

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09260

研究課題名(和文)各分化段階の骨芽細胞に対するIV型コラーゲンの作用の違いに関する研究

研究課題名(英文) Effects of type VI collagen on osteoblasts at early and late differentiation stages

研究代表者

添田 聡 (Soeta, Satoshi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：90318569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、ラットおよびウシの大腿骨骨膜の骨芽細胞でVI型コラーゲン(Col6)の受容体であるNG2とTEM8の発現が認められ、骨膜において、骨芽細胞はNG2とTEM8を介したCol6の刺激で制御を受けている可能性が示唆された。初代培養骨芽細胞をCol6コーティングディッシュ上で培養した結果、成熟誘導による成熟骨芽細胞への分化と骨細胞への分化が抑制された。さらに、NG2およびCol6a3遺伝子ノックダウンを行った未成熟な初代培養骨芽細胞においては、骨芽細胞の成熟が抑制された。以上の結果から、Col6-NG2のシグナリングは骨芽細胞の分化を制御する重要な因子であるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、いままであまり注目されてなかった骨膜での骨芽細胞の分化や新生骨形成の制御に対するVI型コラーゲンの重要性が明らかになり、緻密骨の形態、新生骨の形成パターン、および最終的な骨径の大きさがどのように決定されるかを理解するための大きな手掛かりが得られるものと考えられる。また、VI型コラーゲンやVI型コラーゲンの分解産物であるエンドトロフィンをマトリックス内に含ませ生体に適用することによって、骨の形態を人為的に制御するための重要な知見が得られる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：In this study, receptors of type VI collagen (Col6), NG2 and TEM8, were expressed in osteoblasts in the periosteum of rats and cattle femurs. As Col6 is abundant in the periosteum, the results indicate the possibility that Col6 regulates osteoblasts via NG2 and TEM8 in periosteum. In vitro studies using primary osteoblasts cultured on Col6-coating dishes revealed that maturation to calcified matrix producing osteoblasts and osteocytic differentiation were inhibited. NG2 and Col6a3 knockdown using shRNA method decreased alkaline phosphatase activity and mineralization in primary cultured osteoblasts. These results indicated that Col6 regulates osteoblast differentiation and maturation via NG2.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：骨芽細胞 VI型コラーゲン NG2 TEM8 骨膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類において、骨膜における新生骨の形成パターンは種によって異なっており、ラットなどでは、新生骨が緻密骨表面から骨膜内へ放射状に伸展し、さらに骨膜内の血管を取り囲むようにオステオン様の構造が形成される(Enlow & Brown, 1958; Stover et al., 1992)。一方、ウシでは、大部分の骨梁が骨髄腔を中心に同心円状に配列した緻密骨が形成される。骨膜では微小血管周囲から緻密骨表面に向かって骨芽細胞系細胞が分化し、緻密骨表面で骨基質産生能を持つ成熟骨芽細胞へと最終分化した後、新生骨を形成する(Enlow & Brown, 1958; Stover et al., 1992)。このため、申請者は骨芽細胞系細胞への分化と骨基質産生を制御する骨膜の細胞外基質の分布や構成の違いによって骨膜の様々な新生骨形成パターンが形成されるものと考えられた。種々の細胞外基質が骨芽細胞の分化・増殖を促進することが *in vitro* の研究で明らかにされているが、生体内でこれらの細胞外基質の分布と骨芽細胞の分化状況や新生骨形成部位との関連性は報告されていない。申請者は、骨膜に豊富に含まれている VI 型コラーゲン (Col6) に着目し、放射状の新生骨形成を示すラットにおいては Col6 沈着部位を取り囲むようにオステオン様構造の新生骨が形成され、同心円状の新生骨形成を呈するウシの長管骨骨膜においては Col6 の沈着部位に沿って新生骨が平行に形成されることを発見した。さらに、未成熟な骨芽細胞が分布する領域では周囲結合組織内に Col6 が沈着しており、成熟骨芽細胞が分布する緻密骨表面の領域には Col6 が存在しないことを明らかにした (図 1, Kohara et al, 2015, 2016)。このことから、骨膜の Col6 が存在する領域では未成熟骨芽細胞は Col6 との接着によって成熟前の段階まで分化するが、成熟骨芽細胞への分化は抑制されており、Col6 との接着が消失すると成熟骨芽細胞へと最終分化し、緻密骨表面の Col6 が存在しない領域で新しい骨基質が産生されるのではないかと推測した。しかしながら、骨芽細胞の分化・成熟や骨基質形成に対する Col6 やその受容体である NG2 および TEM8 の機能は不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、骨膜において骨芽細胞による新生骨形成部位を決定している微小環境因子とその作用メカニズムを明らかにする研究の一環として、各分化段階の骨芽細胞における Col6 とその受容体 (NG2 と TEM8) の分化・成熟および骨基質産生能に対する作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 緻密骨骨幹部の骨膜における Col6 受容体 (NG2 と TEM8) の発現

