

平成 16 年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな	やまぐち あきら					
研究代表者氏名	山口 朗		所属研究機関・部局・職	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授		
研究課題名	和文	骨形成機構の総括的解析とその応用				
	英文	Comprehensive analysis of bone formation and its application				
研究経費	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	総合計
16年度以降は内約額 金額単位：千円	18,300	17,200	17,200	17,200	17,200	891,000
研究組織（研究代表者及び研究分担者）						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
山口 朗	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授	口腔病理学	培養実験、移植実験の推進と総括			
塚崎 智雄	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教授	口腔病理学	分子生物学的解析			
柴田 恭明	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手	口腔病理学	形態学的解析・分子生物学的解析			
藤田 修一	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手	口腔病理学	形態学的解析			
原 宜興	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授	歯周病学	間葉系幹細胞の性状の解析			
進藤 裕幸	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授	整形外科	間葉系幹細胞の性状の解析			
伊東 昌子	長崎大学・附属病院・助教授	放射線科学	骨格の3次元構造の解析			
当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>本研究では、我々の今までの骨芽細胞の分化調節機構の解析に関する研究成果を基盤として、以下の3つの研究課題を中心に研究を推進し、骨形成機構の総括的な解析を行い、その成果を臨床応用へと導くことを研究目的とする。</p> <p><u>カエル骨格形成の解析により軟骨内骨化を調節する分子を解明する</u>：我々はカエルの長管骨の形成過程では軟骨内骨化がほ乳類に比べて著明に遅延することを見いだしたので、カエル長管骨形成過程における軟骨内骨化遅延のメカニズムを解明することにより、軟骨内骨化に必要な分子を明らかにする。</p> <p><u>間葉系幹細胞の性状の解析を基盤とした分離・移植法の確立</u>：マウスとヒトの多分化能を持つ間葉系細胞株を用いて間葉系幹細胞の細胞表面マーカー等の性状を解析し、それを利用して間葉系幹細胞の分離・移植法を確立する。</p> <p><u>骨芽細胞の分化を調節する転写因子群の機能の解析</u>：骨芽細胞の分化に必要な Cbfa1 以外の転写因子を同定し、それらと Cbfa1 の相互作用を解析することにより、骨芽細胞の分化に関与する転写因子群を総括的に解析する。</p> <p>さらに、本研究では上記研究課題の成果を効率良く臨床応用するための基礎研究も同時に推進する。</p>						

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

A) カエル骨格形成の解析

- マウスの軟骨内骨化では Indian Hedgehog(Ihh)が重要な役割を担っているため、マウスとカエルの軟骨内骨化部における *Hedgehog* 及び標的遺伝子である *Patched*, *Gli* の発現パターンを比較した。マウス大腿骨では骨髄に接する肥大軟骨細胞に *Ihh* が発現し、軟骨内骨化が起る骨髄部の間葉系細胞に *Patched*, *Gli* が発現しており、*Ihh* のシグナルが軟骨内骨化部に伝達していた。一方、カエルではマウス *Ihh* のホモログである *Banded Hedgehog(Bhh)* は軟骨・骨髄境界部からやや離れた軟骨細胞で発現し、軟骨に接する骨髄部の間葉系細胞には *Patched* および *Gli* の発現がみられず、*Bhh* のシグナルが骨髄の間葉系細胞に伝達されていないと考えられた。

次に *Ihh*, *Bhh* 及び *Sonic Hedgehog(Shh)* のリコンビナント蛋白を用いてマウス間葉系細胞 C3H10T1/2 細胞、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 などの骨芽細胞の分化に及ぼす各 *Hedgehog* の作用を解析した。その結果、*Shh* と *Ihh* は骨細胞分化誘導作用を有していたが（研究業績：1）*Bhh* は骨芽細胞の分化誘導作用を示さなかった。

以上の結果は、カエルの骨格形成過程における軟骨内骨化の遅延は、*Bhh* が骨髄から離れた部位に発現していることと、*Bhh* の骨芽細胞分化誘導活性が低いことに起因している可能性を示唆している。（投稿論文準備中、研究業績：15）

