原 著

Chick 骨端板成長軟骨および培養軟骨細胞のタイプ
I, II, X コラーゲン, オステオネクチン
mRNAs の遺伝子発現について

大 島 修

昭和大学歯学部第二口腔外科学教室 (主任: 南雲正男教授)

〔受付: 平成2年8月20日〕

Gene expression of type I, II and X collagens
and osteonectin mRNAs in chick growth
cartilage and cultured chondrocytes

Osamu Oshima

Department of Oral Surgery, School of Dental
Medicine, Showa University
(Chief: Prof. Masao Nagumo)

〔Accepted for publication: August 20, 1990〕

Key words: *In situ* hybridization / type I collagen mRNA / type II collagen mRNA / type X collagen mRNA / osteonectin mRNA

Abstract: An *in situ* hybridization technique has been applied to study the expression of type I, II, and X collagens and osteonectin mRNAs in chick epiphyseal growth cartilage and cultured chondrocytes. *In situ* hybridization was carried out using biotinylated DNA probes. Hybridized probes were detected using a streptavidin-biotin-alkaline phosphatase conjugate. The $\alpha 2(I)$ and $\alpha 1(II)$ collagen probes represented carboxy-propeptide and 3'-untranslated sequences; the type X collagen probe was a portion of the carboxy-terminal non-collagenous domain; the osteonectin probe was a 0.3-kb EcoRI fragment from a bovine cDNA clone.

Both *in vivo* and *in vitro* studies revealed that type I, II, and X collagens and osteonectin mRNAs were produced by chondrocytes. Type I collagen mRNA was localized in cells around a blood vessel in the hypertrophic region. Type II collagen mRNA, found in proliferating cells, gradually decreased in hypertrophic cells. In contrast, the highest levels of type X collagen mRNA were seen in hypertrophic chondrocytes. The highest levels of osteonectin mRNA were observed in perivascular chondrocytes.

These results suggest that the transition from proliferating to hypertrophic chondrocytes may be associated with the appearance of type X collagen mRNA. The presence of high levels of type X collagen message in the hypertrophic region supports the view that the expression of type X collagen is associated with the mineralization of cartilage.

緒 言

軟骨内骨化過程において、骨端部硝子軟骨が重要な役割を演じていることは周知のことである。この骨端軟骨を構成する軟骨細胞は、軟骨柱として長軸方向に配列し、特徴的な形態変化を示す。すなわち、深部骨髄側にむかって静止細胞層(Resting cartilage zone, RC)、増殖細胞層(Proliferating cartilage zone, PC)、肥大細胞層(Hypertrophic cartilage zone, HTC)、および石灰化層(Cartified cartilage zone, CC)の4層に形態的に分類できる。この軟骨組織の石灰化が次に来る骨化過程、つまり骨組織形成に重要であることは、一つの例として骨組織形成が不十分なクル病動物で、石灰化が見られないことからもうかがわれる¹⁾。

一方、このような形態変化を示す軟骨組織には、多くの種類の基質蛋白質あるいは細胞の分化・増殖因子が存在する。そのうちで主なものはコラーゲンであり、骨組織には主としてタイプIコラーゲンが存在し²⁾、軟骨組織ではタイプIIコラーゲンが主成分である³⁾。これらのほか、軟骨組織のコラーゲンとしてタイプIX^{4,5)}、X^{6,7)}、XI⁸⁾が知られている。このうちタイプXコラーゲンは、肥大軟骨細胞層から石灰化層さらに骨組織にかけて存在することから、軟骨組織の石灰化あるいは骨組織の形成との関連が注目されている⁹⁾。さらに、オステオネクチンはカルシウム結合蛋白の一種で骨基質の主な構成成分であるが¹⁰⁾、Jundtら¹¹⁾は軟骨組織のHTC部においてもその存在が認められたと報告している。現在、これらの基質蛋白の軟骨組織での局在は免疫組織学的にすでに明らかにされている。しかし、これらの蛋白がいつ軟骨細胞で合成されるのか、さらにその合成時期と骨内石灰化との関連、つまりどの時期の軟骨細胞でこれらの蛋白がmRNAから転写され蛋白合成を開始するのかは未だ明らかにされていない。

一方、*in situ* hybridization法は、個々の細胞の遺伝子(mRNA)発現状態を研究するうえで最近最も優れた方法であると言われている^{12,13)}。すなわち、この方法を用いることにより、目的とするmRNAがどの時期の細胞で合成されているの

かを知ることが可能である。そこで著者は、この方法を使用し、chickの骨端板成長軟骨(*in vivo*)および軟骨細胞の培養系(*in vitro*)でのタイプI、II、XコラーゲンおよびオステオネクチンmRNAの発現について検討した。

