OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	成長板軟骨の成長に関わるWnt シグナル反応軟骨前駆細胞の解析
Author(s)	宇佐美, 悠
Citation	大阪大学歯学雑誌. 2022, 66(2), p. 11-16
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/93188
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

阪大歯学誌　66(2)：11 ～ 16，2022

成長板軟骨の成長に関わる Wnt シグナル反応軟骨前駆細胞の解析

宇佐美　悠*

（令和 4 年 4 月 19 日受付）

はじめに

長管骨は，解剖学的に骨幹と骨幹端および骨端に分けられ，骨端には，端より，関節軟骨，二次海綿骨（二次骨化中心）が存在し，骨幹端の一次海綿骨（一次骨化中心）と二次海綿骨との間に成長板軟骨が存在する。成長板軟骨は，四肢の長管骨のみならず，肋骨や頭蓋底の骨などにも存在し，それらの骨の形成と成長に重要な役割を果たしている[2)]。成長板軟骨の主たる役割は，骨の長軸方向の成長，横幅の成長と，将来形成される骨組織に重要な環境を提供することである。成長板軟骨は軟骨細胞の形態的・機能的な特徴により，平坦な休止細胞層，増殖細胞層，前肥大細胞層，肥大細胞層に分けられる。休止細胞層の軟骨細胞は，増殖細胞層に至ると細胞分裂を繰り返し，その後，カラム状に配列する。カラム状となった軟骨細胞は軟骨基質の産生を通じて，その細胞容積を増し，前肥大軟骨細胞から肥大軟骨細胞へと分化・成熟することで持続的な縦軸方向への成長を可能にしている。この軟骨細胞による基質の産生は，間質成長（interstitial growth：軟骨組織内の各々の細胞が周囲に基質を産生した結果おこる成長の様式）に重要である。肥大軟骨細胞へと分化した細胞は，成長板軟骨末端の軟骨と海綿骨の境界においてアポトーシスを経て，骨細胞へと置き換わると考えられてきたが，最近の研究では，肥大軟骨細胞が，直接，海綿骨や皮質骨における未分化な骨細胞に変化する，といったことも報告されている[3-5)]。一方，長管骨の成長には縦方向の成長のみならず，横方向への成長，すなわち幅の成長も重要である。この横方向への成長は，軟骨膜直下に存在する軟骨細胞が分化・成熟することで基質を産生し，さらに軟骨膜から新たな細胞が供給され，同様に分化・成熟することにより成長する付加型成長（appositional growth）が関わっていると考えられている。

では，この成長板軟骨の成長に関与する軟骨前駆細胞（chondroprogenitor）はどこに存在し，どの様に軟骨形成に関与しているのであろうか。これまでの研究では，成長板の成長に重要な軟骨前駆細胞は，いくつかの領域に存在しているとされている。成長板軟骨の縦方向の成長には，成長板軟骨上端に位置する休止細胞層に存在する成長板軟骨前駆細胞が関与していることが示されている[6)]。その一方で，成長板軟骨の横方向の成長には，成長板軟骨を取り囲む軟骨膜が存在する軟骨のくびれ（Ranvier's groove）に軟骨前駆細胞が存在すると考えられているが，その詳細は依然として明らかになっていない[7)]。

Beta-catenin は，Wnt/β-catenin シグナル経路において重要な役割を果たし，様々な臓器・器官の発生のみならず，成長後も再生・修復や恒常性の維持に深く関わっている[2)]。成長板軟骨において，異常 β-catenin を介した Wnt シグナルの非活性化は，軟骨の形成を阻害し，形態学的，機能的な異常を引き起こすことが示されていることから，筆者は，Wnt/β-catenin シグナルが成長板軟骨の軟骨前駆細胞の維持に関与していると考

