

論文審査の結果の要旨

申請者名 小原 幸弘

第1章 緒言

本論文は骨膜に多く含まれる細胞外基質（ECM）の1つであり、既報の生化学的性状や Col6 α 1-欠損マウスでの VI 型コラーゲン（Col VI）の性質に着目し、Col VI が皮質骨形成過程における骨芽細胞の性状に影響を及ぼし、胎生期から成長期における正常な骨形成を制御している可能性を明らかにする目的で *in vivo* での Col VI および骨芽細胞などに関連する分子の時空間的発現性を詳細に調査し、さらに *in vitro* で骨芽細胞の培養系を用い Col VI の骨芽細胞や間葉系細胞へ時間的段階を追って及ぼす働きを初めて詳細に明らかにしたものである。

本論文の構成は、緒言である第1章から総合考察である第6章までの6章から構成されている。緒言に続く第2章では *in vivo* での皮質骨からなる長管骨の骨幹部での骨径の増加を伴う骨形成メカニズムについて、特に一次オステオン形成に着目して詳細に調査し、第3章では *in vivo* での骨端部（Groove of Ranvier : GOR）に現れる長骨の骨端部の初期成長時に見られる骨化メカニズムに着目し、Col VI および骨芽細胞などに関連する分子について詳細に調査している。次いで第4章と第5章では Col VI が骨形成時に持つ性質を明らかにするために *in vitro* での実験系を用いて第4章では、特に骨芽細胞系細胞に対する Col VI と骨形成に関連するレセプターである Neural/Glial Antigen 2 (NG2) の発現変化について、第5章では一次オステオン形成時における Col VI と Notch1（間葉系細胞の分化マーカー）や DLL1（Notch のリガンド）などと骨化の相互作用について研究調査し、最後に第6章において総合考察を行いまとめている。

第2章 成長期ラット大腿骨の一次オステオンにおける VI 型コラーゲンの局在

本章では、齧歯類の長管骨の骨幹部の骨表層における一次オステオンの形成とその形成が骨膜周囲の微小環境によって制御されている可能性を確かめるために Col VI が骨膜を構成する ECM として骨芽細胞の初期分化に関与している Col VI とその情報を受

けている NG2 間の相互作用が一次オステオン形成過程において時空的関連性を持って発現していることを免疫組織化学的に明らかにしている。すなわち、成長期ラット大腿骨骨幹部で Col VI および NG2 の発現が骨芽細胞の局在の変化に影響を及ぼしていることを明らかにしている。骨単位腔 (Osteonal cavity; OC) を取り囲む一次オステオンは 2 週齢以降明瞭となるが、OC の大きさは皮質骨外側から内側に向かって縮小し、最外側に新生した一次オステオンの OC もまた 4 週齢以降になると減少し始めることを明らかにしている。一方、骨膜の骨芽細胞層の皮質骨外側部の OC では Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)-陽性細胞が、Col VI-陽性部位に確認され、2 から 4 週齢では、RUNX2-陽性細胞数が骨芽細胞層よりも OC 部で有意に多くの NG2 陽性で且つ RUNX2-陽性細胞が存在することを明らかにしている。この時、細胞分裂は PCNA-免疫反応から OC 部で未成熟骨芽細胞に相当する RUNX2-陽性細胞に認められることを明らかにし、Col VI-陽性領域で骨芽細胞の増殖と分化が起こっていることを加えて明らかにしている。以上の結果は Col VI が OC 部での骨芽細胞性状を制御し、未成熟な骨芽細胞を維持するための微小環境を供給している可能性を明らかにし、Col VI が、一次オステオンの形成機序に強く関与する可能性を明らかにしている。

第 3 章 成長期ラット脛骨の Groove of Ranvier (GOR) における Col VI の局在

本章では GOR が長骨形成時の成長板軟骨周囲部の長軸方向への骨形成部における GOR の内層での成長板周囲における皮質骨の骨端部の薄い骨梁である bone bark 表面に並んでいる成熟骨芽細胞によって構成され、この領域の中間層が間葉系幹細胞のニッチを供給していることを結論付け、未成熟骨芽細胞から成熟骨芽細胞への分化が、骨端部における長軸方向への伸長に関与している可能性を明らかにしている。実験では Col VI と骨芽細胞分化に関連する分子を免疫組織化学的に調査し、Col VI と NG2 を共発現する骨芽細胞の局在を明らかにしている。結果として Col VI に対する免疫反応は、中間層の上部において初期に認められるが、内層および中間層の下部では認められず、一方、RUNX2 + / Osterix (OSX) 陽性の未成熟骨芽細胞は、Col VI-陽性部位に検出されたが、RUNX2 + / OSX + 成熟骨芽細胞は、Col VI-陰性部位にのみ限局して発現が認められ、RUNX2 + 細胞のほとんどが NG2-免疫反応を示すことを明らかにしている。すなわち、Col VI が GOR における終末分化前の骨芽細胞分化のために特有の微小環境を供給している可能性が明らかになり、Col VI が骨芽細胞の NG2 と相互に作用し、骨