方 法

すべての実験には、6~8週齢のwhite rock chickを使用し、絞殺後骨端板成長軟骨は脛骨から採取した。

1. 実験方法 <*in vivo*>

採取した成長軟骨を約5×5×5mm大に細切し、modified Carnoy's solution¹⁴⁾で-20°Cにて24時間固定した。固定後、標本を-20°Cの条件下でethanolにより脱水し、通報に従ってパラフィン包埋した。包埋した標本はミクロトーム(Leitz)により5~8μmの厚さに切り、0.5mg/ml poly-L-lysine (15,000-30,000 Mwt, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)によって処理したスライドガラス上に採取し、45°Cの条件下でスライドウォーマーにより5日間incubationした。Incubation終了後、切片をxyleneにより脱パラフィンし、ethanolにより脱水を行ない、2X saline sodium citrate buffer, pH 7.0 (SSC; 0.3M NaCl, 0.03M sodium citrate)に2分間浸した。その後、Brahic and Haase¹⁵⁾、Haaseら¹⁶⁾による方法に準じて切片を処理した。すなわち、最初0.2N HClにより20~30分間切片を脱灰し、滅菌脱イオン水で3回洗浄後、再度2X SSCに10分間浸した。ついで、37°Cの条件下で10~20μg/ml hyaluronidase (bovine testes, Calbiochem Co., La Jolla, CA)で10~20分処理し、最終的に5~10μg/ml proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany)でやはり37°Cの条件下で10~30分間処理した。なお、その間4% formaldehydeにより2度再固定を行なった。

2. 実験方法 <*in vitro*>

採取した成長軟骨を0.4% collagenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)により消化し、Pacifi-ciら¹⁷⁾による方法に準じて軟骨細胞を分離した。その後、分離した軟骨細胞を10% fetal calf

serum を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) で 1.9×10^6 cells/ml とし, シャーレ中に 0.5 mg/ml poly-L-lysine で処理したカバースリップ上で 7 日間培養した。そして, 培養 3 日目に $50 \mu\text{g/ml}$ ascorbic acid と終濃度 10 mM の β -glycerophosphate を加えた。その後, 経時的に培養軟骨細胞を 5 mM MgCl_2 を含んだ 4 % paraformaldehyde で 15 分間固定し, *in situ* hybridization を行なうまで 70 % ethanol 中で 4°C に保存した¹⁸⁾。

なお, 石灰化の有無を調べる目的で, 培養 1, 4, 7 日目の軟骨細胞の一部を 4 % paraformaldehyde により 5 分間室温にて固定し, その後, 2 % alizarin red により染色を行なって観察した。また, 培養軟骨細胞のアルカリフォスファターゼ活性の有無を調べる目的で, naphthol AS-BI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を基質として Fast red TR (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) により 37°C で 30 分間染色を行なった。その後, 4 % paraformaldehyde により固定を行なって観察した。

3. DNA probes (Fig. 1)

タイプ I コラーゲン DNA probe は, chick genomic $\alpha 2(\text{I})$ collagen gene の carboxy-propeptide と 3'-untranslated sequence を含めた 816-bp EcoR I-Taq fragment で pGEM 4 により subclone したものを使用した (ペンシルバニア大学 Dr. S. Adams より供与)。タイプ II コラーゲン DNA probe は, プラスミド pCs-2 でクローン化した 1.25-Kb cDNA から分離した, やはり carboxypropeptide と 3'-untranslated sequence を含めた 800-bp Pst I-Hind III fragment で pGEM4 により subclone したものを使用した (NIH Dr. M. Young より供与)。タイプ X コラーゲン DNA probe は, プラスミド pYN 3116 に挿入した 0.6-Kb cDNA から pGEM3 により subclone した 183-bp Hind III-BamH I fragment を使用した (ハーバード大学 Dr. Y. Ninomiya より供与)¹⁹⁾。オステオネクチン DNA probe は, bovine cDNA から分離した 0.3-Kb EcoR I fragment を pGEM3 により subclone したものを使用した (NIH Dr. M. Young より

Fig. 1 The region of the cDNA inserts used for *in situ* hybridization probes are shown as wide black bars: the thin lines indicate regions not used for probes. At the top of figure, the positions of the different domains within the prepro α -chain are indicated relative to the mRNA.