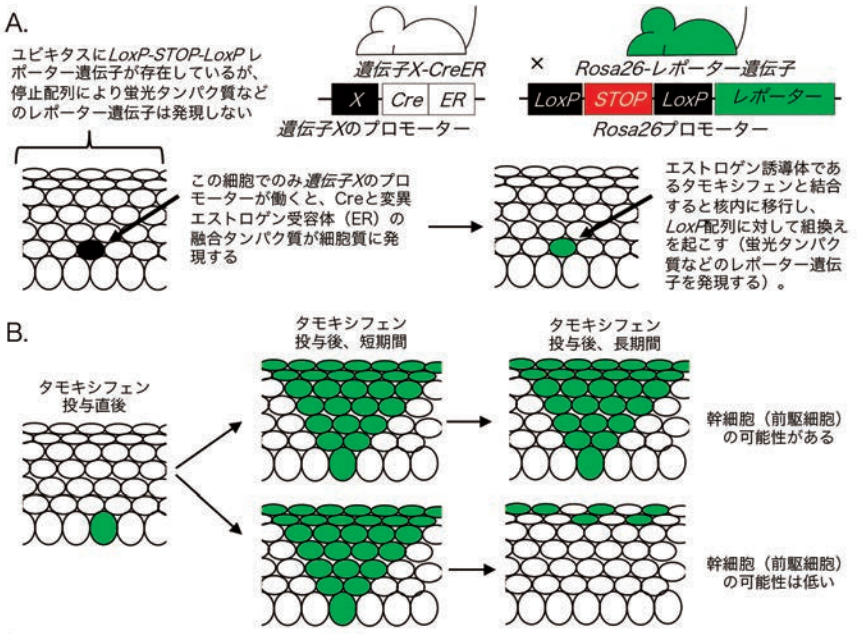
＊　大阪大学大学院歯学研究科　顎口腔病因病態制御学講座（口腔病理学教室）

本総説の内容の一部は，令和 4 年 2 月 10 日に開催された第 132 回大阪大学歯学会例会において，第 24 回大阪大学歯学会弓倉学術賞の受賞講演（対象論文：Possible contribution of Wnt-responsive chondroprogenitors to the postnatal murine growth plate[1)]）として発表した。

え，Wnt の調整を受ける細胞（Wnt/β-catenin signaling responsive cells（以下，Wnt シグナル反応細胞）[8]）を可視化し，軟骨幹細胞を同定することを試みた[9,10]。

材料と方法

本研究では，Wnt シグナル反応細胞に着目した細胞系譜解析（linage tracing）を行うため，Wnt/β-catenin シグナルの標的遺伝子である *Axin2* のプロモーターの下流でタモキシフェン依存性 Cre を発現する *Axin2*^{CreERT2} マウスを，ユビキタスに外来性遺伝子の発現を許す *ROSA26* 遺伝子座内に，転写を停止させる配列を *LoxP* 配列で挟み，その下流に *ZsGreen* 遺伝子をノックインした *Rosa26ZsGreen*（*ZsGeen*）マウスと交配することで得られた，*Axin2*^{CreERT2}; *ZsGeen* マウスを中心に細胞系譜解析を行った。本マウスでは，タモキシフェンの存在下（標識したい時期に腹腔内投与する）で，かつ，Wnt シグナルが活性化している状況でのみ，*Cre-LoxP* 組み換えが起こり，ZsGreen が発現する。一度起こった組み換えは，以後解除されることなく，ZsGreen 発現は子孫細胞まで維持されるため Genetic lineage tracing とも呼ばれる。また，必要に応じ，軟骨細胞特異的プロモーターである *Col2* プロモーターの下流でタモキシフェン依存性 Cre を発現する *Col2*^{CreERT} マウスを *Rosa26tdTomato*（*RFP*）マウスと交配することで得られた，*Col2*^{CreERT}; *RFP* マウスも使用した。さらに，*Axin2*^{CreERT2} マウスで追跡した細胞において *β-catenin* の作用をタモキシフェン依存性に阻害する目的で，*Axin2*^{CreERT2}; *β-catenin*$^{fl/wt}$ マウスと *β-catenin*$^{fl/fl}$; *ZsGreen* マウスを交配し，得られた *β-catenin*$^{fl/fl}$; *Axin2*^{CreERT2}; *ZsGreen* マウスを用いての解析も行った。細胞系譜解析の基本的な考え方とレポーターマウスの特徴等を図 1 に示す。



C.