芽細胞分化を制御している可能性を明らかにしている。

第4章 VI型コラーゲンの骨芽細胞の性状に対する作用

本章では第2-3章の結果の *in vivo* で Col VI が骨芽細胞の増殖、および骨基質を産生する成熟骨芽細胞への終末分化前の分化を制御しているであろう仮説を検証するために、*in vitro* での Col VI-coated dish 上でのラット頭蓋骨由来骨芽細胞の培養系を用いて、Col VI の骨芽細胞の性状に対する作用を調査している。結果は Col VI-coated dish 上での骨芽細胞の増殖は、non-coated dish 上での増殖と比較して有意に減少し、細胞遊走試験においても、Col VI は骨芽細胞の接触走性および運動活性を増強することを明らかにしている。さらに定量 real time RT-PCR によって骨芽細胞分化マーカーなどの発現性を調査し、Col VI-coated dish 上での骨芽細胞の培養は分化誘導後 10 と 15 日目 (Day 10 と 15) で骨芽細胞後期分化マーカーである OSX mRNA は有意に減少したが、全ての培養期間で骨芽細胞初期分化マーカーである RUNX2 mRNA は影響を受けず、これらの Col VI-coated dish 上での培養結果は Day 15 において骨化に関連する骨基質タンパク質である Dentin matrix protein 1 (DMP1)、Wnt シグナリングのアンタゴニストである Sclerostin (SOST) と破骨細胞分化誘導因子である Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) などの骨細胞マーカーの発現を有意に減少させ、骨基質産生能について Col VI-coated dish 上での培養では Day 10 と 15 における骨形成マーカーである Osteocalcin 発現性と石灰化を有意に抑制していることを明らかにした。さらに Day 5 と 10 では、骨基質タンパク質でありながら、骨芽細胞の増殖、分化および石灰化に対して負の制御因子であることが知られている Osteopontin (OPN) 発現が有意に増加していることを明らかにした。すなわち、Col VI が OSX 発現の抑制と OPN 発現の増加を介して、特に後期における骨芽細胞の分化および石灰化骨基質の産生を抑制する可能性を明らかにしている。

第5章 成長期ラット大腿骨一次オステオンにおける Notch-DLL1 相互作用

本章では骨芽細胞分化と骨形成に対して主に負の制御因子として働く Notch シグナリングが Col VI-誘導性の分化抑制経路に関与している可能性を明らかにしている。その結果 Col VI と Notch シグナリング間の関係が一次オステオン形成を制御している可能性を明らかにし、成長期ラット大腿骨骨幹部における Notch1、活性型 Notch1 (NICD)、

および Delta-like ligand 1(DLL1) を発現する骨芽細胞の局在を *in vivo* で明らかにし、さらに Col VI と骨芽細胞における Notch シグナリングとの関係性を、初代培養骨芽細胞を用いて Col VI-coated dish 上での培養における Notch1 と DLL1 mRNA 発現を調査し、明らかにしている。一次オステオンにおける Notch1、NICD および DLL1 は、OC に局在する RUNX2-陽性骨芽細胞に限局し、Notch シグナリングが骨芽細胞分化のダウンレギュレーションを介することによって、一次オステオン形成に関与する可能性を明らかにしている。すなわち、コントロールと比較して、Col VI 上での骨芽細胞培養では、Day 5 に Notch1 と DLL1 の発現が有意に増加し、Col VI が未成熟骨芽細胞の Notch1 と DLL1 の発現を刺激することで分化を抑制する可能性を明らかにしている。

第 6 章 総合考察

第 6 章では、Col VI が一次オステオンおよび GOR における皮質骨形成のために特有の微小環境を供給していることを明らかにし、未成熟な骨芽細胞が Col VI 陽性部位に認められているが、成熟骨芽細胞では Col VI 陰性部位に限局していることが認められたことから、Col VI は終末分化前の骨芽細胞分化を制御している可能性を明らかにしている。また、分化中の骨芽細胞が NG2 を発現し、NG2 と Col VI との相互作用が骨芽細胞の分化を制御している可能性と Col VI が OSX 発現を抑制し、OPN 発現および Notch シグナリングの増強を介して骨芽細胞の成熟・分化および骨基質産生を抑制している可能性を明らかにしている。すなわち、Col VI が骨芽細胞分化を抑制し、生後成長期における一次オステオンと GOR における皮質骨形成を制御している可能性を本研究がはじめて明らかにしている。

以上の成果は獣医学のみならず、医学、医科学の分野において有用な成果をもたらしており審査委員一同本論文が博士（獣医学）に値すると評価した。