供与)²⁰⁾。すべての probe は通常のニックトランスレーション法を用いて biotin-7-dATP (BRL, Gaithersburg, MD) によりビオチン化し, Sephadex G-75 chromatography により精製した²¹⁾。

4. *In situ* hybridization

1) *In vivo*

切片を pre-hybridization mixture, すなわち $500 \mu\text{g/ml}$ Yeast t-RNA (Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany), $80 \mu\text{g/ml}$ salmon sperm DNA (Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany), 50% formamide, 10% dextran sulfate, 10mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1 mM EDTA, 100mM dithiothreitol, および Denhardt's solution (それぞれ 0.02% の ficoll, BSA, polyvinylpyrrolidone を含む溶液) により $42 \pm 3^\circ\text{C}$ の条件下で 4 時間前処理した²²⁾。

Hybridization は, 同条件下で pre-hybridization mixture にそれぞれのビオチン化 DNA probe を $2 \sim 5 \mu\text{g/ml}$ の濃度で加えた溶液を hybridization mixture とし, それと切片を 18~24 時間 incubation して行なった。具体的には以下の手順で行なった。すなわち, $100 \mu\text{l}$ の hybridization mixture を注意深く切片上に満たし, Prosil-28 (PCR Incorporated, Gainesville, FL) によりシリコーン化した $24 \times 40 \text{ mm}$ のカバースリップでカバーした。スリップの辺縁は rubber cement

Fig. 2 Development of mineralization in cultured cells of chick growth cartilage. Chondrocytes after 1 day culture show very low levels of staining with alizarin red (a). The nodules of chondrocytes at 4 (b) and 7 (c) days culture are observed high levels of staining with alizarin red.

(Dennison Manufacturing Co., Framingham, MA) を使用し密封した。Hybridization 終了後、カバースリップを注意深く除去し、非特異的な結合を除去する目的で切片を以下の手順により洗浄した。最初は、室温にて終濃度50% formamide, 2X SSC 溶液で10分間3回洗浄し、次に $54 \pm 2^\circ\text{C}$ の条件下で終濃度50% formamide, 0.5X SSC 溶液により10分間洗浄、最後はやはり $54 \pm 2^\circ\text{C}$ の条件下で終濃度50% formamide, 0.1X SSC により10分間3回洗浄した。その後、切片を phosphate buffered saline (PBS) 中に0.5% Triton X-100,

0.5% BSA を含む溶液で室温にて3分間2回処理した後、color detection を行なった²¹⁾。

2) *In vitro*

In situ hybridization の方法は、基本的には *in vivo* と同様であったが、prehybridization 時間を *in vitro* では1時間、hybridization 時間を4時間とした。また、hybridization 後の洗浄の際 *in vivo* では $54 \pm 2^\circ\text{C}$ で行なったが、*in vitro* では $47 \pm 3^\circ\text{C}$ で行なった。そして、最終的に PBS 中に0.5% Triton X-100, 0.5% BSA の入った溶液で室温にて3分間2回処理した後、color detection を行なった。

5. color detection 法

染色は streptavidin-biotinylated-alkaline phosphatase reagent (DETEKI-alk, ENZO Biochem, New York, NY) を用いて行った。すなわち、上記の reagent と hybridization の終了した切片を 37°C にて60分間反応させた後、切片を10 mM potassium buffer (pH 6.5), 0.5M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% BSA よりなる溶液によって室温で5分間3回洗浄し、ついで100mM Tris-HCl (pH 9.0~9.5), 100mM NaCl, 5 mM MgCl_2 の溶液でやはり室温にて2分間3回洗浄を行った。そして最終的に、 $330\mu\text{g}/\text{ml}$ nitroblue tetrazolium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) と $167\mu\text{g}/\text{ml}$ bromochloroindolyl phosphate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) により2~24時間室温にて染色を施した²³⁾。また、*in vitro* ではその後、1% fast green により5~10分間 counter staining を行った。

結 果

1. 培養軟骨細胞 (*in vitro*) の石灰化とアルカリフォスファターゼ活性

形態学的には、培養1日目の軟骨細胞は類円形を呈していた。培養4日目には軟骨細胞は nodule を形成し、その周囲の軟骨細胞は類円形から多角形な細胞に形態変化を示した。そして、培養7日目では、nodule は大きくなり、周囲軟骨細胞は多角形を呈していた。

Fig. 2 に培養1, 4, 7日目の alizarin red 染色の結果を示した。培養1日目の軟骨細胞は染

Fig. 3 Distribution of alkaline phosphatase with cultured chondrocytes. (a) Cells at 1 day culture are slightly stained with alkaline phosphatase. The nodule of chondrocytes at 4 days culture (b) are heavily stained with alkaline phosphatase. The nodule of cells at 7 days culture (c) are also stained with alkaline phosphatase.