マウス	特徴	抗体	その他	Jackson ID
B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor$^{tm6(CAG-ZsGreen1)Hze}$/J 別名 Ai6	ZsGreenマウス。強い緑色蛍光を発現する	なし	EGFPの8倍以上強い蛍光。パラフィン包埋切片においても蛍光が検出される。100度を超える熱処理、トリプシン処理などで蛍光が低下・消失。	007906
B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J 別名 mTmG	Rosa26遺伝子を発現する細胞にRFPが発現し、Cre-LoxP配列の組み換えによりEGFPを発現する。	あり（GFPとRFPの区別に注意）	細胞質に発現（nTnGは核に発現）。このマウスを用いることで、Rosa26遺伝子領域が活性化していないという可能性を否定できる（通常、レポーターの蛍光発現がない場合に、Rosa26の活性が低い可能性を否定することは難しい）。	007676
B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J 別名Ai9	RFPマウス。強い赤色蛍光を発現する。	あり	凍結切片のみで蛍光を観察可能。パラフィン包埋後、RFPに対する免疫染色で検出可能。	007909

図 1．タモキシフェン依存性 Cre-LoxP システムを用いた細胞系譜解析

A．タモキシフェン依存性 Cre-LoxP システムの概要。B．細胞系譜解析の考え方。便宜的に上皮をモデルとして使用している。C．Cre-LoxP システムを利用した細胞系譜解析にしばしば用いられるレポーターマウス。

結果

Ranvier's groove 付近に見られる Wnt シグナル反応細胞は付加型成長を通じて成長板軟骨を形成する

生後 6 日にタモキシフェンを腹腔内に投与した仔マウスの脛骨における Wnt シグナル反応細胞の局在を組織学的に解析したところ，生後 9 日（タモキシフェン投与後 3 日）では，成長板軟骨辺縁の Ranvier's groove 付近に ZsGreen を発現する Wnt シグナル反応細胞の集団が認められた。その後，経時的にその細胞集団は成長板軟骨辺縁部に拡大し，辺縁部分で成長板軟骨のカラム構造を形成した。さらにそれら ZsGreen 陽性細胞集団は，タモキシフェン投与後 2 ヶ月以上経過しても成長板軟骨辺縁部を占拠していたことから，生後 9 日に認められた Ranvier's groove 付近の細胞集団が，成長板軟骨辺縁部における軟骨細胞前駆細胞であることが示された（図 2）。

タモキシフェン投与後 3 日（生後 9 日）に認められた Ranvier's groove 付近の細胞集団を，より詳細に解析したところ，ZsGreen 陽性細胞はトルイジンブルー陽性の軟骨基質内と，そのすぐ外側の軟骨膜付近に存在していることが明らかとなった（図 3A）。これまでの形態学的な解析では，血管等が存在する軟骨膜に成長板軟骨細胞の前駆細胞が存在すると考えられてきた[7,11,12]。そこで，軟骨膜部分の ZsGreen 陽性細胞が成長板軟骨を形成するのか，あるいは成長板軟骨最外側の軟骨基質内に存在する ZsGreen 陽性細胞が成長板軟骨を形成するか，を検討するため，軟骨細胞を広く標識可能な *Col2*^{CreERT} システムを用いて同じ時期にタモキシフェンを投与し，陽性細胞の分布を *Axin2*^{CreERT2} システムと比較した。この実験では，軟骨基質内に前駆細胞が存在する場合は，初めに標識される細胞に前駆細胞が含まれていると予想されるため，成長板は長期

