

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19174

研究課題名(和文)メッケル軟骨におけるセプトクラストの役割と破軟骨細胞との役割分担機構の解明

研究課題名(英文)Occurrence of septoclasts and their roles shared with chondroclasts in Meckel's cartilage.

研究代表者

坂下 英(SAKASHITA, Hide)

明海大学・歯学部・客員助教

研究者番号：20823181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウス胎仔を用いた免疫組織化学的研究により、1)骨端板の軟骨内骨化で未石灰化基質を吸収する表皮型脂肪酸結合蛋白(E-FABP)を発現するseptoclastがメッケル軟骨の吸収面にも出現すること、2)メッケル軟骨吸収の盛んな胎生16日(E16)・E17ではセプトクラストの数やその突起の数と長さの値は、吸収が収束するE18と比べて優位に高いこと、3)石灰化基質を吸収する破軟骨細胞と比べてより吸収面にちかい近い位置に局在すること、を明らかにした。これらの結果から、胎生期の急速なメッケル軟骨の消失に、septoclastと破軟骨細胞が役割分担により、重要な役割を果たすことが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果はsakashita et al. Histochem. Cell Biol. (2022) で公表された。本研究では、近年軟骨吸収細胞と考えられているseptoclastの局在・役割をMeckel's cartilageで解析を行った。メッケル軟骨の吸収不全・遺残は顎顔面領域の発育不全を引き起こすことが報告されている。そこで、これまでほとんど報告されていないMeckel軟骨の吸収過程におけるseptoclastの局在・役割・代謝機構を解明することで、顎変形症などの先天発育異常の原因の一因を解明することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The present immunohistochemical study using mouse embryos showed that 1) epidermal fatty acid binding protein (E-FABP)-immunopositive septoclasts resorbing uncalcified matrix during the endochondral ossification in the growth plate occurred at the resorption surface of embryonic Meckel's cartilage, 2) the number of septoclasts and their processes and process-length was substantially higher at E16 and E17, when the Meckel's cartilage is actively resorbed, than at E18, and 3) septoclasts localized closer to the resorption surface than chondroclasts resorbing calcified matrix. These results suggest that septoclasts share a role with chondroclasts in rapid resorption and embryonic disappearance of Meckel's cartilage.

研究分野：口腔組織発生学

キーワード：メッケル軟骨 E-FABP セプトクラスト マウス

1. 研究開始当初の背景

哺乳類第一鰓弓のメッケル軟骨は胎生期の仮設的な構造物で、下顎骨のオトガイ部を形成する最前部と、ツチ骨・キヌタ骨、蝶下顎靭帯等を形成する最後部以外は、出生前に吸収・消失する。メッケル軟骨の大部分が出生前に吸収されることは、正常な口腔顎顔面の形態形成と発育のために必要であり、その遺残や形成異常は頭蓋顎顔面領域の先天異常と関係すると考えられている (Komiya et al. 1997)。しかし、メッケル軟骨の吸収・消失機構については不明な点が多い。

頭蓋顎顔面領域の発育異常の原因にはビタミン A 誘導体のレチノイン酸や脂肪酸の関与が指摘されている (Lammer et al. 1985)。マウス胎仔にレチノイン酸を過剰投与すると下顎骨の発育不全、口蓋裂、癒合歯や軟骨組織の形成不全などの頭蓋顎顔面領域の発育異常を生じる (Suzuki A. et al. 1999)。また、多価不飽和脂肪酸の欠如は骨基質、ミネラルの減少により骨粗鬆症を引き起こし、n-3 系不飽和脂肪酸は長管骨の成長の調節に関与することから、骨・軟骨の成長には必要不可欠と考えられている (Poulsen et al. 2007)。

疎水性の長鎖脂肪酸は細胞内にとり込まれると脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid-binding protein, FABP) と結合することによって可溶化され、細胞内を輸送されるが、ミトコンドリアに輸送されてエネルギー産生に消費されると同時に、核内に輸送されて核内レセプター (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) のリガンドとなり、遺伝子発現の調節により種々の生物活性に関与する (Owada et al. 2006)。

n-3 系長鎖不飽和脂肪酸やレチノイン酸は表皮型 FABP (E-FABP) と高い親和性を有するが、長管骨の軟骨内骨化を生じる骨端板軟骨に局在するセプトクラスト (septoclast) に、E-FABP が特異的に発現することが報告された (Bando et al. 2014)。軟骨組織の吸収には、従来から知られている破軟骨細胞 (破骨細胞) の他に、単核食細胞であるセプトクラストの関与が報告されている (Lee et al. 1995)。セプトクラストは未石灰化軟骨基質で構成された骨端板の横隔 (軟骨小腔を上下に仕切る基質) に数本の突起を伸長し、cathepsin-B、MMP13 などの基質消化酵素を発現することから、未石灰化軟骨基質を専門に吸収すると考えられている。