- トランスジェニックフロッグ、トランスジェニックマウス作製の準備も進めているが、予定よりやや遅れている。

B) 間葉系幹細胞の性状の解析及び分離・移植法の確立

1) 間葉系幹細胞の性状を具備する細胞株の樹立と性状の解析

- ヒト過誤腫より SV40LargeT 抗原導入により単一細胞に由来し、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、骨格筋、平滑筋への分化能を保持する細胞株 CloneK を樹立した（論文投稿中、研究業績 13）。
- ヒト軟骨肉腫から樹立した細胞株 USAC は軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞への分化能を保持しており、この細胞がヒト間葉系細胞の分化過程の解析に有用なことを報告した（研究業績：10）。
- BMP-2 により骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化する C3H10T1/2 細胞と分化しない C3H10T1/2 細胞で発現レベルの異なる遺伝子をマイクロアレイで解析中である。

2) 間葉系幹細胞のマーカーの同定

CloneK における細胞表面マーカーの発現を FACS にて解析した。その結果、CD45(-), CD73(++), CD105(++), CD107(+)であった。現在、USAC 細胞も用いて他のマーカーの発現を解析中である。

C) 骨芽細胞の分化を調節する転写因子群の機能の解析

1) Cbfa1(Runx2)欠損細胞株の性状の解析（投稿論文準備中、研究業績 14）

Runx2 ノックアウトマウスの胎仔頭蓋冠から樹立した細胞株 C2 及び C6 は BMP-2 の作用により骨芽細胞へ分化した。さらに、C6の方がC2より効率的に BMP-2 の作用で骨芽細胞へ分化したので、C6 は骨芽細胞の分化を制御する *Runx2* 以外の転写因子の検索に有用と考えられた。

2) C6 にアデノウイルスベクターで BMP-2 を導入し、発現レベルの変動する遺伝子群をマイクロアレイで解析中である。この中から骨芽細胞の分化に関連する転写因子群を抽出する予定である。

3) 骨芽細胞の分化を調節する転写因子群の機能の解析（研究業績：2,7,8,12）

- 骨、軟骨の発生過程で重要な役割を担う cartilage homeoprotein-1(*Cart1*)の転写活性化部位は C 末端に存在し、p300/CBP が転写共役因子として重要なことを明らかにした。（研究業績：2,7）
- 骨芽細胞の分化過程及び骨形成過程 Notch シグナルの重要性を明らかにした（研究業績：8）
- 骨格形成で重要な役割を担う *Msx2* は BMP-2 の骨芽細胞の分化を促進し、脂肪細胞の分化を抑制することを明らかにした（研究業績：12）

D) 解析結果を臨床応用するための基礎研究

- 骨欠損部への細胞移植に有用な担体を開発した（研究業績：3）
- PTH とビスフォスフォネートは卵巣摘出ラットの骨再生及び骨欠損部へのインプラント生着の促進に有効であることを示した（研究業績：4,5）
- GFP トランスジェニックマウスから採取した細胞を野生型の骨欠損部に移植する実験系を確立し、生体内で移植細胞の運命を追跡できる実験系を確立した。また、BMP-2 を過剰発現した皮膚線維芽細胞の移植が骨再生に有用なことを明らかにした（研究業績：6,11）
- 9.4-T magnetic resonance (MR)が骨格の解析に有用なことを示した（研究業績：9）