色されなかったが (Fig. 2a), 培養4日目の軟骨細胞 nodule 形成部で染色が増しており, 軟骨細胞の石灰化の開始が観察された (Fig. 2b)。培養7日目では nodule 中心部で更に染色性が増しているのが確認できた (Fig. 2c)。

Fig. 3 に培養1, 4, 7日目のアルカリフォスファターゼ染色の結果を示した。培養1日目の軟骨細胞でもすでに染色性は認められたが (Fig. 3a), nodule 形成がみられた培養4日目の軟骨細胞では更に染色性が増していた (Fig. 3b)。しかし, 培養7日目では nodule 部で培養4日目と比

Fig. 4 Localization of type I collagen mRNA to cells of chick growth cartilage. Longitudinal section through the epiphysis is shown in (a). Very low levels of mRNA expression are observed. Cartilage in the hypertrophic-calcifying region is shown in (b). Arrows indicate cells which have hybridized to type I collagen cDNA probe. Transverse section of growth cartilage hybridized with type I collagen cDNA probe (c). A few cells have hybridized to the probe (*).

較すると染色性が減弱しているように思われた (Fig. 3c)。

2. タイプIコラーゲン mRNA

In vivo

Chick 骨端板成長軟骨におけるタイプIコラーゲン mRNA の局在を Fig. 4 に示した。RC, PC および HTC 部の軟骨細胞は, ほとんど染色

Fig. 5 Localization of type I collagen mRNA to cultured chondrocytes. Cells at 1 day culture have not hybridized with the probe (a). Cells at 4 days culture are shown in (b). The cells of the nodule have not hybridized with the probe. Chondrocytes at 7 days culture are shown in (c). The cells of the nodule also have not hybridized with the probe.

されなかった (Fig. 4a)。しかし、HTC 部の vascular canal の縦断面標本では、染色性の強い endochondral bone cell と数個の染色性の弱い cartified cartilage cell が観察できた (Fig. 4b)。HTC 部の横断面でも、ほとんどの HTC 部の軟骨細胞は染色されていなかったが、vascular canal の周辺にやはり染色されている細胞を観察することができた (Fig. 4c)。

In vitro

培養軟骨細胞のタイプ I コラーゲン mRNA の

局在を Fig. 5 に示した。Fig. 5a は培養 1 日目を、Fig. 5b は培養 4 日目を、Fig. 5c は培養 7 日目のタイプ I コラーゲン mRNA の局在をみたものである。どの時期の培養軟骨細胞においてもタイプ I コラーゲン mRNA の発現を認めることができなかった。

3. タイプ II コラーゲン mRNA

In vivo

Chick 骨端板成長軟骨におけるタイプ II コラーゲン mRNA の局在を Fig. 6 に示した。タイプ II コラーゲン mRNA の発現は、PC 部の細胞でもっとも強く、HTC 部に移行するにしたがい減弱していった。なお、RC 部の軟骨細胞では、タイプ II コラーゲン mRNA の発現を認めることはできなかった。

In vitro

培養 1, 4 および 7 日目の軟骨細胞のタイプ II コラーゲン mRNA の局在を Fig. 7 に示した。培養 1 日目においてタイプ II コラーゲン mRNA の発現がすでに認められた (Fig. 7a)。培養 4 日目では形成された nodule 部で更に染色性が増しているのが確認できた (Fig. 7b)。また、nodule 周囲の軟骨細胞においてもタイプ II コラーゲン mRNA の発現を認めた (Fig. 7c)。しかし、培養 7 日目では nodule の中心部で染色性が激減した (Fig. 7d)。なお、nodule 周囲軟骨細胞では、この時期においてもタイプ II コラーゲン mRNA の発現が認められた (Fig. 7e)。

4. タイプ X コラーゲン mRNA

In vivo

Fig. 8 に成長軟骨におけるタイプ X コラーゲン mRNA の発現を示した。タイプ II コラーゲン mRNA とは対照的に、PC 部下層から HTC 部の細胞にかけて急激に染色性を増し、HTC 部の軟骨細胞において最も強い染色性を示した。

In vitro

培養 1, 4, 7 日目の軟骨細胞のタイプ X コラーゲン mRNA の発現を Fig. 9 に示した。培養 1 日目の軟骨細胞にもタイプ X コラーゲン mRNA の発現が若干認められた (Fig. 9a)。培養 4, 7 日目の軟骨細胞では、nodule 部および周辺部において染色性が増加した (Figs. 9b-9e)。

Collagen type II mRNA

Fig. 6 Localization of type II collagen mRNA to cells of chick growth cartilage. High power view ($\times 400$) of RC cells showing the absence of stain. PC cells are heavily stained with the type II cDNA probe. The figure shows the presence of HTC cells that are also positive.

