

骨形成過程に関わる遺伝子群の解明

「形とはたらき」領域 小守 壽文

1. 研究のねらい

骨格を形成する骨・軟骨は一見単純な構造物のように見えますが、それがどのような遺伝子によってどのように形成されるかは意外によくわかっていません。骨は骨芽細胞によって直接形成されるもの（膜性骨化と言い頭蓋骨等に起こる）と軟骨を経て骨に置き変わるもの（内軟骨性骨化と言い四肢骨、肋骨等に起こる）があります。軟骨はもちろん軟骨細胞によって形成され、軟骨細胞が成熟した後（肥大軟骨細胞）、血管が軟骨基質を溶解する破骨細胞とともに侵入し、そこにできた空間（骨髄）に造血が始まるとともに、軟骨周囲より侵入した骨芽細胞が骨を形成し、軟骨が骨に置き変わっていくわけです。しかし、軟骨細胞にも2種類あって、関節軟骨や椎間板を構成する軟骨細胞は永久軟骨細胞と言って成熟もせず、骨にも置き変わらない軟骨細胞です。私は、白血病に関連する転写因子のノックアウトマウスを作製する過程で、Cbfa1 (core binding factor $\alpha 1$) が骨芽細胞分化に関わるマスター遺伝子であることを偶然発見しました（図1）。この遺伝子を破壊したマウスは骨芽細胞を完全に欠損し、全く骨ができません。骨形成過程の第一歩が明かとなったわけですが、

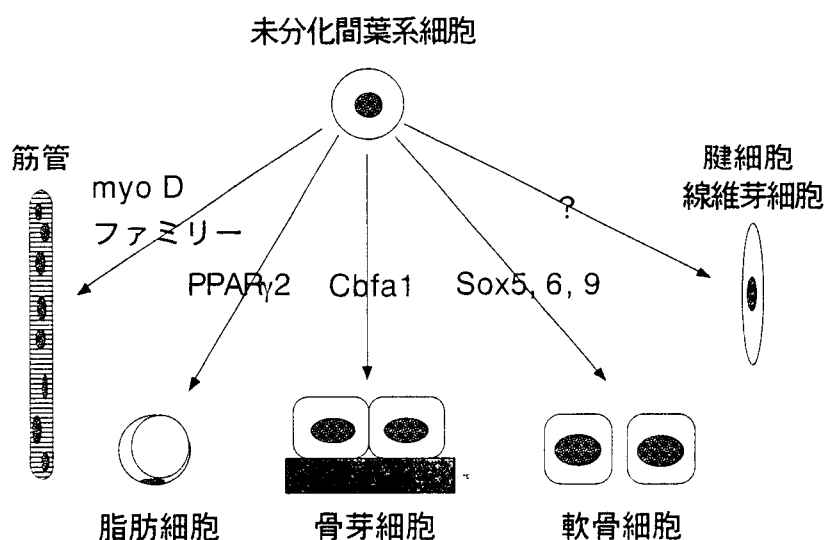


図1 未分化間葉系細胞より各細胞系列への分化
各種骨格系形成細胞への分化は、全く異なるファミリーに属する転写因子によって支配されている。

最終的に骨が形成されるには、多くの遺伝子が上記の細胞の分化およびそれらの細胞間相互作用に関わっていると考えられます。本研究では、Cbfa1 の機能を明確にするとともに、Cbfa1 が転写調節する遺伝子群を明らかにすることにより、骨形成過程を分子レベルで解きほぐしていくことを目指しました。

2. 研究方法と成果

本研究は、Cbfa1 を中心とした骨形成過程を、細胞培養による *in vitro* 実験、ノックアウトマウス・トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 実験により解析していきました。Cbfa1 が骨芽細胞分化のみならず軟骨細胞分化、破骨細胞分化、歯形成にも重要な因子であることを明らかにすることができました。さらに Cbfa1 が多くの遺伝子を転写調節し骨形成に関わっていることがわかりました。