特記事項（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。）

1. カエル骨格形成の解析を推進する理由とその独創性と重要性

脊椎動物の骨格は環境に適応して様々な変遷を遂げてきた。特に、水生と陸生の脊椎動物との間では生活様式が異なるために、骨格に大きな差異がみられると想像されている。陸生脊椎動物では、骨格が強靱な支持組織として機能していると共にカルシウムの貯蔵庫としても機能しているが、両生類を含む水生脊椎動物でも骨格が陸生脊椎動物と同様の機能を担っているのか解析されていない。我々はこのような観点から水性及び陸生の脊椎動物の骨格を解析することにより、脊椎動物が上陸した時に獲得した骨格の構造的変化を明らかに出来るのではないかと考え、両生類、爬虫類、哺乳類の長管骨を形態学的に解析した。その結果、両生類であるカエルの長管骨の形成過程では、爬虫類、哺乳類に比べて軟骨内骨化が極端に遅延していた。つまり、脊椎動物が上陸した時に長管骨の軟骨内骨化という特徴的な構造を獲得したとも考えられる。我々はカエルで軟骨内骨化が極端に遅延するメカニズムに Hedgheog が関与している可能性を考えた。そして、本研究でカエルでは Bhh が骨髄から離れた軟骨に発現していることと、Bhh の骨芽細胞分化誘導活性が低いことがカエルの軟骨内骨化の遅延に関連している可能性を示唆することができた。後者の可能性は、哺乳類の Ihh には骨芽細胞分化誘導作用があるが、両生類のホモログである Bhh には骨芽細胞分化誘導作用がないことを示唆している。この点を証明できれば、Hedeghog ファミリーは進化の過程で骨芽細胞の分化に及ぼす作用を獲得したことになり、分子進化の面からも非常に興味ある展開となるであろう。

一方、我々は両生類（カエル）、爬虫類（トカゲ、カメ）、哺乳類（マウス）における骨形成と骨吸収を骨形態計測的に解析し、カエルではトカゲ、カメ、マウスに比べて骨形成と骨吸収が非常に遅いことを明らかにした（論文投稿準備中）。この結果は、カエルでは骨代謝回転が非常に遅く、骨組織からのカルシウム動員がほとんどないことを示唆している。水性ガエルであるアフリカツメガエルは淡水中からカルシウムを摂取できる。そして、陸生ガエル・樹上生ガエルは脊椎後方の内リンパ囊の炭酸カルシウムを生理的に利用することができるので、この組織がカルシウム貯蔵庫として機能しており、カエルでは爬虫類、哺乳類に比べて骨組織からのカルシウム動員が少ないと考えられる。前述したように、爬虫類、哺乳類の軟骨内骨化は脊椎動物が上陸した時に獲得した構造と考えられるので、陸生脊椎動物の軟骨内骨化部はカルシウム貯蔵庫として機能している可能性がある。この仮説は低カルシウム食飼育動物や骨粗鬆症の初期では長管骨の軟骨内骨化部の骨が急速に減少する現象からも支持される。

以上のように、脊椎動物の進化の過程で骨格形成がどのような変遷を経てきたかを詳細に解析しているグループは他になく、われわれの研究は独創性の高いものと考えられる。

2. 現在までにヒトの間葉系幹細胞の分離法が報告されているが、それらは全て初代培養を行う方法で、間葉系幹細胞の解析を行うために採取する必要がある。そのため、ヒト間葉系幹細胞の詳細な解析をするためには、間葉系幹細胞の性状を具備した細胞株の樹立が望まれていた。我々はこの点に注目し、ヒト過誤腫とヒト軟骨腫から種々の間葉系細胞への分化能を保持した細胞株の樹立に成功した。このような細胞株の報告がないために、今後これらの細胞株がヒト間葉系幹細胞の性状の解析に有用となるであろう。

3. Runx2 は骨芽細胞の分化を制御する重要な転写因子であるが、骨芽細胞の分化は他の転写因子も含めた多くの因子により制御されている。我々は Runx2 ノックアウトマウスの頭蓋冠から細胞株を樹立し、これらが BMP-2 の作用により骨芽細胞へ分化することを見いだした。この結果は、これらの Runx2 欠損細胞株を用いることにより Runx2 以外の骨芽細胞の分化を制御する転写因子の解析が容易となる。事実、我々は Msx 2 が Runx2 を介さない経路で骨芽細胞の分化を促進することを証明できた。今後、これらの細胞株を利用することにより骨芽細胞の分化を制御する転写因子群の相互作用を解析することができる。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文 (発表予定のものを記入することも可能。) の全著者名、論文名、学協会誌名、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年 (西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