5. オステオネクチン mRNA

In vivo

Fig. 10に成長軟骨のオステオネクチン mRNA の発現を示した。オステオネクチン mRNA は、RC 部を除くすべての部位、すなわち PC, HTC 部の軟骨細胞に認められたが、とくに epiphyseal blood vessel (EV) の周囲約3層の perivascular cell にその発現が強く認められた。また、骨細胞にも発現が認められた。

In vitro

オステオネクチン mRNA の培養軟骨細胞の1, 4, 7日目の局在を Fig. 11に示した。培養細胞ではオステオネクチン mRNA の発現はタイプXコラーゲン mRNA の発現と類似しており、培養日数が増すごとに染色性が強くなり、その傾向は nodule 部で特に著明であった (Figs. 11a-11e)。

考 察

今回著者は、培養軟骨細胞の分化を経時的に組織化学的方法を用いて観察するとともに、*in vivo* と *in vitro* の軟骨細胞の遺伝子 (mRNA) 発現を *in situ* hybridization 法を用いて比較検討した。

培養軟骨細胞において、培養1日目では細胞は類円形を呈し、alizarin red 染色は陰性で、アルカリフォスファターゼ活性もさほど強く認められなかった。すなわち、培養1日目の軟骨細胞は、*in vivo* の骨端板成長軟骨における RC 下層—PC 部に相当する細胞分化を示していた。そして、*in situ* hybridization 法の結果では軟骨特有とされているタイプIIコラーゲン³⁾の mRNA は、培養1日目よりその発現が認められたが、現在軟骨石灰化に重要な因子であるといわれているタイプXコラーゲン^{6,7)}および HTC 部の軟骨組織にも

Fig. 7 Localization of type II collagen mRNA to cultured chondrocytes. Cells at 1 day culture have not hybridized with the probe (a). Cells at 4 days culture are shown in (b) and (c). In (b), the cells of nodule are heavily stained with type II cDNA probe. In (c), the peripheral cells of the nodule showing hybridization with the probe. Cells at 7 days culture are shown in (d) and (e). In (d), the center of the nodule unstained with type II cDNA probe. In (e), the peripheral cells of the nodule stained with the probe.

Collagen type X mRNA

Fig. 8 Localization of type X collagen mRNA to cells of chick growth cartilage. High power view ($\times 400$) of RC cells showing the absence of stain. Low levels of hybridization are observed in PC cells. HTC cells are heavily stained with type X cDNA probe.

存在することが確認されているオステオネクチン^{17,24)}の mRNA の発現は多少認められたのみであった。また、骨組織に特有であるタイプ I コラーゲンの mRNA の発現も、培養 1 日目では認められなかった。以上の結果から、おのおのの遺伝子 (mRNA) 発現状態においても、培養 1 日目の軟骨細胞と *in vivo* の骨端板成長軟骨の RC 下層—PC 部に相当する細胞は類似していた。

培養 4 日目の alizarin red 染色では、培養細胞の nodule 部に染色が認められ、アルカリフォスファターゼ活性も nodule 部に強く認められた。すなわち、培養 4 日目の軟骨細胞は、*in vivo* の骨端板成長軟骨における PC-HTC 上層部に相当する細胞分化を示した。*In situ* hybridization 法の結果ではタイプ II コラーゲン mRNA の発現は培養期間中で最も強く、特に nodule 部で著明であった。タイプ X コラーゲンおよびオステオネクチン mRNA も培養 1 日目に比べ染色性を増し、nodule 部で染色性が強かった。しかし、タイプ I

コラーゲン mRNA は、この時期でもなお発現が認められなかった。以上の結果から、培養 4 日目の軟骨細胞のおのおのの遺伝子 (mRNA) 発現状態も、*in vivo* の PC-HTC 上層部に相当する細胞と類似していた。

培養 7 日目の alizarin red 染色では nodule 部で更に強く染色が認められたが、nodule 部のアルカリフォスファターゼ活性は培養 4 日目に比べると減弱しているように思われた。すなわち、培養 7 日目の軟骨細胞は、*in vivo* の骨端板成長軟骨における HTC 部に相当する細胞分化を示した。*In situ* hybridization 法の結果では、タイプ II コラーゲン mRNA の発現は、興味深いことに nodule 中心部で減弱していた。タイプ X コラーゲンおよびオステオネクチン mRNA の染色は、培養 4 日目より更に強くなり、特に nodule 部でその染色性が増加した。これらの所見から、培養 7 日目の軟骨細胞は、おのおのの遺伝子 (mRNA) 発現においても、*in vivo* の骨端板成長軟骨の

Fig. 9 Localization of type X collagen mRNA to cultured chondrocytes.