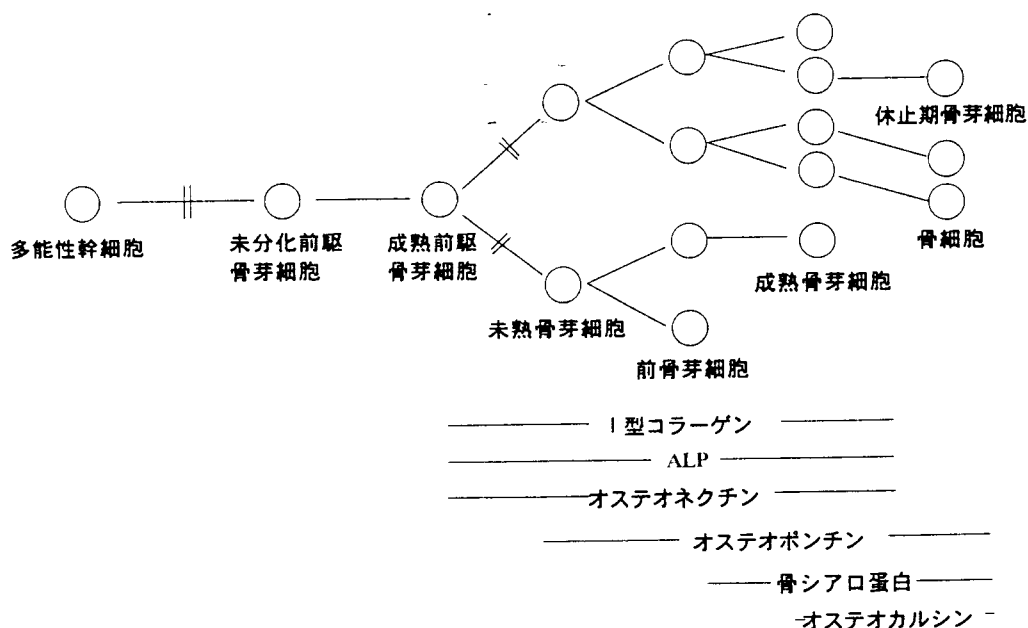


図2 骨芽細胞の分化
未分化間葉系細胞より骨芽細胞をへて骨細胞へと分化する。骨芽細胞はその分化段階により種々の骨基質を産生する。ALP: alkaline phosphatase

2-1 Cbfa1 による骨芽細胞分化

骨格系形成細胞（骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞、線維芽細胞、腱細胞）は共通の間葉系幹細胞より分化していくと考えられています（図1）。Cbfa1 ノックアウトマウスには成熟骨芽細胞は全く出現せず完全に骨を欠損します。そして出生直後に呼吸できずに死亡します。この Cbfa1 ノックアウトマウスの間葉系細胞が骨芽細胞分化のどの段階でブロッ

クされているかを調べるために、出生前日の胎生期 18.5日の胎子を帝王切開により取り出し、その頭蓋冠（前頭部と頭頂部で間葉系細胞より分化した骨芽細胞により直接骨が形成される個所）の細胞を *in vitro* で培養し、その分化能を検索しました（図2）。正常マウスの頭蓋冠由来細胞では、骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ（ALP）、オステオカルシンを発現し骨結節を形成しましたが、ノックアウトマウス由来細胞では、ALP、オステオカルシンの発現、骨結節ともに見られませんでした。また骨形成を誘導する BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) を培養液に添加して長期培養しても、また生体内に頭蓋冠由来細胞を BMP-2 とともに移植しても骨芽細胞分化も骨形成も誘導できませんでした。したがって、まず *Cbfa1* を欠損すると骨芽細胞分化能は完全に失われることがわかりました。ノックアウトマウスの頭蓋冠由来細胞は培養中に多くの細胞が脂肪細胞に自然に分化していきました。また BMP-2 とともに培養すると軟骨細胞に分化していきました。したがってノックアウトマウスの頭蓋冠由来間葉系細胞は、骨芽細胞以外の骨格系形成細胞（脂肪細胞、軟骨細胞）に分化しうる多分化能を持った細胞であることがわかりました。このことは、これらの間葉系細胞が非常に未熟な分化段階にあること、すなわち *Cbfa1* が骨芽細胞系列への分化決定の初期に関わっていることを示唆しています。また、脂肪細胞に自然に分化していったことは、*Cbfa1* が脂肪細胞分化に対しては抑制的に働いていることを示唆しており、間葉系細胞の各分化系列の決定にはそれらの分化に関わる転写因子が相互作用している可能性があります。

