

VI 型コラーゲンの骨形成に対する作用
(The effects of type VI collagen on the bone formation)

学位論文の内容の要約

獣医生命科学研究科獣医学専攻博士課程平成 24 年入学

小原 幸弘
(指導教員: 尼崎 肇)

第1章 緒言

VI型コラーゲン (Col VI) は骨膜に含まれる細胞外基質 (ECM) であり、接着することによって骨芽細胞性状を制御することが考えられている。骨芽細胞様細胞を用いた *in vitro* 研究では、初期分化に Col VI との接着が必要であることが示唆されている。加えて、Col6a1-欠損マウスでは、骨塩量と海綿骨梁の減少、および皮質骨におけるコラーゲン配列の異常が観察される。したがって、Col VI は胎生期から成長期にかけての正常な骨形成に重要な役割を果たすことが推測される。様々な細胞種で Col VI は細胞膜上の Neural/Glial Antigen 2 (NG2) と相互に作用し、細胞増殖、伸展、および遊走を促進する。しかしながら、骨形成における Col VI の詳細な役割は不明である。

本研究は、骨芽細胞の性状と骨形成に対する Col VI の機能を明らかにすることを目的とした。まず、成長期ラット長管骨の骨形成部位である骨膜および Groove of Ranvier (GOR) における Col VI と NG2 を発現する骨芽細胞との時空的関連を明らかにすることを計画した。次に、骨芽細胞の性状に対する Col VI-NG2 相互作用をラット頭蓋骨由来の培養骨芽細胞を用いて調査した。

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

齧歯類では、長管骨骨幹部は骨表層に一次オステオンを形成することで径が増大する。この骨形成過程は骨膜の微小環境によって制御されているものと考えられる。Col VI は骨膜を構成する ECM であり、骨芽細胞の初期分化に関与する。しかしながら、Col VI および NG2 の膜性骨化における詳細な役割は明らかでない。本章では、

Col VI-NG2 相互作用と一次オステオン形成との時空的関連を明らかにするために、免疫組織化学によって成長期ラット大腿骨骨幹部における Col VI および NG2 を発現する骨芽細胞の局在を調査した。Osteonal cavity を取り囲む一次オステオンは 2 週齢以降に明瞭に認められた。Osteonal cavity の大きさは皮質骨外側から内側に向かって縮小した。さらに、最外側に新生された一次オステオンの osteonal cavity は 4 週齢以降に減少しはじめた。免疫組織化学によって、osteonal cavity の ECM に Col VI が局在することが明らかとなったが、骨膜骨芽細胞層には局在しなかった。Osteonal cavity が縮小すると同様に、Col VI-陽性面積は外側から内側に向かって縮小した。皮質骨外側の osteonal cavity では、Runx2-related transcription factor 2 (RUNX2)-陽性細胞が Col VI-陽性部位に確認された。2 から 4 週齢では、RUNX2-陽性細胞数は骨芽細胞層よりも osteonal cavity に有意に多かった。これらの RUNX2-陽性細胞のほとんどは NG2-免疫反応を示した。さらに、PCNA-免疫反応は osteonal cavity の RUNX2-陽性細胞に認められた。以上のことから、Col VI-陽性領域で骨芽細胞の増殖と分化が起こることが示唆された。したがって、Col VI は osteonal cavity で骨芽細胞性状を制御する特有の微小環境を供給することが考えられた。Col VI と NG2 の相互作用は骨芽細胞の性状を制御し、一次オステオンの形成機序に関与する可能性が考えられた。

第 3 章 成長期ラット脛骨の Groove of Ranvier における VI 型コラーゲンの局在

GOR は成長板軟骨周囲の骨形成部位であると考えられている。GOR 内層は成長板周囲の皮質骨骨端部の薄い骨梁である bone bark 表面に並ぶ成熟骨芽細胞によって