A few cells have hybridized with the probe at 1 day cultured cells (a). Cells at 4 days culture are shown in (b) and (c). In (b), the cells of the nodule are stained with the probe. In (c), the peripheral cells of the nodule are also stained with the probe. Cells at 7 days culture are shown in (d) and (e). In (d), the cells of the nodule showing hybridization with the probe. In (e), the peripheral cells of the nodule are stained with the probe.

Fig. 10 Localization of osteonectin mRNA to chondrocytes of growth cartilage. (a) The stained perivascular chondrocytes can be seen around a large epiphyseal blood vessel (EV). (b) shows the positive osteocytes.

HTC 部の細胞と類似していた。以上の結果から、軟骨細胞が *in vivo*, *in vitro* にかかわらずこれらの遺伝子 (mRNA) を発現すること、更に培養軟骨細胞でも *in vivo* の成長軟骨の軟骨細胞と非常に類似した遺伝子 (mRNA) の発現を細胞の分化にともない行なっていることが確認できた。しかし、培養軟骨細胞のタイプ I コラーゲンとオステオネクチン mRNA の発現状態には *in vivo* とは多少相違がみられた。すなわち、*in vivo* のタイプ I コラーゲン mRNA の発現は、HTC 部の血管周囲の軟骨細胞に認められたが、培養軟骨細胞では培養 7 日目になっても認めることがで

きなかった。また、オステオネクチン mRNA の発現は、PC 部の血管周囲 3 層の軟骨細胞に特に強く認められたが、培養軟骨細胞ではそのことを確認することはできなかった。これらの遺伝子発現の違いは、*in vivo* と異なり *in vitro* では血管が存在しないことによるものと考えられる。

成長軟骨における基質蛋白の役割およびその mRNA の発現については、近年急速に情報が得られつつある。特に、最近タイプ X コラーゲンが、軟骨石灰化に重要な因子であるといわれており^{6,7)}、Habuchi ら²⁵⁾は、軟骨石灰化にやはり重要な因子であるといわれている基質小胞とタイプ X コラーゲンの関連について報告している。著者が今回報告した *in vivo* におけるタイプ X コラーゲン mRNA の発現は、タイプ II コラーゲン mRNA の局在とは対照的であった。すなわち、タイプ II コラーゲン mRNA は、PC 部にその発現を最も多く認め、HTC 部で減少した。それとは逆に、タイプ X コラーゲン mRNA は、成長軟骨の PC 部から徐々に出現し、HTC 部の軟骨細胞で最も多く存在していた。*In vitro* においてもタイプ X コラーゲン mRNA は、培養 4 日目の nodule 部でその発現を最も強く認め、培養 7 日目の nodule 中心部で減少したタイプ II コラーゲン mRNA の局在とは対照的に、培養日数が増すごとに nodule 部においても発現が強くなった。これらの所見は、軟骨の石灰化においてタイプ X コラーゲンが重要な因子になっているという最近の見解を強く支持するとともに、軟骨基質を維持するのに重要なタイプ II コラーゲンは、石灰化が進行するのに従いタイプ X コラーゲンにその役割を switch することを示唆しているものと考えられる。

オステオネクチン mRNA の発現は、*in vivo* では PC, HTC 部を通して認められたが、最も多く認められた部位は血管周囲約 3 層の軟骨細胞であった。それに対して、*in vitro* におけるオステオネクチン mRNA の発現は、培養日数が増すごとに強くなった。Holland ら²⁶⁾は、血管周囲の perivascular cell に形態学的に類似した endothelial cell にオステオネクチン mRNA が認められたと報告しており、Cole and Wezeman²⁷⁾は、

Fig. 11 Localization of osteonectin mRNA to cultured chondrocytes. A few cells have hybridized to the probe at 1 day culture(a). Cells at 4 days culture are shown in (b) and (c). In (b), the cells of the nodule have hybridized with the probe. In (c), the peripheral cells of the nodule also have hybridized with the probe. Cells at 7 days culture are shown in (d) and (e). In (d), the cells of the nodule are heavily stained with the probe. In (e), the peripheral cells of the nodule are also stained with the probe.