2-2 *Cbfa1* による軟骨細胞分化

長管骨の軟骨細胞は骨端部より骨幹部に向かって静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞と分化していきます（図3）。肥大軟骨細胞まで分化した後、軟骨基質は石灰化を起こし、同時に肥大軟骨細胞からなる骨幹部周囲では、骨芽細胞が分化しいわゆる bone collar と言う骨幹部を取り巻く骨が形成されます。同時に骨幹部（軟骨）に血管が侵入していき、軟骨の骨への置換が始まるわけです。*Cbfa1* ノックアウトマウスは軟骨による骨格形成は起こしていましたが、その軟骨は幼若な軟骨細胞によって構成されており上記の軟骨細胞の成熟が見られませんでした（図4）。そこでこの軟骨細胞分化の障害が、骨芽細胞分化障害の二次的な結果として現れているか、あるいは *Cbfa1* は軟骨細胞分化にも必要な因子であるかを明らかにする必要がありました。そこでまずインスリン存在下で軟骨細胞に分化成熟する ATDC5 細胞株を用い *Cbfa1* と軟骨細胞分化の関係を検討しました。ATDC5 細胞が分化していくと発現するコラーゲンが、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞が産生する II 型から肥

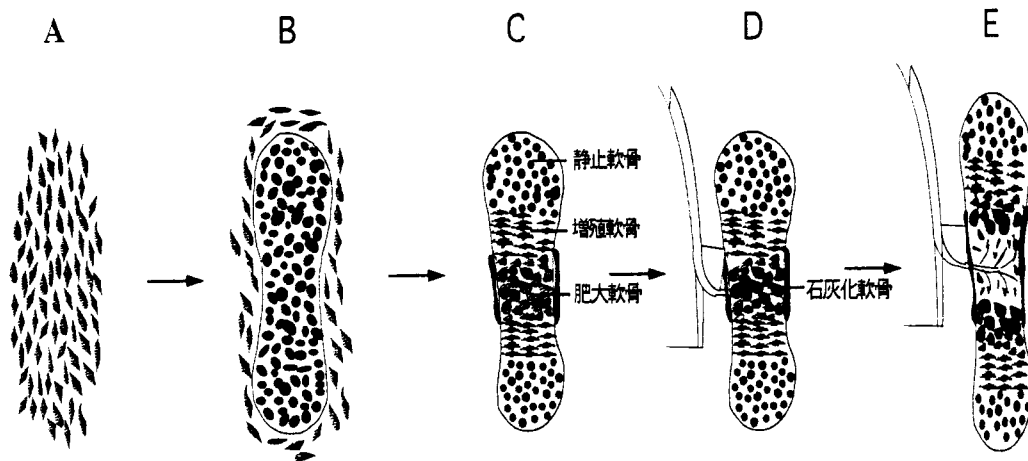
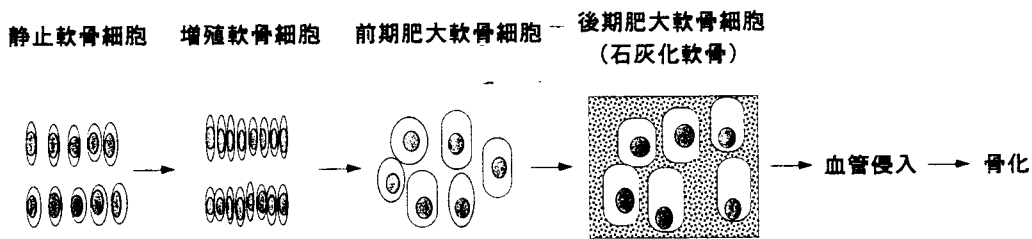


