

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09857

研究課題名（和文）軟骨膜に含まれる骨軟骨前駆細胞の同定と、軟骨再生および骨損傷修復への応用

研究課題名（英文）Osteo-chondro-progenitor cell in perichondrium: Identification and application for cartilage repair.

研究代表者

宇佐美 悠 (Usami, Yu)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：80444579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝子組み換えマウスを用いた細胞系譜解析および空間トランスクリプトーム解析により、軟骨膜に存在する骨・軟骨前駆細胞の同定を試みた。細胞系譜解析では軟骨膜領域に骨嚙骨細胞へと分化する前駆細胞が確認され、空間トランスクリプトーム解析でその領域の詳細な遺伝子発現の解明を期待したが、十分な結果を得ることができなかった。動物の待機期間を利用して行なった派生研究として、遺伝性多発性骨軟骨腫症患者に生じるケロイドの形成メカニズムの解明を遺伝子組換えマウスを用いて試みたところ、線維芽細胞のアポトーシスとマクロファージによる貪食の低下がケロイド形成の機序として示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胎生期マウスの下肢を用いて空間トランスクリプトーム解析を試みたが、現時点での1スポット径やスポット間の非解析領域が大きく、シングルセル遺伝子解析には及ばないことが示された。ただし検出遺伝子数に不足はなく、現在進行形で発展している空間トランスクリプトーム解析技術が期待される。同時に行なったケロイド形成に関わる研究では、研究対象とした遺伝性多発性骨軟骨腫症のみならず特発性ケロイドに共通した異常が示されており、今後新たな治療法の開発に役立つ可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to identify the osteo-chondro-progenitor cell in perichondrium by using lineage tracing method and spatial transcriptome analysis. Although, we identified the "nichi" of osteo-chondro-progenitors in perichondrium by using lineage tracing, we fail to analyze the gene expression of the nichi by using spatial transcriptome analysis. We also tried to reveal the pathogenesis of keloid formation in Hereditary multiple osteochondromatosis patients.

研究分野：病理学

キーワード：軟骨 骨軟骨腫 ケロイド 創傷治癒

## 1. 研究開始当初の背景

軟骨・骨組織は、それぞれ、「軟骨膜」と「骨膜」に覆われている。軟骨膜は、軟骨を取り囲む線維性結合組織を主体とした組織で、軟骨基質と移行的に存在することから、軟骨膜内には、将来、軟骨を形成する軟骨前駆細胞が存在すると考えられている[1]。また、成長板軟骨に隣接する軟骨膜部分 (Ranvier's groove [2]) には、骨の成長に伴い、将来の皮質骨となる骨襟 (bone collar) と骨襟形成に関わる骨芽細胞が存在していることから、軟骨膜内には、骨芽細胞に分化し得る骨芽細胞前駆細胞 (前骨芽細胞・骨前駆細胞) さらに軟骨・骨の両系統に分化し得る骨軟骨前駆細胞 (osteochondro progenitor cell) が含まれていると考えられる[3]。しかしながら、それら前駆細胞の局在、マーカーや分化経路に関しては不明な点が多い。

申請者はこれまで、成長板軟骨を形成する前駆細胞を同定する目的で、遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析を行ってきた [4]。この遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析技術およびシングルセル遺伝子発現解析技術を用いて、軟骨膜内に存在するであろう、骨系細胞・軟骨系細胞へと分化し得る骨軟骨前駆細胞の同定とそれらの分子マーカーの探索を当初の目的とし、研究を開始した。

なお、本研究で使用する遺伝子組換えマウスが、FVB マウスであったことから、交配するマウス (C57BL/6 マウス) に近付ける (戻し交配) 必要があったため、その待機期間において派生研究として、軟骨膜 Ranvier's groove より多発性に骨軟骨腫が生じる遺伝性多発性骨軟骨腫症患者 (Hereditary multiple osteochondromatosis: HMO [5]) におけるケロイドの発生機序の解析を行った (研究の目的)。

