



骨になるか軟骨になるかを運命づけるメカニズム
ヘッジホッグと BMP 経路の相互作用により軟骨膜細胞の骨・軟骨への分化が決められることを発見

1. 発表者：

北條 宏徳（東京大学大学院医学系研究科、日本学術振興会 特別研究員）
大庭 伸介（東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 特任准教授）
鄭 雄一（東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 教授）

2. 発表のポイント：

◆培養下で軟骨膜を骨に誘導する新規器官培養系を開発し、BMP が、ヘッジホッグ（注1）経路活性時には骨の形成を、ヘッジホッグ経路不活性時には軟骨の形成を促進することを明らかにした。

◆ヘッジホッグ経路の下流では、転写因子 Gli1 が BMP による軟骨細胞の分化促進作用を抑制することを明らかにした。

◆一細胞定量的 PCR 法を駆使することで、軟骨膜には骨芽細胞や軟骨細胞に分化し得る様々な細胞集団が存在し、ヘッジホッグへの応答性も異なることを明らかにした。

◆ヘッジホッグ、BMP による骨・軟骨分化決定の制御メカニズムの一端が明らかとなったことで、軟骨膜細胞を標的とした再生医療法を開発する際の足がかりとなることが期待される。

3. 発表概要：

体の中には複数の細胞に分化することができる前駆細胞が存在します。軟骨組織を覆う軟骨膜には、胎児の骨格が形成される過程において、骨と軟骨の両方に分化できる前駆細胞が存在し、将来の骨形成に寄与すると考えられています。発生学的には、軟骨膜細胞は骨組織の細胞源となるだけでなく、特定の遺伝子が働かなくなると軟骨組織を形成することが知られています。これら軟骨膜細胞の分化決定にはヘッジホッグ（注1）や BMP（Bone Morphogenetic Protein、骨形成性タンパク質）（注2）など、様々な因子により制御されていることはわかっていますが、その制御機構は完全には解明されていません。

東京大学大学院医学系研究科の北條宏徳特別研究員（現 南カリフォルニア大学 Broad-CIRM センター所属）、東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻の大庭伸介特任准教授、鄭雄一教授らは、日立製作所の神原秀記フェローやミシガン大学の三品裕司准教授らのグループと共同で、ヘッジホッグと BMP の相互作用が軟骨膜における骨・軟骨前駆細胞の分化運命決定の制御機構に関わることを解明しました。本研究が、ヘッジホッグや BMP 等を利用した骨や軟骨の再生療法を開発する際の足がかりとなることが期待されます。

4. 発表内容：

軟骨組織を覆う軟骨膜には発生学的に骨の細胞源となる前駆細胞が存在することが知られております。この前駆細胞は正常時は骨を形成する骨芽細胞へと分化しますが、遺伝子改変マウスを中心とした最近の研究により、ヘッジホッグ経路がはたらかなくなると骨の代わりに、異所性に軟骨組織が形成されることが分かっています。一方、骨形成性タンパク質 BMP（Bone Morphogenetic Protein）はその名前が示す通り骨の形成を促進するタンパク質ですが、骨形

成だけでなく軟骨形成も促進することが知られております。しかしながら、軟骨膜細胞においてヘッジホッグ経路と BMP 経路がどのように骨・軟骨の形成を制御しているか、その詳しいメカニズムは不明でした。

北條宏徳特別研究員（日本学術振興会、東京大学大学院医学系研究科、現 南カリフォルニア大学 Broad-CIRM センター）、大庭伸介特任准教授（東京大学大学院工学系研究科）、鄭雄一教授（東京大学大学院工学系研究科）、神原秀記フェロー（日立製作所）、三品 裕司准教授（ミシガン大学歯学部）らの研究グループは、「ヘッジホッグ経路と BMP 経路の相互作用により軟骨膜細胞の骨もしくは軟骨への分化の運命が決められる」、という仮説を立て以下の実験に取り組みました。まず、培養下で軟骨膜から骨形成を誘導する器官培養系を新たに開発し、ヘッジホッグ経路と BMP 経路の活性化および不活化の影響を検討しました。その結果、ヘッジホッグ経路と BMP 経路を同時に活性化させると、骨形成が顕著に増大しました。一方、ヘッジホッグ経路の不活化状態では、BMP 経路を活性化させても全く骨は形成されず、代わりに軟骨膜において軟骨組織が観察されました（添付資料 図①）。本結果は遺伝子改変マウスを用いた解析でも再現されました。以上の結果はヘッジホッグ経路の活性化は BMP による骨形成作用を促進するだけでなく、軟骨形成作用を抑制することを示唆しております。