セプトクラストは、E-FABP を特異的に発現し、E-FABP に親和性が高く細胞分化増殖の誘導に関与する PPAR γ (Schug et al. 2007) も発現する (Bando et al. 2014)。レチノイン酸は E-FABP と結合し核内へと運搬され PPAR γ を活性化してセプトクラストの生存、増殖を強調する代謝機構と、cellular retinoic acid binding protein II (CRABP2) に結合し retinoic acid receptor (RAR) を活性化することでセプトクラストの増殖抑制やアポトーシスなどを引き起こす 2 つの代謝機構が存在すると考えられる (Bando et al. 2017)。

メッケル軟骨は出生前に短期間に急速に吸収され、消失する (Amano et al. 2011)。従来の研究では破軟骨細胞やマクロファージの関与が指摘されてきたが (Tsuzurahara et al. 2011)、セプトクラストの関与は全くわかっていない。予備実験において、マウス胎仔のメッケル軟骨吸収面に E-FABP 陽性細胞が存在することを見出した。そこで、メッケル軟骨吸収消失においても『レチノイン酸や脂肪酸による E-FABP 陽性セプトクラストによる軟骨吸収調節機構が存在する』と考えた。

2. 研究の目的

本研究では「メッケル軟骨の吸収・消失にセプトクラストが関与し、E-FABP を介した脂肪酸やレチノイン酸による調節機構が存在する」との仮説を立て、メッケル軟骨の吸収過程におけるセプトクラストの関与とその調節機構および既知の軟骨吸収細胞である破軟骨細胞との関連や役割分担を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

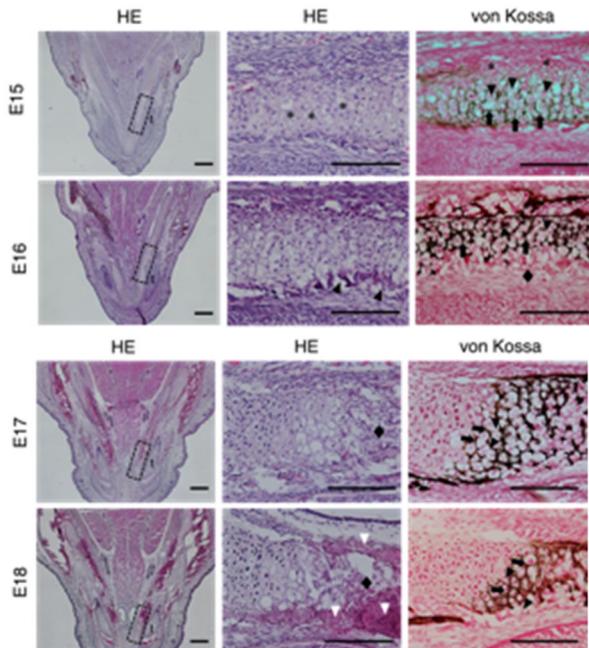
マウス胎仔を用いて:

- メッケル軟骨吸収面に存在する E-FABP 陽性細胞の空間的・時間的局在
- メッケル軟骨吸収面に存在する E-FABP 陽性細胞とセプトクラストの一致性
- メッケル軟骨の軟骨基質分布とセプトクラストの局在性の比較
- セプトクラストと軟骨吸収面に存在する他の細胞 (破軟骨細胞など) との分布の解析
- メッケル軟骨消失過程におけるセプトクラストの 3 次元形態変化の解析

