(3) 解析(1)および解析(2)において、成長板由来のHhシグナルと長管骨骨化プロセスとの結びつきをより強く示唆する分子については、Gli1creERとの交配によるHhシグナル受容細胞に特異的なLineage Specific Conditional 遺伝子改変マウスを作製・解析する。マウスの表現型を精査することで、成長板由来のHhシグナル受容細胞を起源とする長管骨の発生プロセスの存在及びその分子基盤を個体レベルで証明する。

#### 4. 研究成果

Hhシグナルの直接標的Gli1のプロモーター依存的にCreを発現するマウスを用いたLineage解析の結果、Hhシグナルの受容を示すレポーター標識細胞は、成長板内の肥大軟骨細胞層及び成長板から一次海綿骨への移行部において分布していることがわかった。さらに、それらの細胞は骨格の長軸方向に沿った成長に伴い、海綿骨や皮質骨の骨芽細胞及び骨細胞へと分化し、さらに2ヶ月以上もの間、長期的に骨組織内に存在し続けることも判明した。近年、骨格構築に寄与する細胞成分が成長板に由来するとの報告が複数なされているが、成長板からのHhシグナル応答が、将来の骨格形成に寄与する前駆細胞プールの維持や増幅に關与しうる可能性を私どもは考えている。さらに骨髄中の血管周囲には、骨形成細胞とは異なる、特有の

長い細胞突起を有したレポーター陽性細胞が点在することも明らかとなった。それらの多くはCAR細胞の特異的マーカーを発現していることから、骨髄造血幹細胞ニッチである可能性が考えられる。本研究により、軟骨細胞由来のHhシグナルが直接的に作用するのは、強いStemness特性を有し、かつ、骨組織を構築する骨形成細胞あるいは骨髄中の造血機能を支えるCAR細胞などへとコミットする能力を持った骨端軟骨直下に存在する細胞集団であることが示された。これまで成長板の軟骨細胞は、主に将来骨へと置換される軟骨成長板の発生源として考えられてきたが、それ以外にも、長管骨における骨形成や造血への関与が推察される骨端軟骨直下の細胞集団に影響しうる制御シグナルのprimary sourceとして機能していることが明らかとなった。本研究成果は、*Histochem Cell Biol.* 誌 (149(4):365-373. 2018.) にて、申請者が責任著者として発表を行った。

#### 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10件)

1. **Haraguchi R (責任著者)**, Kitazawa R, Imai Y and Kitazawa S. Growth plate-derived Hedgehog signal responsive cells provide the skeletal tissue components in growing bone. *Histochem Cell Biol.* 149(4):365-373. 2018.[査読有]
2. Kitazawa R, **Haraguchi R**, Kitazawa S. Pathologic conditions of head tissue: role of osteoclasts in osteolytic lesion. *Histochem Cell Biol.* 149(4):405-415. 2018.[査読有]
3. Matsushita S, Suzuki K, Murashima A, Kajioka D, Acebedo RA, Miyagawa S, **Haraguchi R**, Ogino Y and Yamada G. Regulation of masculinization: androgen signalling for external genitalia development. *Nat Rev Urol.* Apr 18.2018. doi: 10.1038/s41585-018-0008-y.[査読有]
4. Ito S, Kitazawa R, **Haraguchi R**, Kondo T, Ouchi A, Ueda Y, Kitazawa S. Novel GLI3 pathogenic variant causing overlapped Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) and Pallister-Hall syndrome (PHS) phenotype with agenesis of gallbladder and pancreas. *Diagn Pathol.* Jan 3;13(1):1. doi: 10.1186/s13000-017-0682-8. 2018.[査読有]
5. **Haraguchi R (責任著者)**, Kitazawa R, Murashima A, Yamada G, Kitazawa S. Developmental contribution of Wnt-signal-responsive cells to mouse reproductive tract formation. *Acta Histochem Cytochem.* 25;50(4):127-133. 2017.[査読有]
6. **Haraguchi R**, Kitazawa R, Mori K, Tachibana R, Kiyonari H, Imai Y, Abe T, Kitazawa S. sFRP4-dependent Wnt signal modulation is critical for bone remodeling during postnatal development and age-related bone loss. *Scientific Repots.* 27(6):e25198, 2016.[査読有]
7. Kawanami Y, Kitazawa R, **Haraguchi R**, Ueda Y, Nishi Y, Ariyasu K, Mizuno Y, Kitazawa S. Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome without Preceding Medical Events. *Case Reports in Clinical Medicine.*5(3):e53019, 2016.[査読有]
8. Ariyasu K, Kitazawa R, **Haraguchi R**, Ueda Y, Kawanami Y, Nishi Y, Kameoka Y, Mizuno Y and Kitazawa S. Inflammatory Fibroid Polyps of Large Bowel with PDGFRA Mutation. *J Cell Sci Ther.* 7(234). doi:10.4172/2157-7013.1000234, 2016.[査読有]
9. Kameoka Y, Kitazawa R, Ariyasu K, Tachibana R, Mizuno Y, **Haraguchi R**, Kitazawa S. Reactivation of CDX2 in gastric cancer as mark for gene silencing memory. *Acta Histochem Cytochem.* 48(4):115-124. 2015.[査読有]
10. **Haraguchi R**, Kitazawa R, Kitazawa S.