ヘッジホッグ経路の下流には Gli1・Gli2・Gli3 の三つの転写因子（注 3）が存在し、細胞内シグナルの制御を担っていることが知られております。研究グループはこれまでに、遺伝子改変マウスの骨組織の解析から、Gli1 と Gli3 がヘッジホッグ経路応答性に骨形成に関与することを報告してきました（Ohba S et al. *Dev Cell* 14:689-99, 2008; Hojo H et al. *J Biol Chem* 287:17860-69, 2012）（注 4、5）。そこで、ヘッジホッグと BMP の相互作用のメカニズムについて、Gli に着目してさらに解析を進めました。骨・軟骨前駆細胞株を用いて検討した結果、Gli1 が BMP による軟骨細胞の分化促進作用を抑制することが明らかとなりました。さらに、Gli1 遺伝子を欠失したマウス胎児の中足骨では、軟骨膜において通常認められる骨芽細胞前駆細胞が消失し、代わりに異所性に軟骨細胞が認められました。以上の結果は、Gli1 が軟骨膜において BMP 経路による軟骨形成促進作用を抑制することで正常な骨形成に寄与していることを示唆しております。

最後に、軟骨膜に存在する細胞の形質を知る目的で、骨芽細胞、軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現を一細胞定量的 PCR（注 6）により解析しました。その結果、軟骨膜には骨芽細胞、軟骨細胞のいずれか、もしくはその両方の分化マーカー遺伝子を発現する細胞が混在していることが明らかになりました（添付資料 図②）。これらの細胞に対して、ヘッジホッグ経路を活性化させると、一部の細胞で骨芽細胞の分化マーカー遺伝子が発現しましたが、発現しない細胞も認められました。以上の結果より、軟骨膜には骨芽細胞や軟骨細胞に分化し得る様々な細胞集団が存在し、ヘッジホッグへの応答性も異なることが示唆されました。

このように、本研究ではヘッジホッグと BMP の相互作用により軟骨膜細胞から骨・軟骨細胞への分化の運命決定が制御されていること、またそのメカニズムの一端が明らかとなりましたが、メカニズムの全貌や軟骨膜細胞の特色など多くの点は不明のままです。研究グループは、本研究の成果が、軟骨膜細胞を標的とした再生医療法を開発する際の足がかりとなることを期待します。

5. 発表雑誌：

雑誌名：

Journal of Biological Chemistry

論文タイトル：

Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium

著者：

Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Kiyomi Taniguchi, Masataka Shirai, Fumiko Yano, Taku Saito, Toshiyuki Ikeda, Keiji Nakajima, Yuske Komiyama, Naomi Nakagata, Kentaro Suzuki, Yuji Mishina, Masahisa Yamada, Tomohiro Konno, Tsuyoshi Takato, Hiroshi Kawaguchi, Hideki Kambara, and Ung-il Chung

DOI 番号：10.1074/jbc.M112.409342

アブストラクト URL：

<http://www.jbc.org/content/early/2013/02/19/jbc.M112.409342.abstract>

6. 注意事項：

Journal of Biological Chemistry 288 巻 9924-9932 頁 (2013 年 4 月 5 日発行) 上にて発表予定。解禁時間は設定されておりません。

7. 問い合わせ先：

東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻
特任准教授 大庭 伸介

南カリフォルニア大学 Keck 医科大学 Broad-CIRM センターMcMahon 研究室
日本学術振興会 特別研究員
北條 宏徳

8. 用語解説：

(注1) ヘッジホッグ：

細胞から分泌されるタンパク質ファミリーの一つで、細胞の運命決定や器官形成および個体発生において重要な役割を果たしている。脊椎動物では、ソニックヘッジホッグ、デザートヘッジホッグ、およびインディアンヘッジホッグの3つが存在する。ヘッジホッグタンパク質を受け取った細胞では、細胞内の特定のシグナル経路が活性化されて、標的遺伝子が転写される(注3参照)。

(注2) BMP (Bone Morphogenetic Protein、骨形成性タンパク質)：

細胞から分泌されるタンパク質ファミリーの一つで、皮下に埋入された脱灰骨が異所性に軟骨内骨化を引き起こすことから命名され、現在までに20種類以上同定されている。

(注3) Gli1, Gli2, Gli3：

ヘッジホッグシグナルの標的遺伝子の転写を制御していると考えられているタンパク質。Gli1 と Gli2 は標的遺伝子の転写を活性化させる働きを持っているのに対し、Gli3 は、主に抑制型としてはたらくことが知られている。

(注4) Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung UI: Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. Dev Cell 14:689-99, 2008

(注5) Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI: Gli1 protein participates in the hedgehog-