## 2. 研究の目的

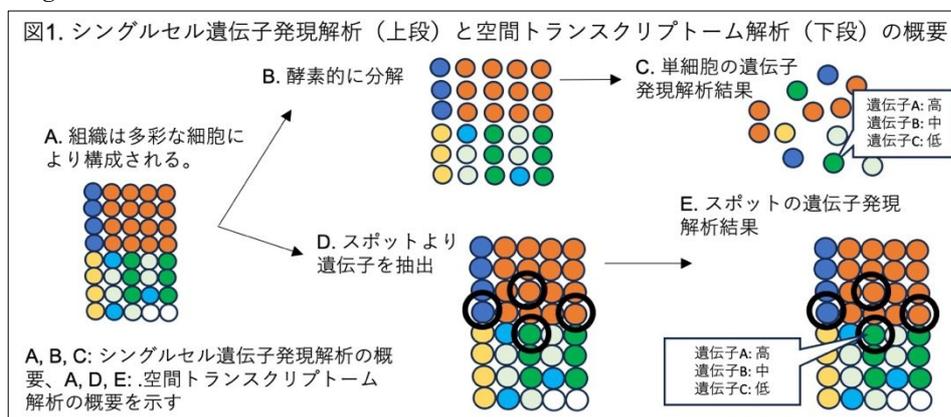
- (1) 軟骨膜 Ranvier's groove における細胞系譜解析による骨軟骨前駆細胞の同定
- (2) Ranvier's groove の軟骨膜細胞における遺伝子発現解析
- (3) 遺伝性多発性骨軟骨腫症患者に生じるケロイドの発症機序の解明

## 3. 研究の方法

- (1) 軟骨膜 Ranvier's groove における細胞系譜解析による骨軟骨前駆細胞の同定

これまでの研究から申請者は軟骨細胞の発現する 2 型コラーゲンを発現する細胞が軟骨膜の Ranvier's groove 領域し、この細胞が骨襟部の骨芽細胞に分化する可能性を考え、タモキシフェン誘導性軟骨細胞特異的 Cre 発現マウス (*Col2a1CreER* マウス) を緑色蛍光レポーターマウス (*ZsGreen* マウス) と交配し、得られた *Col2a1CreER;ZsGreen* マウスを用いて細胞系譜解析を試みた。

- (2) Ranvier's groove の軟骨膜細胞における遺伝子発現解析



研究当初は単細胞単位まで酵素的に分解した軟骨膜・骨膜細胞を用いたシングルセル遺伝子解析を行う予定であったが、本研究の目的である Ranvier's groove における骨軟骨前駆細胞の同定には解剖学的位置情報が失われる方法は不相当であると考へ、胎児膝関節を用いた空間トランスクリプトーム解析を行った (図 1)。

### (3) 遺伝性多発性骨軟骨腫症患者に生じるケロイドの発症機序の解明

本研究の対象である 遺伝性多発性骨軟骨腫症 (Hereditary multiple osteochondromatosis: HMO) は ヘパラン硫酸プロテオグリカンに関わる *Ext1* の機能欠失型変異に由来する遺伝性疾患で、全身の骨、特に成長板軟骨に隣接する軟骨膜より骨軟骨腫が生じ、頻回の手術が必要になる[5]。しかしながら、HMO 患者では、術後の皮膚に炎症性増殖疾患であるケロイドが生じることが報告された[6]。HMO 患者は骨軟骨腫切除を避けることができないため、そのケロイド形成のメカニズムの解明と HMO との関連、およびその治療法の開発が期待される。

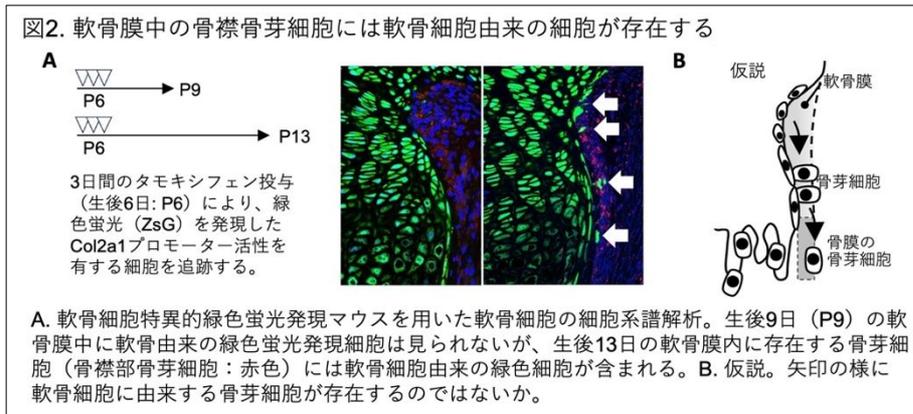
申請者は皮膚線維芽細胞に HMO の原因である *Ext1* 機能欠失型変異が起きた結果ケロイドが形成されるという仮説のもと、線維芽細胞特異的 Cre 発現マウスである *Col1a2CreER* マウスと Cre 依存性に *Ext1* の欠失が起こる *Ext1<sup>fllox</sup>* マウス[7]を交配し、タモキシフェン依存性線維芽細胞特異的 *Ext1* 欠失マウス (HMO モデルマウス) を作製し、皮膚潰瘍形成実験を通じて HMO 患者に発生するケロイドの形成メカニズムの解析を行なった。