について、免疫組織化学的手法、三次元画像構築法、組織計測的手法を行い解析する。

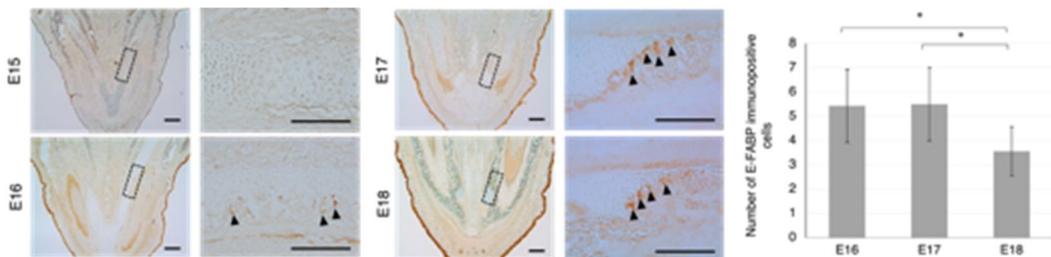
4. 研究成果

i)胎齢 15(E15)から E18 までのメッケル軟骨の組織学的な変化・石灰化軟骨基質の分布



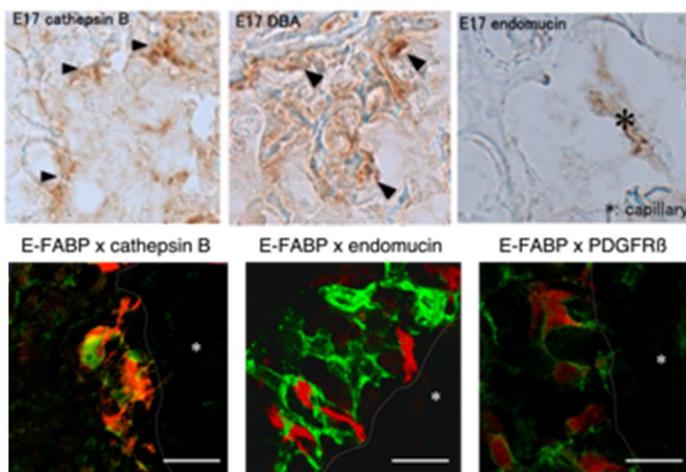
軟骨組織の吸収は E16,E17 で急速に進行し、軟骨面の形成に先立つ軟骨細胞の肥大化が E15 で初めて認められた。軟骨基質の石灰化は肥大軟骨細胞の分布とほぼ一致し、軟骨の外側面から von kossa 陽性像が認められ、その翌日 (E16) から吸収面が形成されると同時に、石灰化は内側の軟骨膜に達した。さらにその翌日 (E17) には軟骨が分断する大きな吸収面が生じ、それがさらに近遠心的に進行して軟骨の消失面積が増大した (E18)。軟骨小腔の配置とそれに挟まれた軟骨基質の分布は、軟骨小腔が垂直的に配列する骨端板軟骨とは異なり、非常に不規則であった。従ってメッケル軟骨では骨端板で見られる横隔と縦隔によるグリッド状構造は存在せず、基質の石灰化・未石灰化についても組織化学的に個別に解析する必要がある。

)E-FABP 陽性細胞の各胎齢の局在・細胞数の統計的解析



軟骨組織の吸収が認められた E16 で初めて E-FABP 陽性細胞が出現した。E-FABP 陽性細胞は出生直前の E18 と比較すると、軟骨組織の吸収活性の著しい E16,E17 では細胞数は有意に多かった。

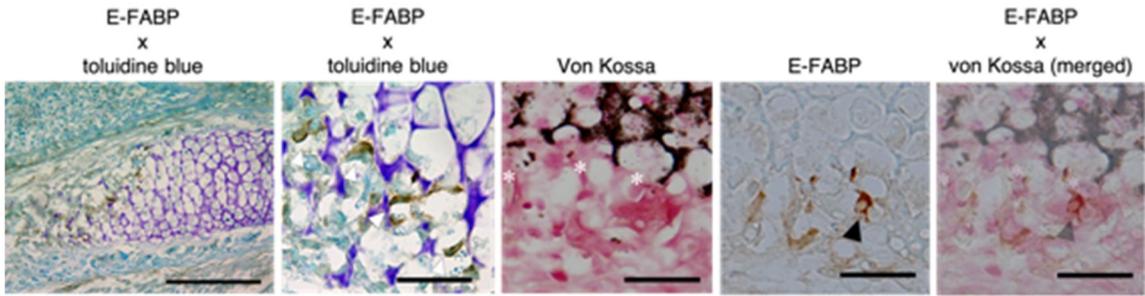
) E-FABP 陽性細胞とセプトクラストの一致性 (組織化学的同定)



セプトクラストは骨端板軟骨の骨軟骨境界に存在し、E-FABP を特異的に発現する。さらに cathepsin-B 免疫陽性や DBA レクチンにも陽性を示すことから、メッケル軟骨の軟骨吸収面に認められる E-FABP 免疫陽性細胞が、cathepsin-B や DBA レクチンにも反応を示すか否かを検証した。二重染色法や隣接切片法で検索した結果、軟骨吸収面に多数認められる E-FABP 免疫陽性細胞は、cathepsin-B と DBA レクチンにも同時に陽性を示した。さらにセプトクラストは毛細血管に隣接して