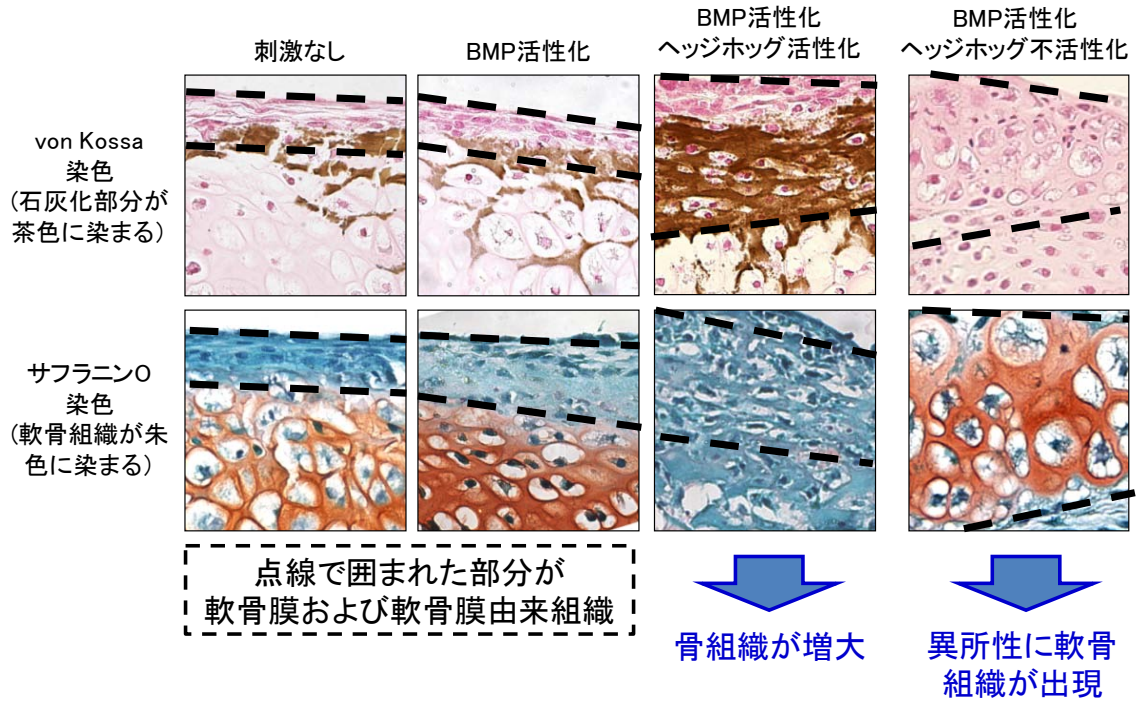
mediated specification of the osteoblast lineage during endochondral ossification. J Biol Chem 287:17860-69, 2012

(注6) 一細胞定量的PCR:

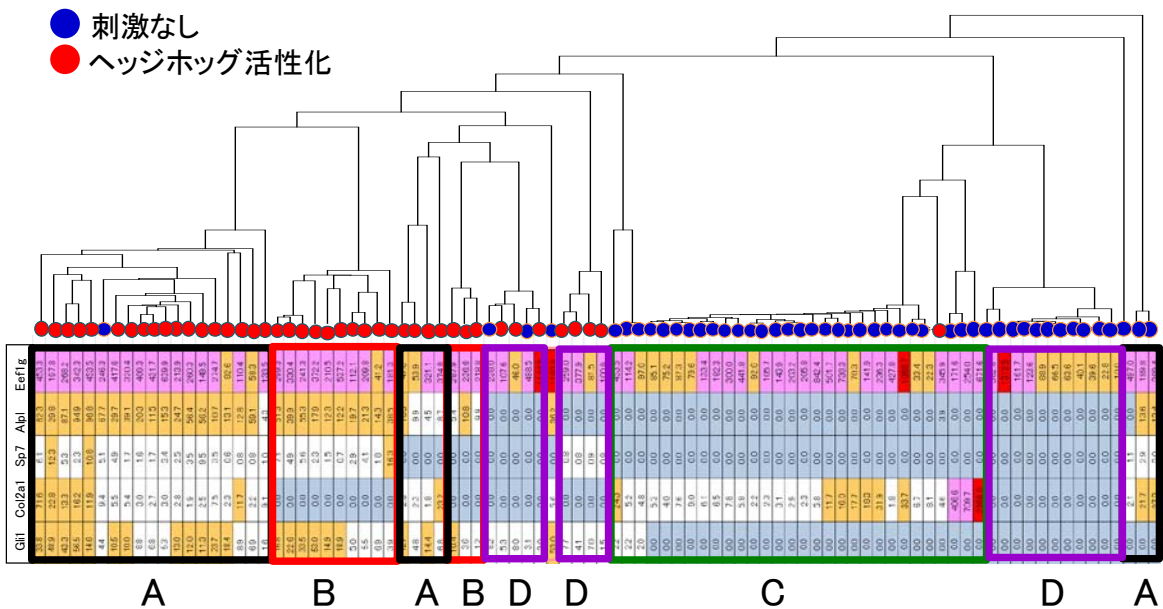
一細胞あたり、どのメッセンジャーRNAがどの程度発現しているか定量化する方法。神原秀記フェロー（日立製作所）らによって開発された技術。

9. 添付資料 :

図① 中足骨器官培養系を用いた軟骨膜におけるHhとBMPの相互作用の解析



図② 軟骨膜細胞を用いた一細胞定量的PCR



グループA: 骨芽細胞と軟骨細胞の両方の形質を併せ持つ
 グループB: 骨芽細胞の形質のみ有している
 グループC: 軟骨細胞の形質のみ有している
 グループD: どちらの形質も有していない