## 4. 研究成果

(1) 軟骨膜 Ranvier's groove における細胞系譜解析による骨軟骨前駆細胞の同定

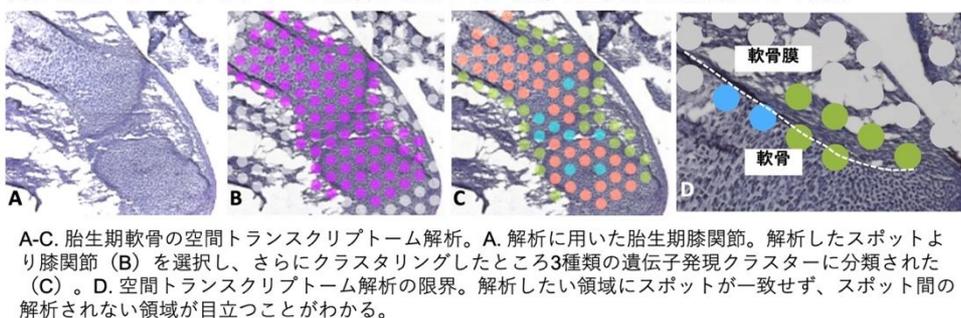
(2) Ranvier's groove の軟骨膜細胞における遺伝子発現解析

まず、タモキシフェン誘導性軟骨細胞特異的 Cre 発現マウス (*Col2a1CreER* マウス) を緑色蛍光レポーターマウス (*ZsGreen* マウス) と交配し、得られた *Col2a1CreER;ZsGreen* マウスに対して、タモキシフェンを生後 6 日 (P6 day) に投与した。投与後 3 日、7 日にマウスを安楽死せしめ、得られたマウスより組織切片を作製し (図 2A)、組織学的に解析を行なったところ、Ranvier's groove 部の軟骨組織から緑色蛍光発現が出現し、骨芽細胞系譜の細胞となる可能性が示された (図 2B)。



次に、Ranvier's groove における遺伝子発現解析を目指し、空間トランスクリプトーム解析を行なった。これまで硬組織における空間トランスクリプトーム解析の報告は少ない。遺伝子抽出までの工程の最適化を経て、遺伝子発現解析を行なったところ、検出された遺伝子数は十分であるものの、一つの空間クラスターとして解析が行われる 1 スポット (55mm 径) には多数の細胞、構造が広く含まれてしまうこと、またスポット間の解析されない領域が存在することから、Ranvier's groove といった細かな構造に着目した本研究の目的を達成できないことを見出した (図 3)。今後、同領域に対してシングルセル遺伝子発現解析を予定しており、その解析