構成される。さらに、未分化間葉系細胞で構成される中間層は間葉系幹細胞ニッチを供給する。これら一連のエビデンスによって、GOR では未成熟骨芽細胞が成熟骨芽細胞へと分化することにより、骨端部の皮質骨が新生され、長軸方向への伸長が起こることが推測される。本章では、GOR における Col VI と骨芽細胞分化との時空的関連を明らかにするために、免疫組織化学によって成長期ラット脛骨近位端における Col VI と NG2 を発現する骨芽細胞の局在を調査した。Col VI-免疫反応は中間層の上部に認められたが、内層および中間層の下部には認められなかった。RUNX2 + / Osterix (OSX) – 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いた。RUNX2 + 細胞のほとんどが NG2-免疫反応を示した。これらの結果から、Col VI は 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することが示唆された。Col VI は骨芽細胞に発現する NG2 と相互に作用し、骨芽細胞分化を制御している可能性が考えられた。

第4章 VI型コラーゲンの骨芽細胞の性状に対する作用

第2-3章の結果から Col VI との相互作用が骨芽細胞の増殖、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可能性が高いことが考えられる。本章では、この仮説を検証するために、Col VI-coated dish 上でのラット頭蓋骨由来骨芽細胞の培養を行い、Col VI の骨芽細胞の性状に対する作用を調査した。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た。細胞遊走試験では、Col VI は骨芽細胞の接触走性および運動活性を増強した。

定量 real time RT-PCR によって分化マーカーの発現を調査すると、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) に OSX mRNA が有意に減少したが、全ての培養期間で RUNX2 mRNA は影響を受けなかった。Col VI-coated dish 上での培養は Day 15 において Dentin matrix protein 1、Sclerostin と Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand などの骨細胞マーカーの発現を有意に減少させた。骨基質産生能に関しては、Col VI-coated dish 上での培養は Day 10 と 15 における Osteocalcin 発現と石灰化を有意に抑制した。しかしながら、Day 5 と 10 における Osteopontin (OPN) 発現は有意に増加した。骨芽細胞分化過程において、OSX は後期分化を促進し、OPN は細胞増殖、分化および石灰化に対して負の制御に働く。したがって、本研究の結果は 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ことが示唆された。

第 5 章 成長期ラット大腿骨一次オステオンにおける Notch1-Dll1 相互作用

Notch シグナリングは RUNX2 転写活性の抑制を介する骨芽細胞分化と骨形成に対する主要な負の制御因子である。第 4 章で Col VI が骨芽細胞分化を抑制することが明らかとなったことから、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が推測される。しかしながら、Col VI に関連する骨芽細胞制御に関する Notch シグナリングの機能は明らかでなく、Notch シグナリングが一次オステオン形成を制御しているかどうか不明である。本章では、Notch シグナリングと一次オステオン形成との時空的関連を明らかにするために、免疫組織化学によって成長期ラ

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調査した。また、Col VI が骨芽細胞の Notch シグナリングを制御するかどうかを確かめるために、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 発現を調査した。一次オステオンにおける免疫組織化学によって、Notch1、NICD および DLL1 は osteonal cavity に局在する RUNX2-陽性骨芽細胞に限局していることが明らかとなった。したがって、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して一次オステオン形成に関与する可能性が考えられた。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た。これらの結果から Col VI は未成熟骨芽細胞の Notch1 と DLL1 の発現を刺激することで分化を抑制することが示唆された。

結論として、本研究では 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することが明らかとなった。未成熟な骨芽細胞が Col VI 陽性部位に認められる一方で、成熟骨芽細胞は Col VI 陰性部位に限局していたことから、Col VI は終末分化前の骨芽細胞分化を制御することが示唆された。これらの骨芽細胞は NG2 を発現しており、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ことが示唆された。加えて、*in vitro* 研究では、Col VI が OSX 発現の抑制、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することが示唆された。これらの結果から、Col VI は骨芽細胞分化

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ことが考えられた。