

## 骨形成機構の総括的解析とその応用

### Comprehensive analysis of bone formation and its application

山口 朗 (Akira Yamaguchi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授



#### 研究の概要

我々の今までの骨芽細胞の分化制御機構の研究をさらに発展させるために、脊椎動物の軟骨内骨化の制御機構の解析、ヒト間葉系幹細胞の樹立と性状の解析、骨芽細胞の分化を制御する転写因子の機能の解析を総括的に推進し、臨床応用への基盤を構築した。

#### 研究分野／科研費の分科・細目／キーワード

医歯薬学／歯学・形態系基礎歯学／骨、骨形成、進化、カエル、骨芽細胞、間葉系幹細胞、Runx2, BMP, CCN3, Notch

#### 1. 研究開始当初の背景・動機

我々は骨芽細胞の分化制御機構の解析を行ってきた。この間に、脊椎動物の進化における骨格形成の変遷に興味を持ち始めた。そして、このような骨格の進化に関する研究と現在の骨生物学の発展を融合させることが重要であるという考え、本研究を立案するに至った。

#### 2. 研究の目的

本研究では、我々の今までの骨芽細胞の分化調節機構に関する研究成果を基盤として、以下の3点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基盤を構築することを目的とした。

- (1) カエルの骨格形成過程を解析し、軟骨内骨化制御分子を解明する
- (2) 間葉系幹細胞の性状を解析し、分離・移植法を確立する
- (3) 骨芽細胞の分化を制御する転写因子群の機能の解析

#### 3. 研究の方法

- (1) 軟骨内骨化制御分子の解明
  - ・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ことが報告されているので、カエルの骨格形成過程における Hedgehog (Ghh) の発現を解析した。
  - ・カルシウム貯蔵庫としての軟骨内骨化の役割を解析した。
  - ・カエル骨格系細胞の培養系を確立し、分化制御機構を解析した。
- (2) 間葉系幹細胞の性状の解析
  - ・ヒトの間葉系幹細胞の性状を具備する細胞株を樹立し、その性状を解析した。

- ・ GFP トランスジェニックマウスの皮膚から培養した線維芽細胞に BMP-2 遺伝子を導入し、種々の担体に付着させ、野生型マウスの皮下に移植後、移植細胞の動態と骨形成能を解析した。
- (3) 骨芽細胞の分化を制御する転写因子群の解析
    - ・ Runx2 欠損細胞株の樹立とその性状の解析
    - ・ 骨芽細胞分化における BMP 及び Notch シグナルと Runx2 の相互作用の解析
  - (4) 解析結果を基盤とした臨床応用への展開
    - ・ 新たな骨再生療法開発への展開
    - ・ 破骨細胞の分化・機能制御機構の解析と骨芽細胞の相互作用の解析

#### 4. 研究の主な成果

- (1) 軟骨内骨化制御分子の解明
  - ・ カエルの長管骨では他の脊椎動物に比べて軟骨内骨化の形成が顕著に遅れていることを明らかにした(右図)。

マウス カエル  
赤丸は軟骨内骨化部
  - ・ カエル軟骨内骨化が遅延するメカニズムとしては、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と考えられた。
  - ・ カエルでは傍脊椎リンパ囊の石灰化物がカルシウム貯蔵庫として機能しており、脊椎動物の進化の過程で爬虫類から軟

#### [4. 研究の主な成果 (続き)]

骨内骨化部がカルシウムの貯蔵庫としての機能を獲得してきたことが示唆された。

#### (2) 間葉系幹細胞の性状の解析

- ・ヒト過誤腫より骨芽細胞、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 **HHC-7** を樹立した。
- ・ヒト軟骨肉腫から軟骨細胞、骨芽細胞、脂肪細胞への分化能を保持する細胞株 **USAC** を樹立した。
- ・CD73, CD105 がヒト間葉系幹細胞のマーカーであることが示唆された。