骨膜において放射状の新生骨形成を示す成長期ラット (生後 1, 7, 10, 14, 21, 28 日齢) の大腿骨骨幹部と同心円状骨形成を示す胎生期ウシ (胎齢 1, 3, 5, 8 ヶ月、生後 1 日) の大腿骨骨幹部を採取し、4%パラフォルムアルデヒドで固定後、10%EDTA で脱灰し、パラフィン切片を作製した。用いて、2 つ新生骨形成パターンが認められる骨膜の組織学的解析を免疫組織化学にて NG2 と TEM8 の発現を検索する。

(2) 骨芽細胞の分化および骨基質産生に対する Col6 の作用

ラット新生子頭蓋骨からコラーゲナーゼ処理によって分離した未成熟骨芽細胞を Col6-coating ディッシュ上で培養し、コンフルエント後、グリセロリン酸とアスコルビン酸を加えることによって骨芽細胞の分化・成熟誘導を行った。誘導後 1, 5, 10, 15 日目に細胞を回収し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、石灰化 (アリザリンレッド法) および骨基質タンパク mRNA (RT-PCR) の発現の変化を検索した。さらに、骨芽細胞の分化・成熟誘導後 0 日、2 日、および 7 日に Col6 2.5mg/ml を添加し 72 時間培養した後、それぞれ分化・成熟誘導後 3 日、5 日、および 10 日に細胞を回収し ALP 活性および石灰化の変化を検査した。

(3) 骨芽細胞の分化および骨基質産生に対する NG2 および Col6 の作用

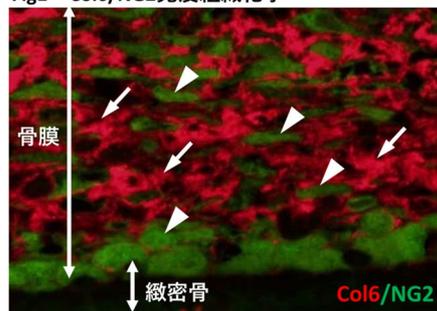
(2)と同様にラット新生子頭蓋骨から分離した未成熟骨芽細胞を用いて、レンチウイルスベクターによって NG2 shRNA および Col6a3 shRNA を細胞に導入した。継代後、細胞がコンフルエントに達した後に(2)と同様の方法で骨芽細胞の分化・成熟誘導を行い、誘導後 5 および 10 日に細胞を採取し、ALP 活性および石灰化の変化を検索した。

4. 研究成果

(1) 緻密骨骨幹部の骨膜における Col6 受容体 (NG2 と TEM8) の発現

生後 10-28 日齢のラットの大腿骨骨幹部の骨膜において、Col6 陽性部位に骨芽細胞に NG2 および TEM8 の発現が認められた。また、胎齢 3-8 ヶ月のウシ胎子の大腿骨

