



Title	Time-lapse observation of the dedifferentiation process in mouse chondrocytes using chondrocyte-specific reporters
Author(s)	峯岸, 芳樹
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34159
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	峯岸 芳樹
論文題名 Title	Time-lapse observation of the dedifferentiation process in mouse chondrocytes using chondrocyte-specific reporters. (軟骨特異的レポーター遺伝子を有するマウス軟骨細胞の脱分化過程タイムラプス撮影解析)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕 組織工学的手法の発達により再生医療には大きな注目が集まっており、軟骨組織においては自家軟骨細胞移植が変形性膝関節症、小耳症等の疾患で今後の治療応用が期待される。しかしながら細胞数を増やすために、生体から採取した初代軟骨細胞の単層培養を行うと、細胞が分裂・増殖していくとともに線維芽細胞様の形態をした細胞が大部分を占めるようになる。一般的にはこれは軟骨細胞が脱分化したものであると考えられるが、軟骨細胞採取の際に混入した線維芽細胞が優位に増殖した結果である可能性があり、その起源については今まで明らかにされていなかった。我々はlineage tracingの手法を使い、軟骨特異的レポーター遺伝子を有するマウスから採取した軟骨細胞の単層培養を行いタイムラプス撮影することで、細胞形態と蛍光タンパク質発現の経時的变化を観察し、線維芽細胞様細胞の起源を解析した。また軟骨細胞の脱分化と細胞分裂・増殖との関係を明らかにするため軟骨細胞の増殖を停止させ、その際におこる細胞の形態変化と蛍光タンパク質の発現の様子をタイムラプス撮影し、解析した。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 11型コラーゲンが現在発現している（今まさに軟骨である）部位でGFPが発現する<i>Col11a2-EGFP</i> Tgマウスと11型コラーゲンが現在もしくはかつて発現していた（今軟骨である、もしくはかつて軟骨であった）部位でYFPが発現する<i>Col11a2-Cre; R26-stop^{flax}-EYFP</i> Tgマウスを交配により作成した。 それぞれのマウスの3週齢時の下肢骨では大腿骨頭、膝関節軟骨、成長板軟骨で蛍光性を認めた。また膝関節周囲の凍結切片では共に関節軟骨、成長板軟骨で蛍光性を認め、半月板・滑膜・筋・脂肪・皮膚では蛍光性を認めなかった。また各々の出生後マウスから採取した線維芽細胞を培養したところ、線維芽細胞では蛍光性を認めなかった。 それぞれのマウス系統から採取した軟骨細胞の初代培養を行い、タイムラプス撮影を行った。<i>Col11a2-EGFP</i> Tgマウスから採取した軟骨細胞の初代培養では、細胞が分裂し、増殖していくに伴ってGFPの蛍光性は徐々に失われていった。それに対して<i>Col11a2-Cre; R26-stop^{flax}-EYFP</i> Tgマウスから採取した軟骨細胞の初代培養では細胞が増殖してもYFPの蛍光性は失わなかった。この初代軟骨細胞培養2日目と6日目の細胞を回収してreal time PCR解析を行ったところ、時間が経過するにつれて軟骨マーカーである<i>Col2a1</i>、<i>Col11a2</i>、<i>aggrecan</i>、<i>Sox5/6/9</i>が低下していくのに対して、線維化のマーカーである<i>Col1a1</i>は増加していく傾向を認めた。以上より初代軟骨細胞培養で細胞数が増殖していく際には線維芽細胞様細胞が増殖するが、その細胞の起源は確かに軟骨細胞であることが明らかとなった。 またマイトマイシンC (MMC)を用いて細胞増殖を停止させた状態で、細胞形態と蛍光性の変化をタイムラプス撮影で解析した。MMCを用いて細胞増殖を停止させた状態でも、<i>Col11a2-EGFP</i> Tgマウスおよび<i>Col11a2-Cre; R26-stop^{flax}-EYFP</i> Tgマウスより採取した軟骨細胞の蛍光性の経時的な変化は、細胞増殖を停止させていない時と比較して明らかな相違を認めなかった。細胞形態は著名に肥大し、扁平化していた。培養2日目と6日目の培養細胞をreal time PCR解析を行ったところ<i>Col2a1</i>、<i>Col11a2</i>、<i>aggrecan</i>、<i>Sox5/6/9</i>が低下していき、<i>Col1a1</i>は増加していく傾向を認めた。細胞増殖を停止させていない時と比較して明らかな相違はなかった。このことより軟骨細胞の分裂と脱分化には関係がないと考えられた。 〔総 括(Conclusion)〕 初代軟骨細胞培養を単層培養で行った際に増殖する線維芽細胞様細胞の起源は、培養当初から混在した線維芽細胞ではなく、軟骨細胞に由来し、脱分化を起こした軟骨細胞であった。また軟骨細胞は細胞分裂せずとも脱分化することが判明した。本実験のlineage tracingの手法を用いた解析法は軟骨細胞の脱分化・再分化を観察するためには非常に有効な方法であり、軟骨細胞の脱分化抑制や再分化促進といった再生医療研究に有用なツールとなりうる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 峯岸 芳樹		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 細川 夏
	副 査	大阪大学教授 吉川 秀樹
	副 査	大阪大学教授 大園 恵一

論文審査の結果の要旨

軟骨細胞を細胞数を増やすために単層で初代培養した際には培養皿がconfluentに近づくにつれて次第に繊維芽細胞様細胞が多数を占めることが知られているが、この繊維芽細胞様細胞の起源は明らかではなかった。本研究では2つの系統のマウスで軟骨培養を行い、time-lapse撮影で観察し、それぞれのマウス系統間の差異をもとめることで、繊維芽細胞様細胞が脱分化した軟骨細胞であることを明らかにしている。また細胞増殖に関係なく軟骨細胞は脱分化することを示した。

今回用いた手法は軟骨細胞の分化抑制や脱分化した軟骨細胞の再分化の研究や内軟骨性骨化のメカニズムの解明に今後役立つと考えられる。

以上より本研究内容は博士（医学）の学位授与に値する。