オステオネクチンは軟骨の石灰化に関与する最初の構成成分であると報告している。これらの報告と著者の所見を考えあわせると、オステオネクチンの増加は、軟骨細胞の proliferation や maturation,あるいは組織の vascularization に関与している可能性が推測される。

タイプ I コラーゲン mRNA については, *in vivo* ではこの mRNA は成長軟骨の全層にほとんど認められず, HTC 部の血管周囲の軟骨細胞のみにその発現を認めた。それに対し, *in vitro* では培養 1 日目から 7 日目までその発現は認められなかった。最近, 軟骨細胞もタイプ I コラーゲンの mRNA を約 20% (線維芽細胞のタイプ I コラーゲン mRNA の所有率を 100% とした場合) 保持していることが報告されている²⁸⁾。この論文では mRNA の抽出が RC, PC, HTC 部, および血管周囲の軟骨細胞をすべて含んだものから行なわれており, どの部位の軟骨細胞に存在するか明らかにされていない。この報告と著者の実験結果と考えあわせると, 軟骨組織でもタイプ I コラーゲンが存在し, それが HTC 部の血管周囲の軟骨細胞より主として産生されていることが推測されるが, 結論をうるには更に詳細な検討が必要である。

結 論

1) *In vivo*, *in vitro* ともに, 軟骨細胞におい

抄録：近年, 遺伝子を直接手にすることができるようになり, その構造・発現調節・蛋白質の人工合成など多くの実験が可能になった。*In situ* hybridization 法もその一つで組織切片上で DNA と RNA の相補的な結合を利用し, 細胞内の mRNA あるいは DNA を直接検出でき, 個々の細胞での転写レベルがわかる方法として知られている。今回著者は, この方法を用いて, chick 骨端板成長軟骨および軟骨培養細胞のタイプ I, II, X コラーゲン, オステオネクチン mRNAs の局在について検討した。その結果, *in vivo*, *in vitro* ともに, 軟骨細胞において, タイプ I, II, X コラーゲン, オステオネクチンの mRNA の発現を認めた。軟骨基質を維持するのに重要なタイプ II コラーゲンの mRNA は, 石灰化が進行するのに従ってタイプ X コラーゲン mRNA にその役割を switch することが推測され, 更にタイプ X コラーゲンは, 軟骨石灰化に重要な因子であることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Reginato, A. M., Shapiro, I. M., Lash, J. W. and Jimenez, S. A.: Type X collagen alterations in rachitic chick epiphyseal growth cartilage. *J. Biol. Chem.* **263**: 9938-

て, タイプ I, II, X コラーゲンおよびオステオネクチンの mRNA の発現を認めた。

2) 培養軟骨細胞の遺伝子 (mRNA) 発現状態は, *in vivo* における骨端板成長軟骨のそれと類似していた。

3) タイプ I コラーゲン mRNA は, 成長軟骨の HTC 部の血管周囲の軟骨細胞に認められた。タイプ II コラーゲン mRNA は, PC 部に相当する軟骨細胞に多く存在し, タイプ X コラーゲン mRNA は, HTC 部に相当する細胞に多く存在した。そして, オステオネクチン mRNA は, 軟骨細胞にも存在し, 特に血管周囲約 3 層に強く認められた。

以上の結果から, 軟骨基質を維持するのに重要なタイプ II コラーゲンの mRNA は, 石灰化が進行するのに従ってタイプ X コラーゲン mRNA にその役割を switch することが推測された。また, タイプ X コラーゲンは, 軟骨石灰化に重要な因子であることが示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました昭和大学歯学部第二口腔外科学講座, 南雲正男教授に心から感謝いたします。また材料を提供していただいた Pennsylvania 大学生化学教室の I. M. Shapiro 教授に感謝します。

本論文の要旨は第 7 回 (平成元年), 第 8 回 (平成 2 年) 日本骨代謝学会において発表した。

9945, 1988.

- 2) Miller, E. J. and Matukas, V.: Biosynthesis of collagen. *Fed. Proc.* **33**: 1197-1204, 1974.
- 3) Mayne, R. and von der Mark, K.: Collagens of cartilage. In: *Cartilage: structure,*