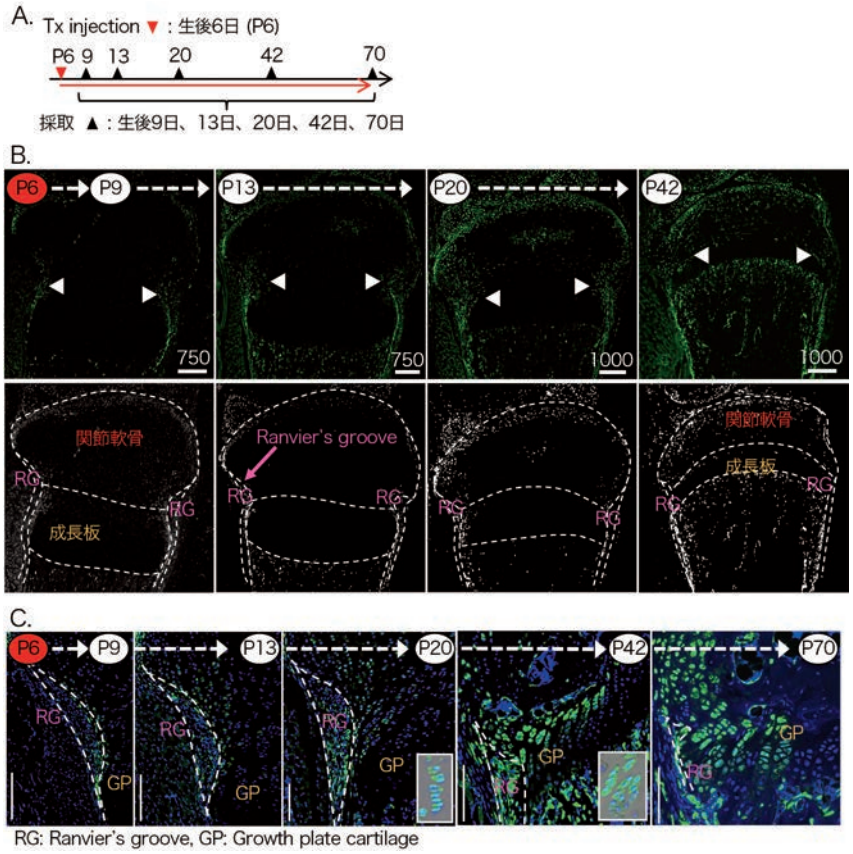


図 2. *Axin2*^{CreERT2}*; ZsGreen* の軟骨組織における Wnt シグナル反応細胞の局在

A. タモキシフェン（Tx）の投与と組織採取スケジュール。Tx は生後 6 日（P6 と表記）に腹腔内に投与され，その後，経時的に組織を採取し解析した。B. 脛骨における ZsGreen 陽性細胞の分布と経時的変化。脛骨近位骨端部の矢状断を示す。RG: Ranvier's groove。白矢頭の領域に ZsGreen 陽性細胞の集団が見られる。C. Ranvier's groove 領域の拡大。RG: Ranvier's groove, GP: growth plate。Tx 投与後（P6），Ranvier's groove 付近に存在した ZsGreen 陽性細胞は成長板軟骨の辺縁部を形成している。

間，子孫細胞により標識されるはずである。一方，軟骨膜内に前駆細胞が存在する場合は，タモキシフェン等により前駆細胞は標識されないため，長期間の観察において，非標識細胞が成長板軟骨辺縁に出現すると考えられる（図 3B）。*Axin2*^{CreERT2} システムで行ったタモキシフェン投与，組織採取スケジュールと同じ方法で，解析したところ，タモキシフェン投与後長期間の観察においても非標識細胞は認められなかったことから，成長板軟骨の辺縁部分を形成する前駆細胞は，軟骨基質内に存在する成長板軟骨最外側の扁平な細胞であることが考えられた（図 3A）。なお，ここでは詳細は示さないが，これらの細胞は軟骨基質内に存在するにもかかわらず Sox9 タンパクの発現が検出されず，軟骨細胞としての分化は低いと考えられた。さらに，DNA 合成時に核内に取り込まれる EdU にて細胞を標識したところ，これら成長板軟骨最外側の ZsGreen 陽性細胞では長期に渡り，EdU の残存が見られた。EdU にてラベルした細胞は，分裂を重ねるごとにその発現が減少することから，これら成長板軟骨最外側の ZsGreen 陽性細胞は分裂能の低い slow-cycling cell であり，幹細胞としての性質を有していることが示された。さらに同様の ZsGreen 陽性 Wnt シグナル反応細胞は，大腿骨，尺骨，橈骨といった長管骨のみならず，脊椎や肋骨，頭蓋底の軟骨縫合においても，その成長板軟骨最外側に認められ，経時的に成長板軟骨を形成するに至った。骨格の成長が完了する成獣においてタモキシフェンを投与したところ，仔マウスと同様，Ranvier's groove 付近の成長板軟骨最外側に ZsGreen 陽性細胞集団が出現するものの，成長板軟骨への拡大は見られないことからも，この ZsGreen 陽性の Wnt シグナル反応細胞は，成長板軟骨辺縁の付加型成長に関わっていると考えられた。

