

Title	Live imaging analysis of the growth plate in a murine long bone explanted culture system(Abstract_要旨)
Author(s)	Hirota, Keisho
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2019-03-25
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k21673
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（医学）	氏名	廣田圭昭
論文題目	Live imaging analysis of the growth plate in a murine long bone explanted culture system (マウス長管骨器官培養系における成長板のライブイメージング解析)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>【背景・目的】哺乳類の骨伸長は成長板軟骨での内軟骨性骨化により達成される。成長板軟骨は、その過程で骨端部から骨幹部にかけて静止軟骨細胞層（resting zone）、増殖軟骨細胞層（proliferative zone：PZ）、前肥大化軟骨細胞層（prehypertrophic zone：PHZ）、肥大化軟骨細胞層（hypertrophic zone：HZ）の順に分化し、最終的に骨へと置換される。これまで成長板軟骨の成長と軟骨細胞の動態の評価は固定切片を用いた組織学的解析により行われてきたが、組織固定の過程で細胞や細胞外基質などの形態が変化したり、組織全体の成長や細胞動態を異なる検体の組織像から推測しなければならないという問題があった。そこで、本研究では二光子顕微鏡を用いてマウス胎仔成長板のライブイメージングを行い、成長板の伸長とそれを構成する個々の軟骨細胞の動態および形態変化を連続的に解析した。さらに内軟骨性骨化による骨伸長の促進因子である C 型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）を添加し、成長板伸長に寄与する因子の解析を行った。</p> <p>【結果】CAG プロモーター下に EGFP を発現したトランスジェニックマウスの胎生 17 日目の胎仔尺骨をアガロースゲルの型に固定して CNP 非添加・添加条件下で器官培養を行い、二光子顕微鏡でその遠位成長板を 18 時間連続撮影した。軟骨細胞の形態と配列により PZ、PHZ、HZ を区別し、さらに PZ は骨端側を上部、骨幹側を下部に二分割した。前肥大化軟骨細胞は長時間の解析で細胞質が増大し肥大化軟骨細胞に分化するため、18 時間連続での検討では PHZ と HZ を前肥大化-肥大化軟骨細胞層（PH-HZ）と一括し、細胞の形態が比較的保たれる 6 時間での検討では PHZ と HZ を別個に解析した。成長板の伸長に寄与する因子として、上部および下部 PZ と PH-HZ それぞれの軟骨細胞の、骨幹部の基点からの 18 時間の移動距離を測定した結果、PH-HZ、下部 PZ、上部 PZ にかけて移動距離の増大を認めた。CNP 添加は各領域で移動距離を有意に増大させた。次に、PZ、PHZ、HZ の絶対的な伸長距離を個別に解析するため、各層で成長板伸長方向に配列した 2 細胞を設定し、6 時間での 2 細胞間距離の変化を Δ細胞間距離として解析した。その結果、PZ と比較し、PHZ と HZ で Δ細胞間距離は有意に増大し、CNP 添加は PHZ の Δ細胞間距離を有意に増大させた。さらに PZ と PH-HZ で長方形の解析領域を設定し、同領域全体の面積と内部に含まれる細胞および細胞外基質領域の面積をそれぞれ 18 時間連続で経時的に測定した。いずれの層でも解析領域全体の面積は増大したが、細胞領域面積の増大は PZ と比較し、PH-HZ で優位に見られた。CNP は PH-HZ の解析領域全体の面積と、PZ と PH-HZ の細胞領域面積を有意に増大させた。加えて、1 細胞あたりの 6 時間での面積変化を PZ、PHZ、HZ で解析した結果、PHZ でのみ細胞面積増大と CNP による増大を有意に認めた。また、PZ を 3D 構築して細胞分裂率を測定した結果、本検討においては CNP 添加の影響は認められなかった。</p> <p>【結語】哺乳類の長管骨成長板のライブイメージングの系を初めて確立した。こ</p>			

の系において成長板の伸長には特に PHZ、HZ の増大が寄与することが明らかとなった。さらに成長板軟骨-骨伸長促進因子である CNP が PHZ の増大に作用したことから、この結果は裏付けられた。本実験系は様々な成長因子の成長板への作用の解析に応用可能であり、今後は骨疾患の病態解明や創薬にもつながることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

これまで成長板軟骨における内軟骨性骨化の解析は固定切片による組織学的アプローチに限定されており、固定に伴う形態変化や、組織全体の成長や細胞動態を異なる検体の組織像から推測しなければならないという問題があった。そこでライブイメージングの手法により、CAG プロモーター下に EGFP を発現したトランスジェニックマウスの胎仔成長板を二光子顕微鏡を用いて動的かつ連続的に解析した。さらに成長板軟骨の伸長促進因子である C 型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）を添加し、成長板伸長に寄与する因子を解析した。成長板伸長方向に配列した 2 細胞間距離の変化は、増殖軟骨細胞層（PZ）と比較し、前肥大化軟骨細胞層（PHZ）と肥大化軟骨細胞層（HZ）で有意に増大した。PZ と前肥大化-肥大化軟骨細胞層（PH-HZ）での長方形の解析領域を用いた経時的面積変化の測定では、各層で解析領域全体の面積が増加したが、細胞領域面積は PZ と比較して PH-HZ でより増大した。1 細胞あたりの面積の増加は PHZ でのみ認められた。さらに、CNP は各検討における PHZ での変化を増強したが、PZ での細胞分裂率には影響しなかった。哺乳類の長管骨成長板のライブイメージングの系を初めて確立し、成長板の伸長には特に PHZ、HZ の増大が寄与することを明らかとした。

以上の研究は内軟骨性骨化による骨伸長の機序の解明に貢献し内分泌学の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 31 年 3 月 4 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降