

論 文 内 容 要 旨

題目 Hypertrophic Chondrocytes in the Rabbit Growth Plate Can Proliferate and Differentiate into Osteogenic Cells when Capillary Invasion Is Interposed by a Membrane Filter

(成長軟骨板において膜フィルターで血管侵入を阻害すると肥大軟骨細胞は増殖し骨芽細胞様細胞に分化する。)

著者 Tetsuya Enishi, Kiminori Yukata, Mitushiko Takahashi, Ryosuke Sato, Koichi Sairyō, Natsuo Yasui

平成 26 年 8 月発行 PLoS One 第 9 巻 第 8 号に発表済

内容要旨

成長軟骨板に存在する肥大軟骨細胞は肥大した後、アポトーシスを来たし、骨髄腔側からの血管侵入に伴い破骨細胞や骨芽細胞が侵入し、軟骨組織が骨組織に置換されると考えられている。申請者は哺乳類の肥大軟骨細胞は成長軟骨板において、血管侵入や細胞侵入を防ぐことにより細胞死から免れ、骨芽細胞に分化するという仮説を立てた。対象と方法は、日本白色家兎の尺骨遠位成長軟骨板の肥大軟骨細胞層にフィルターを外科的に挿入し、血管侵入及び細胞侵入を物理的に阻害した。約 8 日後家兎を屠殺し尺骨遠位部を摘出し、組織切片及び電子顕微鏡用超薄切片を作成した。組織切片を観察し、フィルターが成長軟骨板に血管侵入や細胞侵入を物理的に阻害できていることを確認した。また、TRAP 染色にて破軟骨細胞が成長軟骨板へ侵入する事をフィルターで阻害できていることを確認した。トルイジンブルー染色で、対側の尺骨遠位部の成長軟骨板と比較し手術側は成長軟骨板の幅が拡大していた。成長軟骨板の幅を、画像解析ソフトを用いて計測すると、増大は肥大軟骨細胞層に生じていた。増大した肥大軟骨細胞の最もフィルター側で、肥大軟骨細胞は caspase-3 陰性で PCNA 陽性細胞であることを免疫染色で確認した。肥大軟骨細胞の形態変化を電子顕微鏡で観察すると細胞は扁平化し、細胞径は減少していた。細胞内小器官は発達し典型的なアポトーシス像ではなく、活発なタンパク合成を示唆する所見であった。この分化転換した細胞の機能をタンパクレベルでは免疫染色

様式(8)

を用い、また遺伝子発現は *in situ hybridization* を用いて観察すると、分化の進行に伴い、肥大軟骨細胞は軟骨基質である II 型コラーゲンや X 型コラーゲンではなく、骨基質である I 型コラーゲン、オステオネクチン、及びオステオカルシンの発現が確認された。以上より、成長軟骨板において、血管侵入と細胞侵入をフィルターで物理的に阻害すると、肥大軟骨細胞は細胞死せずに増殖し軟骨基質ではなく骨基質を産生する骨芽細胞様細胞に分化する事が示された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

報告番号	甲医第1223号	氏名	江西 哲也
審査委員	主査 香美 祥二 副査 福井 義浩 副査 二川 健		

題目 Hypertrophic Chondrocytes in the Rabbit Growth Plate Can Proliferate and Differentiate into Osteogenic Cells when Capillary Invasion Is Interposed by a Membrane Filter

(成長軟骨板において膜フィルターで血管侵入を阻害すると肥大軟骨細胞は増殖し骨芽細胞様細胞に分化する。)

著者 Tetsuya Enishi, Kiminori Yukata, Mitushiko Takahashi, Ryosuke Sato, Koichi Sairyo, Natsuo Yasui
 平成26年8月発行 PLoS One 第9巻第8号 e104638 に発表済
 (主任教授 西良 浩一)

要旨 成長軟骨板に存在する肥大軟骨細胞は肥大後アポトーシスを来たす。その後骨髄腔側からの血管侵入に伴い破骨細胞や骨芽細胞が侵入し、軟骨組織が骨組織に置換されると考えられている。申請者は、哺乳類の肥大軟骨細胞は成長軟骨板において血管侵入や細胞侵入が阻害されると細胞死から免れ、骨芽細胞に分化するという仮説を立てた。本研究では、尺骨遠位成長軟骨板の肥大軟骨細胞層にフィルターを挿入し、血管侵入及び細胞侵入を物理的に阻害した家兎モデルを用いて肥大軟骨細胞の分化を検討した。得られた結果は以下の通りである。

- ① フィルター挿入群では対照群と比較して、成長軟骨板の幅は増大した。組織像では肥大軟骨細胞層の著明な増大が確認された。また、フィルター挿入群では肥大軟骨細胞層末端部の細胞

径が小さくなり、その周囲の細胞外基質は軟骨基質とは異なる染色性を示した。X線画像では、骨の長径の長さはフィルター挿入後 8 日間で対照群と比較して、有意な差は見られなかった。

- ② 細胞死及び細胞増殖の解析にて、対照群では肥大軟骨細胞死が見られたが、フィルター挿入群では肥大軟骨細胞死はほとんど認められなかった。さらに、フィルター挿入群では PCNA 染色陽性の細胞を多く認め、細胞死を免れた肥大軟骨細胞が増殖していると考えられた。
- ③ 細胞外基質成分の解析にて、フィルター挿入群では肥大軟骨細胞が軟骨基質ではなく、骨基質を産生している細胞に分化転換している事が示された。対照群では、肥大軟骨細胞は軟骨基質を産生していた。

以上の結果から、血管侵入と細胞侵入を物理的に阻害すると肥大軟骨細胞は成長軟骨板において骨芽細胞様細胞に分化することが示された。本研究は、内軟骨骨化とは別の新しい骨形成機構を示唆したものであり、学位授与に値すると判定した。