Fig1 Col6/NG2免疫組織化学

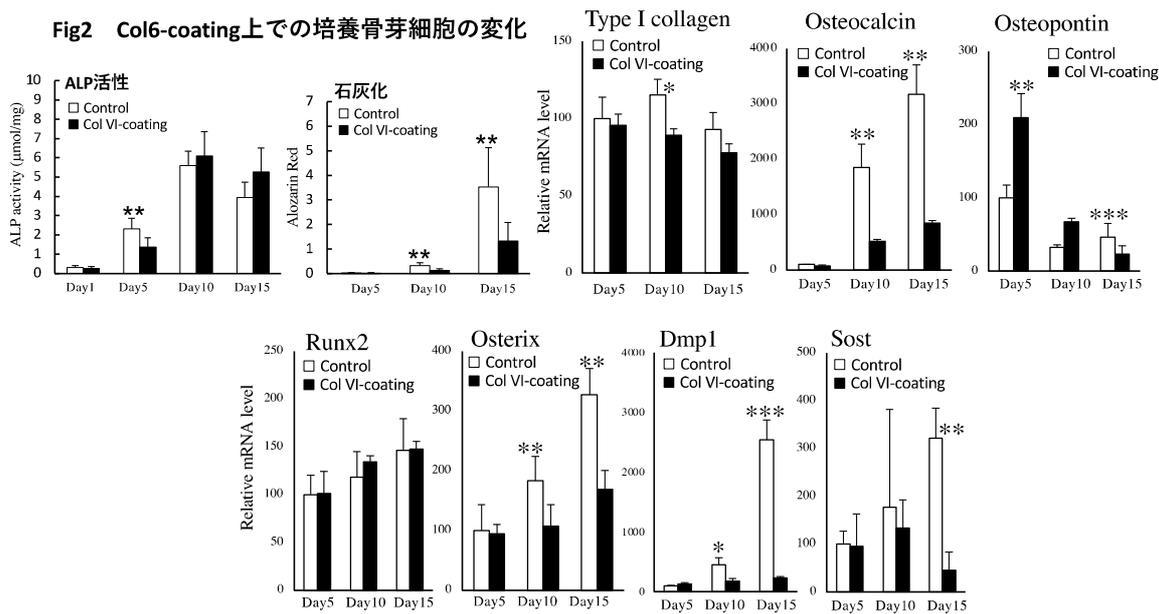


矢印：Col6陽性部位、矢頭：NG2陽性骨芽細胞

骨幹部の骨膜においても Col6 陽性部位に NG2 および TEM8 の発現が認められた (Fig1)。

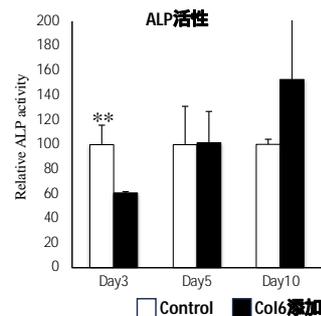
(2) 骨芽細胞の分化および骨基質産生に対する Col6 の作用

Col6-coating ディッシュ上で培養した骨芽細胞において、分化・成熟誘導後 5 日目では対照群と比較して有意な ALP 活性の減少が認められたが、10 日目および 15 日目では対照群との間に有意な差は認められなかった。また、分化・成熟誘導後 10 日目以降、有意な石灰化の減少が認められた。骨基質タンパクの発現においては、I 型コラーゲン mRNA は 10 日目で減少したが、5 および 15 日目では変化が認められなかった。また、オステオカルシン mRNA は 5、10 および 15 日目で有意に減少した。しかしながら、オステオポチン mRNA は 10 および 15 日目で有意に増加していた。さらに、骨芽細胞の分化を制御する Runx2 の発現に変化は認められなかったが、骨芽細胞の成熟を制御する Osterix の発現は、10 および 15 日目で有意に減少していた。骨細胞への分化の指標となる Dmp1 と Sost mRNA は 15 日目で有意に減少していた。(Fig2)



一方、Col6 添加においては、分化・成熟誘導後 0-3 日の 72 時間処理においては、ALP 活性は有意に減少したが、2-5 日および 7-10 日の 72 時間処理では有意な変化が認められなかった (Fig3)。

Fig3 Col6 72時間添加による ALP 活性の変化



(3) 骨芽細胞の分化および骨基質産生に対する NG2 および Col6 の作用

shRNA によって NG2 および Col6a3 遺伝子ノックダウンを行った骨芽細胞においては、分化・成熟誘導後 5 日目および 10 日目で ALP 活性の有意な減少と石灰化の有意な減少が認められた (Fig4-5)。