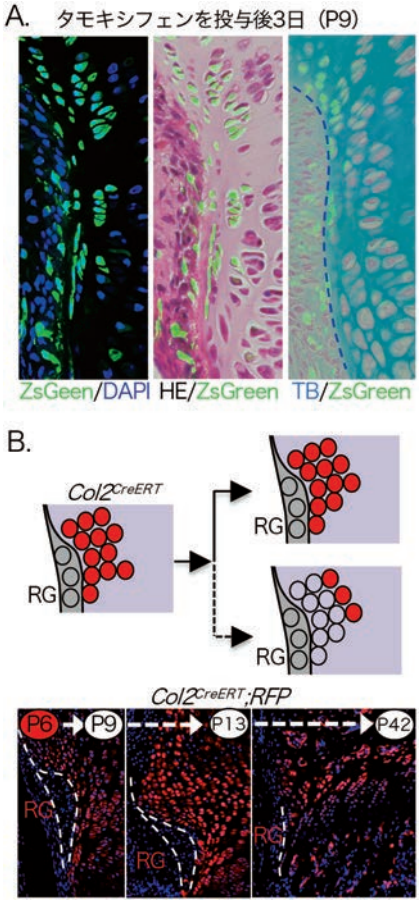


図 3.　成長板軟骨最外側の Wnt シグナル反応細胞が成長板軟骨前駆細胞である

A.　生後 6 日でタモキシフェンの投与を受け，3 日後の脛骨 Ranvier's groove 領域の拡大。TB: トルイジンブルー。成長板軟骨最外側の扁平な Wnt シグナル反応細胞が成長板軟骨前駆細胞である。B.　*Col2*^{CreER} システムを用いた細胞系譜の検証。

Wnt/β-catenin シグナルは成長板軟骨前駆細胞の幹細胞性維持に関与している

では，この成長板軟骨最外側に存在する軟骨前駆細胞において，β-catenin はどういった働きを有しているのだろうか。この疑問に答えるため，筆者は，*Axin2*^{CreERT2} システムで見られた ZsGreen 陽性細胞特異的に *β-catenin* をノックアウトするため，*β-catenin*$^{fl/fl}$; *Axin2*^{CreERT2}; *ZsGreen* マウスを作成した。タモキシフェンを生後 13 日で投与し，その一週間後に組織を採取・観察したところ，Ranvier's groove 付近の成長板軟骨最外側から軟骨膜に向かって突出する軟骨腫の形成を確認した（図 4A）。この結果からは，β-catenin シグナルが Ranvier's groove 付近の成長板軟骨最外側における成長板軟骨前駆細胞の幹細胞性維持に重要であると考えられた。

おわりに

本研究は，これまで明らかでなかった成長板軟骨を形成・維持する成長板軟骨前駆細胞の存在と局在を明らかにしたものである。この軟骨前駆細胞は，これまでの形態学的解析より予測されていた Ranvier's groove 付近に存在したものの，これまで考えられていた軟骨膜ではなく，軟骨基質内の最外側に局在していることが明らかとなった。この Ranvier's groove 領域は，発生・成長という視点からのみならず，病理学的にも非常に重

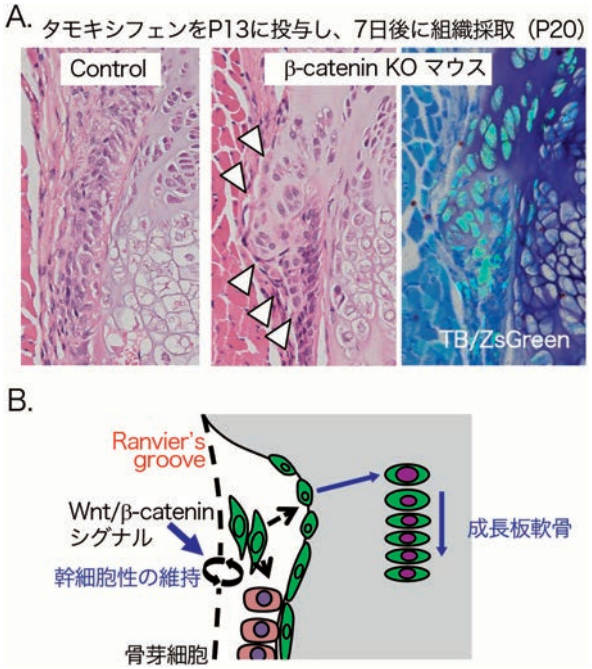


図 4.　Wnt/β-catenin シグナルは成長板軟骨前駆細胞の幹細胞性維持に関与している

A. Wnt シグナル反応細胞特異的 *β-catenin* ノックアウトマウス（KO）の脛骨 Ranvier's groove 領域。*Axin2*^{CreERT2} システムで見られた ZsGreen 陽性細胞特異的に β-catenin を KO するため，*β-catenin*$^{fl/fl}$; *Axin2*^{CreERT2}; *ZsGreen* マウスを作成した。タモキシフェン投与後 7 日で Ranvier's groove 付近に軟骨腫の形成が見られる（白矢頭）。TB: トルイジンブルー。B. まとめ。本研究では，以前より前駆細胞が存在するであろうと，考えられていた Ranvier's groove の重要性が示されたが，成長板軟骨前駆細胞は，groove 自体ではなく，成長板軟骨最外側に存在し，成長板軟骨の辺縁部分を形成していた。