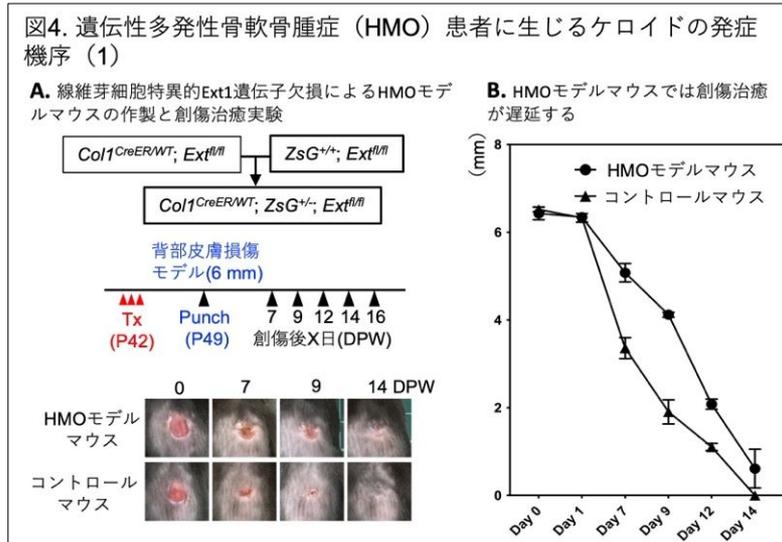
図3. 空間トランスクリプトーム解析によるマウス関節の遺伝子発現解析とその限界



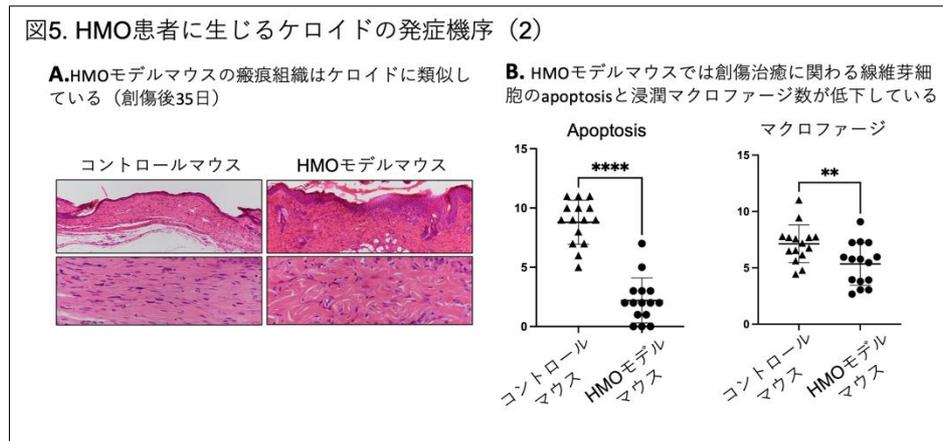
に役立つであろう。

### (3) 遺伝性多発性骨軟骨腫症患者に生じるケロイドの発症機序の解明

戻し交配に必要な待機期間に行なった、タモキシフェン誘導性線維芽細胞特異的 *Ext1* 欠失マウス (HMO モデルマウス) の作製と、皮膚潰瘍形成実験の概要を示す (図 4A)。



まず、線維芽細胞における *Ext1* の欠失が潰瘍の創傷治癒に影響するか否かを明らかにするため、経時的に潰瘍の大きさを計測し、比較したところ、*Ext1* の欠失した HMO モデルマウスでは、*Ext1* 遺伝子に異常のないコントロールマウスの創傷治癒が遅延することが示された (図 4B)。この HMO モデルマウスの潰瘍が治癒し、さらに時間の経過した瘢痕部を組織学的に解析したところ、ヒトのケロイドに出現する厚い膠原線維である keloid collagen に類似した膠原線維が見出された (図 5A)。さらに、HMO モデルマウスにおける創傷治癒が遅延し、ケロイド様病変が形成される原因について、線維芽細胞の apoptosis と組織リモデリングに必要なマクロファージ数の検討を行なったところ、HMO モデルマウスでは、創傷治癒過程に必要な apoptosis とマクロファージの浸潤が抑制されていることが示された (図 5B)。



これまで、HMO の有無に関わらず、ケロイドに存在する線維芽細胞において apoptosis が抑制されているという報告[8]もあることから、本モデルのケロイド形成メカニズムを解明することで、HMO 患者に発生するケロイドの形成メカニズムを明らかにするのみならず、特発性のケロイドの形成メカニズムの解明と新規治療法の開発に役立つ可能性が示された。

## 引用文献

- [1] Karlsson C, Thornemo M, Henriksson HB, Lindahl A. Identification of a stem cell niche in the zone of Ranvier within the knee joint. *J Anat.* 2009;215(3):355-63.
- [2] Langenskiöld A. Role of the ossification groove of Ranvier in normal and pathologic bone growth: a review. *J Pediatr Orthop.* 1998;18(2):173-7.
- [3] Kronenberg HM. The role of the perichondrium in fetal bone development. *Ann N Y*

Acad Sci. 2007;1116:59-64.

- [4] Usami Y, Gunawardena AT, Francois NB, *et al.* Possible Contribution of Wnt-Responsive Chondroprogenitors to the Postnatal Murine Growth Plate. *J Bone Miner Res.* 2019;34(5):964-974.
- [5] Pacifici M. Hereditary Multiple Exostoses: New Insights into Pathogenesis, Clinical Complications, and Potential Treatments. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(3):142-152.
- [6] Hosalkar H, Greenberg J, Gaugler RL, *et al.* Abnormal scarring with keloid formation after osteochondroma excision in children with multiple hereditary exostoses. *J Pediatr Orthop.* 2007;27(3):333-7.
- [7] Inatani M, Yamaguchi Y. Gene expression of EXT1 and EXT2 during mouse brain development. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003;141(1-2):129-36.
- [8] Bran GM, Goessler UR, Hormann K, *et al.* Keloids: current concepts of pathogenesis (review). *Int J Mol Med.* 2009;24(3):283-93.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oichi T, Kodama J, Wilson K, Tian H, Imamura Kawasaki Y, Usami Y, Oshima Y, Saito T, Tanaka S, Iwamoto M, Otsuru S, Enomoto-Iwamoto M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Nutrient-regulated dynamics of chondroprogenitors in the postnatal murine growth plate.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bone Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41413-023-00258-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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 宇佐美悠、寺本朱里、Li Li-Jie、廣瀬勝俊、豊澤悟
2. 発表標題 Role of Fibroblast-derived Heparan Sulfate Chain in Skin Wound Healing
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2024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
研究分担者	廣瀬 勝俊 (Hirose Katsutoshi) (00824898)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	犬伏 俊博 (Inubushi Toshihiro) (30550941)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	
研究分担者	波多 賢二 (Hata Kenji) (80444496)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授 (14401)	

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