Fig4 NG2遺伝子ノックダウンによる変化

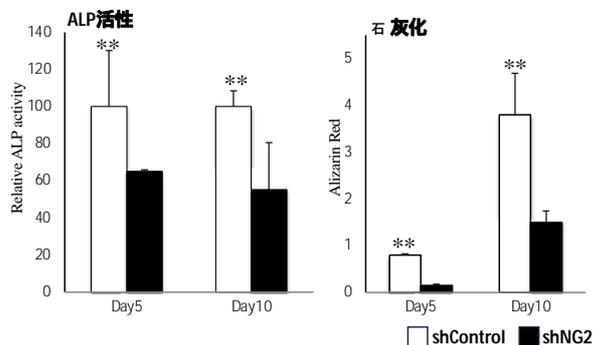
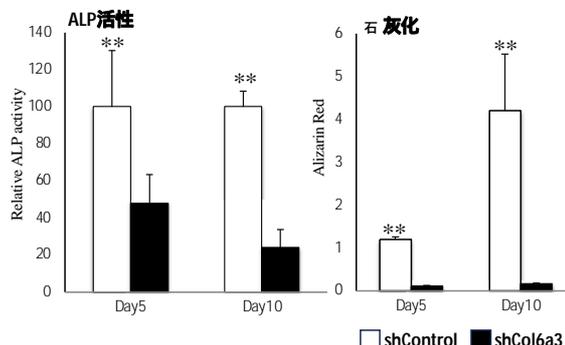


Fig5 Col6a3遺伝子ノックダウンによる変化



(4) まとめ

本研究において、骨膜で放射状の新生骨形成を示すラットおよび同心円状の新生骨形成を示すウシで、骨膜の Col6 陽性部位に Col6 受容体 NG2 および TEM8 を発現する骨芽細胞が多数認め

られた。このことから、骨膜において Col6 は NG2 や TEM8 を介して骨芽細胞の制御を行っている可能性が示唆された。骨芽細胞を Col6-coating ディッシュ上で培養し、成熟の誘導を行った *in vitro* の実験においては、Col6 との接着によって骨基質産生および石灰化が減少していたことから、Col6 は石灰化骨基質産生能を持つ骨芽細胞への成熟過程を抑制するものと考えられた。また、Col6 との接着によって、骨芽細胞の後期の成熟を促進する転写因子 Osterix の発現が抑制され、骨基質産生能を抑制する Osteopontin の発現が増加した。このため、骨芽細胞の石灰化骨基質産生の抑制は Osterix や Osteopontin の発現を制御することによってもたらされるものと考えられた。また、成熟骨芽細胞への誘導前に NG2 と Col6 遺伝子ノックダウンを行った骨芽細胞においては、成熟誘導による骨芽細胞の成熟過程が顕著に抑制された。このため、Col6 存在下では NG2 を介したメカニズムによって、骨芽細胞が成熟前の段階に維持されるものと考えられた。骨膜においては、Col6 沈着領域では小型で紡錘形の未熟な骨芽細胞が分布しており、骨膜の緻密骨表面に近い Col6 の沈着が認められない領域では成熟骨芽細胞が集族している。このため、今回の培養骨芽細胞を用いた実験結果から、骨膜においては、Col6 沈着部位に分布する骨芽細胞は成熟が抑制された状態にあり、Col6 が無い領域で成熟過程が誘導されることが示唆され、この結果 Col6 の分布領域に則して、新生骨の形成パターンが決定されるものと考えられた。今後、間葉系幹細胞から分化させた未熟な骨芽細胞を用いて、Col6 と NG2 や TEM8 の機能を検索していく予定である。また、今回、我々は Col6 が成熟骨芽細胞から骨細胞への分化を抑制することを明らかにした。骨芽細胞から骨細胞への分化を制御している細胞外基質に関しては不明な点が多く、このメカニズムを解明する上で重要な知見が得られたものと考えられる。今後、骨細胞への分化スイッチに対する Col6 の機能に着目した研究を実施していく予定である。

引用文献

Enlow, D. H. and Brown, S. O. (1958) A comparative histological study of fossil and recent bone tissues. Part II. Texas J. Sci. 9, 186-214.

Stover, S. M., Pool, P. R., Martin, R. B. and Morgan, J. P. (1992) Histological features of the dorsal cortex of the third metacarpal bone mid-diaphysis during postnatal growth in thoroughbred horses. J. Anatomy 181, 455-469.

Kohara, Y., Soeta, S., Yayoi Izu, Y. and Amasaki, H. (2015) Accumulation of type VI collagen in the primary osteon of the rat femur during postnatal development. J. Anatomy 226, 478-488.

Kohara, Y., Soeta, S., Yayoi Izu, Y., Arai, K. and Amasaki, H. (2016) Distribution of type VI collagen in association with osteoblast lineages in the groove of Ranvier during rat postnatal development. Ann. Anatomy 208, 58-68.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------