- function and biochemistry, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 181-215, 1983.
- 4) Irwin, M. H., Silver, S. H. and Mayne, R. : Monoclonal antibody against chicken type IX collagen : preparation, characterization, and recognition of the intact form of type IX collagen secreted by chondrocytes. *J. Cell Biol.* **101** : 814-823, 1985.
 - 5) Ninomiya, Y. and Olsen, B. R. : Synthesis and characterization of cDNA encoding a cartilage-specific short collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81** : 3014-3018, 1984.
 - 6) Schmid, T. M. and Conrad, H. E. : A unique low molecular weight collagen secreted by cultured chick embryo chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **257** : 12444-12450, 1982.
 - 7) Schmid, T. M. and Conrad, H. E. : Metabolism of low molecular weight collagen by chondrocytes obtained from histologically distinct zones of the chick embryo tibiotarsus. *J. Biol. Chem.* **257** : 12451-12457, 1982.
 - 8) Capasso, O., Tajana, G. and Cancedda, R. : Location of 64K collagen producer chondrocytes in developing chick embryo tibiae. *Mol. Cell Biol.* **4** : 1163-1168, 1984.
 - 9) Remington, M. C. Bashey, R. I., Brington, C. T., and Jimenez, S. A. : Biosynthesis of a disulphide-bonded short-chain collagen by calf growth plate cartilage. *Biochem. J.* **224** : 227-233, 1984.
 - 10) Termine, J. D., Kleinman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L. and Martin, G. R. : Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26** : 99-105, 1981.
 - 11) Jundt, G., Berghauer, K. H., Termine, J. D. and Schulz, A. : Osteonectin : a differentiation marker of bone cells. *Cell Tissue Res.* **248** : 409-415, 1987.
 - 12) Hafen, E., Levine, M., Garber, R. L. and Gehring, W. J. : An improved *in situ* hybridization method for the detection of cellular RNA in *Drosophila* tissue sections and its application for localizing transcripts of homeotic Antennapedia gene complex. *EMBO. J.* **2** : 617-623, 1983.
 - 13) Hayashi, M., Ninomiya, Y., Parsons, J., Hayashi, K., Olsen, B. R. and Trelstad, R. L. : Differential localization of mRNAs of collagen type I and II in chick fibroblasts, chondrocytes, and corneal cells by *in situ* hybridization using cDNA probes. *J. Cell Biol.* **102** : 2302-2309, 1986.
 - 14) Tuan, R. S., Lamb, B. T. and Jesinkey, C. B. : Mouse placental 57-kDa calcium-binding protein : II. Localization of mRNA in mouse and human placenta by *in situ* cDNA hybridization. *Differentiation* **37** : 198-204, 1988.
 - 15) Brahic, M. and Haase, A. T. : Detection of viral sequences of low reiteration frequency by *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75** : 6125-6129, 1978.
 - 16) Haase, A. T., Brahic, M., Stowring, L. and Blum, H. : Detection of viral nucleic acids by *in situ* hybridization. *Methods Virol.* **7** : 189-226, 1984.
 - 17) Pacifici, M., Oshima, O., Fisher, L. W., Young, M. F., Shapiro, I. M. and Leboy, P. S. : Changes in osteonectin distribution and levels are associated with mineralization of the chicken tibial growth cartilage. *Calcif. Tissue Int.* **47** : 51-61, 1990.
 - 18) Singer, R. H. and Ward, D. C. : Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by *in situ* hybridization with a biotinylated nucleotide analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79** : 7331-7335, 1982.
 - 19) Leboy, P. S., Shapiro, I. M., Uschmann, B. D., Oshima, O. and Lin, D. : Gene expression in mineralizing chick epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* **263** : 8515-8520, 1988.
 - 20) Young, M. F., Bolander, M. E., Day, A. A., Ramis, C. I., Robey, P. G., Yamada, Y. and Termine, J. D. : Osteonectin mRNA : distribution in normal and transformed cells. *Nucleic Acids Res.* **14** : 4483-4497, 1986.
 - 21) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York. pp. 202-203, 1982.
 - 22) Oshima, O., Leboy, P. S., McDonald, S. A., Tuan, R. S. and Shapiro, I. M. : Developmental expression of genes in chick growth cartilage detected by *in situ* hybridization. *Calcif. Tissue Int.* **45** : 182-192, 1989.
 - 23) Singer, R. H., Lawrence, J. B. and Villnave, C. : Optimization of *in situ* hybridization using isotopic and nonisotopic detection method. *Biotechniques.* **4** : 230-250, 1986.
 - 24) Bianco, P., Hayashi, Y., Silvestrini, G., Termine, J. D. and Bonucci, E. : Osteonectin and GLA-protein in calf bone : ultrastructural immunohistochemical localization using the protein A-gold method. *Calcif. Tissue Int.* **37** : 684-686, 1985.
 - 25) Habuchi, H., Conrad, H. E. and Glaser, J. H. : Coordinate regulation of collagen and alkaline phosphatase levels in chick embryo chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **260** : 13029-

- 13034, 1985.
- 26) Holland, P. W. H., Harper, S. J., McVey, J. H. and Hogan, B. L. M.: *In vivo* expression of mRNA for the Ca²⁺-binding protein SPARC (Osteonectin) revealed by *in situ* hybridization. J. Cell Biol. 105 : 473-482, 1987.
- 27) Cole, A. A. and Wezeman, F. H.: Peri-vascular cells in cartilage canals of the developing mouse epiphysis. Am. J. Anat. 174 : 119-129, 1985.
- 28) Allebach, E. S., Boettiger, D., Pacifici, M. and Adams, S. L.: Control of type I and II collagen and fibronectin gene expression in chondrocytes delineated by viral transformation. Mol. Cell. Biol. 5 : 1002-1008, 1985.