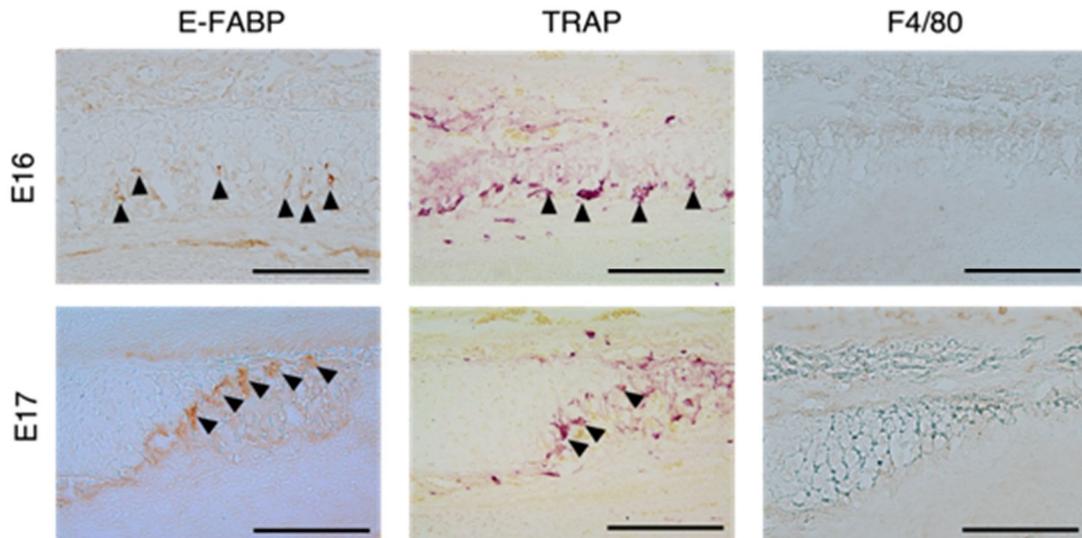
存在することから、血管内皮細胞のマーカーである抗 endomucin 抗体を用いて解析したところ、毛細血管に隣接して、軟骨吸収面の最前部に E-FABP 陽性細胞の突起の存在が確認できた。また、骨端板のセプトクラストの由来が、胎生期の血管周皮細胞 (ペリサイト) であることが分かったので (Bando et al. 2018)、ペリサイトマーカーである PDGFR β の発現を調べたところ、メッケル軟骨吸収面の E-FABP 免疫陽性細胞は PDGFR β に対する免疫陽性を示した。ことからメッケル軟骨の吸収面に存在する E-FABP 陽性細胞はペリサイト由来するセプトクラストであると同定され、メッケル軟骨吸収にセプトクラストが関与することが強く示唆された。

)メッケル軟骨の石灰化・未石灰化基質の分布とセプトクラストの位置関係



セプトクラストは突起を未石灰化軟骨基質に伸ばして吸収すると考えられている。本研究では吸収面を持つメッケル軟骨を toluidine blue 染色、von Kossa 染色を行い、セプトクラストの突起の位置と軟骨基質の関係を調べたところ、吸収面に存在するセプトクラストの突起は、toluidine blue 陽性だが von Kossa 陰性の未石灰化軟骨基質に伸長していることが明らかになった。この結果から、メッケル軟骨のセプトクラストも未石灰化基質の吸収を行っていることが示された。