図3 内軟骨性骨化

A: 未分化間葉系細胞の凝集 B: 軟骨細胞への分化と軟骨原器の形成 C: 静止軟骨、増殖軟骨、肥大軟骨細胞層の形成と肥大軟骨細胞層周囲の骨化 D: 肥大軟骨細胞間の石灰化と同部への血管侵入 E: 軟骨の骨組織への置換と骨髓形成



静止軟骨細胞	増殖軟骨細胞	前期肥大軟骨細胞	後期肥大軟骨細胞 (石灰化軟骨)
II型コラーゲン		PTH/PTHrP レセプター	オステオポンチン
		lhh	
IX型コラーゲン		X型コラーゲン	骨シアロ蛋白
XI型コラーゲン		BMP 6	コラーゲナーゼ 3

図4 軟骨細胞の分化

軟骨細胞もその分化段階によって種々の遺伝子を発現する。Cbfa1ノックアウトマウスでは、ほとんどの軟骨で増殖軟骨細胞の段階で分化がとまっているが、ごく一部で石灰化軟骨が見られる。PTH/PTHrP: parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide, lhh: indian hedgehog

大軟骨細胞が産生するX型へと変化していきます。Cbfa1の発現は、X型コラーゲンが発現する前より数倍の増加が見られました。Cbfa1の発現を抑制した時に、この軟骨細胞分化を抑制できるかを見るために、Cbfa1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを培養液に添加しますと、その分化を著明に抑制しました。さらにCbfa1をニワトリの胸骨より得た軟骨細胞にレトロウィルスを用いて強制発現させると、軟骨細胞の成熟マーカーであるALP活性を上昇させ、X型コラーゲンの発現を誘導し、軟骨細胞の最終分化段階を示す基質の石

灰化をも誘導しました。また正常より強いDNA結合能を持つが転写活性化能のない所謂ドミナントネガティブ型(DN) Cbfa1を同様に強制発現させると、軟骨細胞分化を抑制し、Cbfa1が軟骨細胞分化に重要な因子であることがin vitroで明らかとなりました。生体内で本当にCbfa1が軟骨細胞の分化に働いているかを明らかにするために、軟骨細胞に特異的に発現するII型コラーゲンプロモーターを用いたCbfa1トランスジェニックマウス(Tg)を作製しました。さらにCbfa1の機能を抑制するために、DN Cbfa1 Tgも作製しました。Cbfa1 Tgでは、軟骨細胞は早期から成熟肥大化し、骨に置き換えられる所謂内軟骨性骨化が促進し、逆にDN Tgでは、軟骨細胞の成熟及び内軟骨性骨化が抑制されました。したがって、Cbfa1は骨芽細胞分化因子であるとともに強力な軟骨細胞の分化促進因子であることを証明することができました。

2-3 軟骨への血管侵入

Cbfa1ノックアウトマウスでは下腿、前腕の一部でのみ肥大軟骨細胞が見られましたが、そこでも血管侵入が全く見られませんでした。これらの石灰化肥大軟骨細胞に、本来発現すべきオステオポンチン、骨シアロ蛋白、コラーゲナーゼ3の発現を認めませんでした。これらの遺伝子はそのプロモーター領域にCbfa1結合配列を持ち、Cbfa1のターゲット遺伝子で