#### (3) 骨芽細胞の分化を制御する転写因子群の解析

- ・Runx2ノックアウトマウスの胎仔頭蓋冠から細胞株を樹立し、これらの細胞がBMP-2の作用により *osterix*, *Msx2*, *Dlx5*などの転写因子を介してある段階までの骨芽細胞分化へ分化できるが、骨形成細胞までは分化できないことを明らかにした。
- ・骨芽細胞分化と骨再生過程におけるNotchシグナルの重要性を明らかにした。
- ・CCN3はBMPシグナルとNotchシグナルを介してBMP-2が誘導するRunx2の機能を低下させ、骨芽細胞分化を抑制することを見出した。
- ・*Msx2*が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。
- ・Shh, *Ihh*は転写因子Gliを介して骨芽細胞、歯牙形成細胞の分化を抑制することを明らかにした。

#### (4) 解析結果を基盤とした臨床応用への展開

- ・BMP-2 遺伝子を導入したラット歯肉線維芽細胞をラット下顎骨の骨欠損部に移植することにより、骨再生の亢進が確認できたので、歯科臨床への応用が可能と考えられた。
- ・本研究で得られた骨形成機構の解析を基盤として臨床応用へ展開するには、骨吸収機構も十分に解析しておくことが極めて重要であるので破骨細胞に関する研究も行った。
- ・破骨細胞の制御にCaMKs-CREB経路の重要性を明らかにした。
- ・Th17ヘルパー細胞がT細胞の活性化と骨壊解に関与することを明らかにした。
- ・TNF受容体欠損マウスでは骨吸収が抑制され、矯正歯牙移動が遅れることを明らかにした。
- ・Runx2欠損細胞を用いてRunx2がRANKL,

OPG 遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。

#### 5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

- (1) 軟骨内骨化部は陸上で生活する脊椎動物がカルシウム貯蔵庫として獲得した構造であることを示唆した。国内外でこのような観点から骨を解析しているグループはなく、独創的な研究である。
- (2) ヒト過誤腫とヒト軟骨肉腫から樹立した細胞株は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) 我々が樹立した **Runx2** 欠損細胞株は用いた研究は国内外でも高く評価されている。
- (4) 骨芽細胞分化、骨再生過程におけるCCN3, BMP, Notchシグナルのクロストークを初めて明らかにした。

#### 6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. Liu T, Gao Y, **Sakamoto K**, Minamizato T, Furukawa K, Tsukazaki T, Shibata Y, Bessho K, Komori T, **Yamaguchi A**: BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in *Runx2*-deficient cell lines. *J Cell Physiol* 211:728-735,2007
2. Minamizato T, **Sakamoto K**, Liu T, Kokubo H, **Katsube K**, Perbal B, Nakamura S, **Yamaguchi A**: CCN3/NOV inhibits BMP-2-induced osteoblast differentiation by interacting with BMP and Notch signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 354:567-573,2007
3. Sato K, Suematsu A, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Morishita Y, Asahara H, Ohya K, **Yamaguchi A**, Takai T, Kodama T, Chatila TA, Bito H Takayanagi H: Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK/CREB pathway. *Nat Med* 12, 1410-1416, 2007
4. Moriishi T, Shibata Y, Tsukazaki T, **Yamaguchi A**: Expression profile of *Xenopus banded hedgehog*, a homolog of mouse *Indian hedgehog*, is related to the late development of endochondral ossification in *Xenopus laevis*. *Biochem Biophys Res Commun* 328:867-873,2005
5. Nobta M, Tsukazaki T, Shibata Y, Chang X, Moriishi T, Sakano S, Shindo H, **Yamaguchi A**: Critical regulation of BMP-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling. *J Biol Chem* 280:15842-15848,2005
6. Doiguchi Y, Tsukazaki T, Tomonag T, Nobuta M, Fujita S, Hayashi T, Nagai K, Matsumoto T, Shindo H, **Yamaguchi A**: Establishment of a clonal human mesenchymal cell line that retains multilineage differentiation capacity from a spinal hamartoma. *Cell Tissue Res* 317:237-246,2004
7. Hirata K, Tsukazaki T, Kadowaki A, Furukawa K, Shibata Y, Moriishi T, Okubo Y, Bessho K, Mizuno A, **Yamaguchi A**: Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 promotes bone repair more effectively than those expressing Runx2. *Bone* 32:502-512,2003
8. Yuasa T, Kataoka H, Kinto N, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Iemura S, Ueno N, Shibata Y, Kurosawa H, **Yamaguchi A**: Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2. *J Cell Physiol* 193:225-232,2002

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/dent/opat/opat-J.htm>