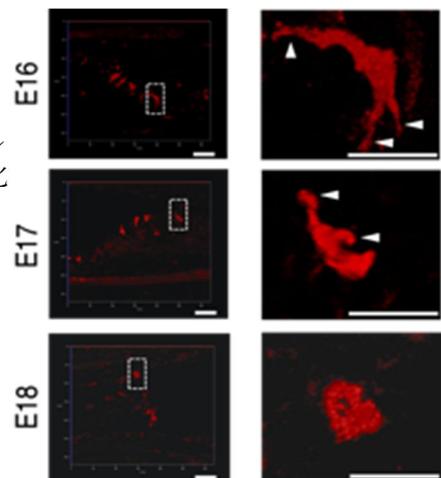
)破軟骨細胞、マクロファージとセプトクラストとの位置関係



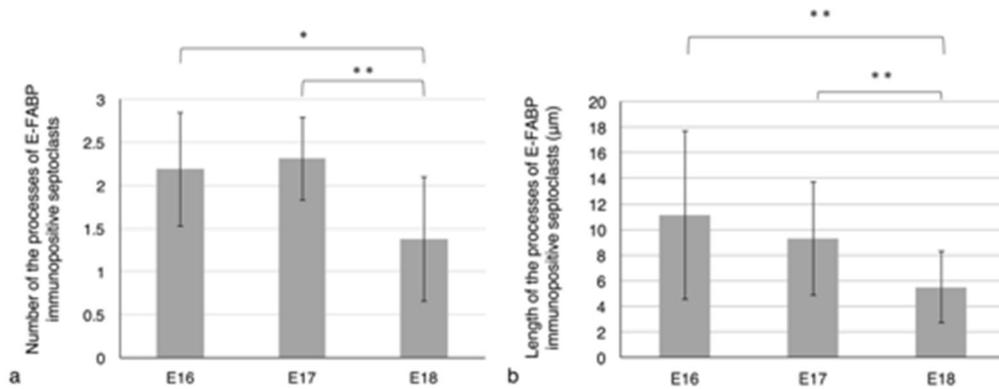
メッケル軟骨の吸収に関与すると考えられていた破軟骨細胞とマクロファージをそれぞれ酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase : TRAP) 染色、F4/80 抗体を用いた免疫組織化学的染色により局在を明らかにした。セプトクラストは軟骨吸収面の軟骨基質直下に局在したが、そのやや後方に TRAP 陽性破軟骨細胞が局在していた。F4/80 陽性マクロファージは軟骨吸収面の直下には認められなかった。以上のことからセプトクラストと破軟骨細胞、マクロファージは軟骨吸収・消失過程で異なる分布を示すことから、異なる役割を受け持つことが強く示唆された。

)セプトクラストの3次元的形態の解析

セプトクラストの3次元的な形態の解析のために抗 E-FABP 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡でセプトクラストの詳細な形態とその変化を解析した。骨端板のセプトクラストと同様に、メッケル軟骨でもセプトクラストは数本の突起を有していた。しかし出生直前の E18 になると、突起は短くまた減少し、萎縮した形態の細胞が多く認められた。

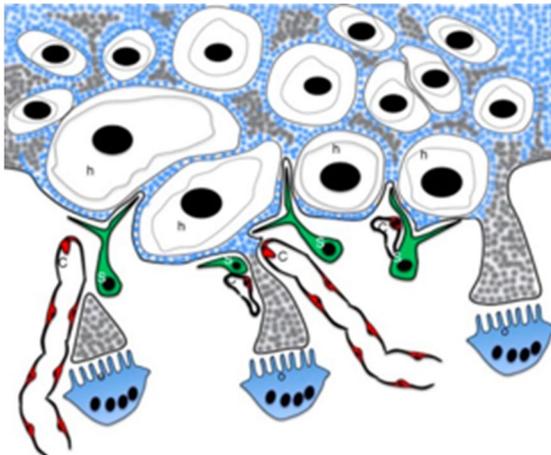


)セプトクラストの突起の数と長さの統計学的解析



共焦点レーザー顕微鏡で観察されたセプトクラストの突起の数・長さをそれぞれ E16,17,18 で比較したところ、突起の数・突起の長さが E18 では、共に有意に減少・縮小していた。このことから出生直前でメッケル軟骨の吸収活性のピークが終了して低下した状況では、セプトクラストの形態変化が生じることが明らかになった。

)メッケル軟骨の吸収面の軟骨吸収細胞と血管の位置関係



本研究で得られた結果のまとめを上図に示す。セプトクラスト (S) はメッケル軟骨の吸収面の直下の毛細血管 (C) に隣接し、その突起は未石灰化軟骨基質に伸ばしている。また破軟骨細胞 (O) はセプトクラストのやや後方に局在し、石灰化軟骨基質を吸収している。このことからセプトクラストと破軟骨細胞は軟骨吸収・消失過程でそれぞれ役割分担によって急速な軟骨吸収を可能にしていると示唆された。さらにセプトクラストは軟骨吸収の活性に応じ、細胞数・突起の数・突起の長さを変化させること、n-3系長鎖不飽和脂肪酸やレチノイン酸に高い親和性を持つ E-FABP を発現することから、これらによる代謝機構が存在し、メッケル軟骨の吸収活性を調節していると考えられた。以上の成果を *Histochem Cell Biol.* (2022) May;157(5):569-580 に公表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakashita Hide, Bando Yasuhiko, Nagasaka Arata, Sakiyama Koji, Onozawa Go, Taira Fuyoko, Ogasawara Yudai, Owada Yuji, Sakashita Hideaki, Amano Osamu	4. 巻 157
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 569-580
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 -

1. 著者名 Bando Yasuhiko, Sakashita Hide, Nagasaka Arata, Sakiyama Koji, Tokuda Nobuko, Iseki Shoichi, Owada Yuji, Amano Osamu	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂下英
2. 発表標題 メッセル軟骨吸収面におけるセプトクラストの局在性と役割
3. 学会等名 第 54 回 日本口腔科学会関東地方部会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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