原著論文

1. Yuasa T, Kataoka H, Kinto N, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Iemura S, Ueno N, Shibata Y, Kurosawa H, and Yamaguchi A: Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2. *J Cell. Physiol.* 193:225-232, 2002
2. Furukawa K, Iioka T, Morishita M, Yamaguchi A, Shindo H, Namba H, Yamashita S, and Tsukazaki T: Functional domains of paired-like homeoprotein Cart1 and the relationship between dimerization and transcription activity. *Genes Cells* 11:1135-1147, 2002
3. Ochi K, Chen G, Ushida T, Gojo S, Segawa K, Tai H, Ueno K, Ohkawa H, Mori T, Yamaguchi A, Toyama Y, Hata J, and Umezawa A: Use of mature osteoblasts in abundance act as desired -shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-Lactic-co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge. *J Cell. Physiol.* 194:45-53, 2003
4. Shirota T, Tashiro M, Ohno K, Yamaguchi A. : Effect of intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment on the bone response after placement of titanium implants into the tibia of ovariectomized rats. *J Oral Maxillofac Surg* 61:471-480:2003
5. Tokugawa Y, Shirota T, Ohno K, Yamaguchi A. Effects of bisphosphonate on bone reaction after placement of titanium implants in tibiae of ovariectomized rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 18:66-74:2003
6. Hirata K, Tsukazaki T, Kadowaki A, Furukawa K, Shibata Y, Moriishi T, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Mizuno A, and Yamaguchi A: Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 promotes bone repair more effectively than those expressing Runx2. *Bone* 32:502-512, 2003
7. Iioka T, Furukawa K, Yamaguchi A, Shindo H, Yamashita S, Tsukazaki T: p300/CBP acts as a coactivator to cartilage homeoprotein-1 (Cart1), paired-like homeoprotein, through acetylation of the conserved lysine residue adjacent to the homeodomain. *J Bone Miner Res* 18:1419-1429, 2003
8. Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K, Yamaguchi A, Umezawa A, Takagi M, Katsube K, Suda H.: Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by Notch signaling. *Exp Cell Res.* 290:370-380, 2003
9. Ichikawa Y, Sumi M, Ohwatari N, Komori T, Sumi T, Shibata H, Furuichi T, Yamaguchi A, Nakamura T: Evaluation of 9.4-T MR microimaging in assessing normal and defective fetal bone development: comparison of MR imaging and histological findings. *BONE* 34:619-628, 2004
10. Yagami K, Uyama Y, Yoshizawa Y, Kakuta S, Yamaguchi A, Nagumo M: A human chondrogenic cell line retains multi-potency that differentiates into osteoblasts and adipocytes. *BONE* 34:648-655, 2004
11. Kadowaki A, Tsukazaki T, Hirata K, Shibata Y, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Yoshida N, Yamaguchi A: Isolation and characterization of a mesenchymal cell line that differentiates into osteoblasts in response to BMP-2 from calvariae of GFP transgenic mice. *BONE* (in press)
12. Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, Yatani H, Cao X, Komori T, Yamaguchi A, Yoneda T: Reciprocal roles of Msx2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* (in revision)
13. Doiguchi Y, Tsukazaki T, Tomonaga T, Nobuta M, Fujita S, Hayashi T, Nagai K, Matsumoto T, Shindo Y, and Yamaguchi A: Establishment of a clonal human mesenchymal cell line that retains multilineage differentiation capacity from a spinal hamartoma. *Cell Tissue Res* (in revision)
14. Furukawa K, Yuasa T, Shibata Y, Tsukazaki T, Bessho K, Komori T, and Yamaguchi A: Bone morphogenetic protein-2 promotes expression of osteoblast- and chondroblast-related genes in cell lines isolated from calvariae of *Runx2*-deficient mice. (manuscript in preparation)
15. Moriishi T, Shibata Y, Fujita S, Tsukazaki T, Nishida A, Ito M, Yamaguchi A: Developmental difference of endochondral bone formation between *Xenopus laevis* and mouse. (manuscript in preparation)

国際会議、学会での発表 11 回 (招待講演 1 回)