Epigenetic regulation of Tbx18 gene expression during endochondral bone formation. *Cell Tissue Res.* 359(2):503-12. 2015.[査読有]

〔学会発表〕（計 12 件）

1. **原口 竜摩**、北澤理子、村嶋亜紀、山田源、北澤莊平 新たな女性生殖器官の発生機序:ウオルフ管に依存する子宮の発生 **第58回 日本組織細胞学会 2017年(松山市)**
2. **原口 竜摩**、北澤 理子、今井祐記、北澤 莊平 長管骨伸長時におけるヘッジホッグシグナル受容細胞の組織系譜解析 **第35回 日本骨代謝学会 2017年(福岡市)**
3. **原口 竜摩**、北澤 理子、北澤 莊平 体腔上皮に由来する Wnt/ -カテニンシグナルの子宮発生における役割 **第106回 日本病理学会 2017年(新宿区)**
4. **Haraguchi R**, Kitazawa R, Imai Y, Kitazawa S. The functional role of Hedgehog signaling in osteoclast lineage. *ASBMR Annual Meeting 2016年(アトランタ)*
5. **原口 竜摩**、北澤 理子、今井祐記、北澤 莊平 破骨細胞におけるヘッジホッグシグナル伝達系の機能解析 **第57回 日本組織細胞学会 2016年(三鷹市)**
6. **原口 竜摩**、北澤 理子、今井祐記、北澤 莊平 破骨細胞系列におけるヘッジホッグシグナル伝達系の機能解析 **第34回 日本骨代謝学会 2016年(大阪市)**
7. **原口 竜摩**、北澤 理子、北澤 莊平 長管骨伸長プロセスにおけるヘッジホッグシグナル経路の役割 **第105回 日本病理学会 2016年(仙台市)**
8. **Haraguchi R**, Kitazawa R, Imai Y, Kitazawa S. The role of Wnt signal modulator, sFRP4, in bone formation and metabolism. *ASBMR Annual Meeting 2015年(シアトル)*
9. **原口 竜摩**、北澤 理子、北澤 莊平 ヘッジホッグシグナルを介する成長板を起点とした長管骨発生プロセスの理解 **第56回 日本組織細胞学会 2015年(枚方市)**
10. **原口 竜摩**、北澤 理子、北澤 莊平 Wntシグナル調節因子 sFRP-4を指標とした骨代謝研究:骨代謝疾患との

関連性について **第47回 日本臨床分子形態学会 2015年(長崎市)**

11. **原口 竜摩**、北澤 理子、今井祐記、北澤 莊平 Wntシグナル調節因子 sFRP-4の骨形成・骨代謝プロセスにおける役割 **第33回 日本骨代謝学会 2015年(新宿区)**
12. **原口 竜摩**、北澤 理子、北澤 莊平 長管骨伸長プロセスにおけるヘッジホッグシグナル経路の役割 **第104回 日本病理学会 2015年(名古屋市)**

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/pat/hology1/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
原口 竜摩 (Haraguchi, Ryuma)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 00423690

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
該当なし

(4) 研究協力者

北澤 莊平 (Kitazawa, Sohei)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

北澤理子 (Kitazawa, Riko)  
愛媛大学・医学部附属病院・特任教授

鷹岡友紀 (Takaoka, Yuki)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・技術補佐員

白石千絵 (Shiraishi, chie)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・技術補佐員