要な領域である。この領域は，外傷などにより傷害された場合に将来的な発育異常を来す可能性がある領域であり，また，外軟骨腫や肉腫といった種々の腫瘍の発生母地となる領域でもある[13]。今後，さらなる研究により，この成長板軟骨前駆細胞の維持機構，軟骨組織への分化機構が解明されることが期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究の遂行に対して，貴重な時間を惜しみなく費やして下さった Motomi Enomoto-Iwamoto 先生（留学先である米国ペンシルバニア州フィラデルフィア The Children's Hospital of Philadelphia から現在メリーランド州ボルチモアにある University of Maryland School of Medicine に異動されている），米国留学から帰国後の研究を指導して下さった豊澤悟教授に心より感謝申し上げます。また，帰国後，マウスの飼育・解析を手伝ってくれた廣瀬勝俊助教をはじめとする口腔病理学教室の教室員一同にも感謝申し上げます。最後に，米国という慣れない環境で，家庭を支え，3 人の子供達を逞しく育ててくれた妻には，この場を借りて心より感謝の意を表します。

文　献

1）Usami Y, Gunawardena AT, Francois NB, Otsuru S, Takano H, Hirose K, Matsuoka M, Suzuki A, Huang J, Qin L, Iwamoto M, Yang W, Toyosawa S, Enomoto-Iwamoto M.（2019）: Possible contribution of Wnt-responsive chondroprogenitors to the postnatal murine growth plate. *J Bone Miner Res*, **34**, 964–974.
2）Usami Y, Gunawardena AT, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M.（2016）Wnt signaling in cartilage development and diseases: lessons from animal studies. *Lab Invest*, **96**, 186–96.
3）Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS.（2014）Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 12097–102.
4）Zhou X, von der Mark K, Henry S, Norton W, Adams H, de Crombrugghe B.（2014）Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet*, **10**, e1004820.
5）Park J, Gebhardt M, Golovchenko S, Perez-Branguli F, Hattori T, Hartmann C, Zhou X, deCrombrugghe B, Stock M, Schneider H, von der Mark K.（2015）Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage. *Biol Open*, **4**, 608–21.
6）Mizuhashi K, Ono W, Matsushita Y, Sakagami N, Takahashi A, Saunders TL, Nagasawa T, Kronenberg HM, Ono N.（2018）Resting zone of the growth plate houses a unique class of skeletal stem cells. *Nature*, **563**, 254–258.
7）Shapiro F, Holtrop ME, Glimcher MJ.（1977）Organization and cellular biology of the perichondrial ossification groove of ranvier: a morphological study in rabbits. *J Bone Joint Surg Am*, **59**, 703–23.
8）Bowman, AN., van Amerongen R, Palmer TD, Nusse R.（2013）. Lineage tracing with Axin2 reveals distinct developmental and adult populations of Wnt/b-catenin-responsive neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 7324–7329.
9）Cantley L, Saunders C, Guttenberg M, Candela ME, Ohta Y, Yasuhara R, Kondo N, Sgariglia F, Asai S, Zhang X, Qin L, Hecht JT, Chen D, Yamamoto M,

Toyosawa S, Dormans JP, Esko JD, Yamaguchi Y, Iwamoto M, Pacifici M, Enomoto-Iwamoto M.（2013）Loss of beta-catenin induces multifocal periosteal chondroma-like masses in mice. *Am J Pathol*, **182**, 917–927.

10）Candela ME, Cantley L, Yasuaha R, Iwamoto M, Pacifici M, Enomoto-Iwamoto M.（2014）Distribution of slow-cycling cells in epiphyseal cartilage and requirement of beta-catenin signaling for their maintenance in growth plate. *J Orthop Res*, **32**, 661–668.

11）Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, Lindahl A.（1992）Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9826–9830.

12）Karlsson C, Thornemo M, Henriksson HB, Lindahl A.（2009）Identification of a stem cell niche in the zone of Ranvier within the knee joint. *J Anat*, **215**, 355–363.

13）Schurz M, Binder H, Platzer P, Schulz M, Hajdu S, Vécsei V.（2010）Physeal injuries of the distal tibia: long-term results in 376 patients. *Int Orthop*, **34**, 547–552.