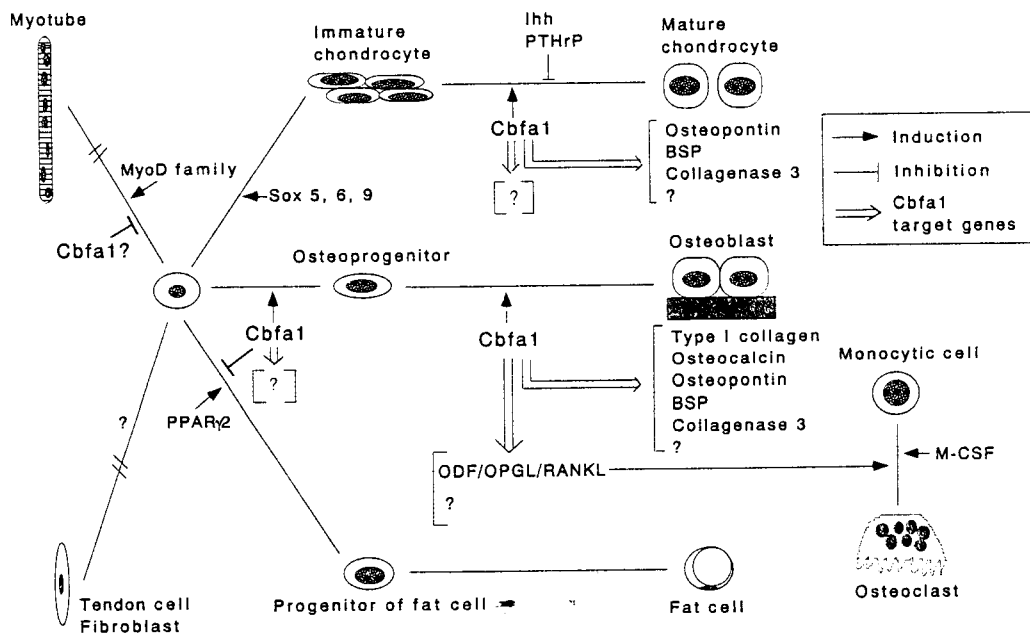


図5 Cbfa1の骨格形成における役割

Cbfa1は、未分化間葉系細胞から骨芽細胞系列への分化決定、脂肪細胞系列への分化抑制、骨芽細胞分化、成熟骨芽細胞における基質産生、軟骨細胞の成熟、肥大軟骨細胞における基質産生、軟骨への血管侵入、破骨細胞分化と骨格形成の多岐にわたる面で重要な働きをしている。

あることを *in vitro* の実験でも明らかにしました (図5)。このことは *Cbfa1* がこれらの発現を直接調節し、軟骨への血管および骨芽細胞、破骨細胞の侵入に対し重要な働きを有していることを示唆しています。

3. 今後の展望

図5に示すように、*Cbfa1* は骨芽細胞への分化決定、骨芽細胞の成熟、成熟骨芽細胞での基質産生を行っています。軟骨細胞においては、軟骨細胞の成熟、成熟軟骨細胞における基質産生に関わっています。さらに破骨細胞の成熟にも関わり、多くの遺伝子を直接支配しています。また歯形成にも必須な因子であります。しかし、間葉系細胞の各系列への分化決定がいかにか起こるか、骨芽細胞分化に必要な他の因子は何か、軟骨への血管侵入はいかにして起こるか、軟骨細胞の成熟に関する *Cbfa1* のターゲット遺伝子は何か、*Cbfa1* 自身の転写制御はいかに行われているか、歯形成における役割は何か等、多くの解決すべき課題が残っており、現在これらを解明すべく研究を進めています。これらの研究は将来的に、骨の再生、骨粗鬆症の予防・治療、関節軟骨を再生させることによる変形性関節症の治療等に利用できるものと期待しております。

論文リスト

- 1) H. Kobayashi, Y. H. Gao, C. Ueta, A. Yamaguchi, and T. Komori. Multilineage differentiation of *Cbfa1*-deficient calvarial cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273 : 630-636, 2000.
- 2) H. Enomoto, M. Enomoto-Iwamoto, M. Iwamoto, S. Nomura, M. Himeno, Y. Kitamura, T. Kishimoto, and T. Komori. *Cbfa1* is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J. Biol. Chem.* 275 : 8695-8702, 2000.
- 3) K. Hoshi, T. Komori, and H. Ozawa. Morphological Characterization of Skeletal Cells in *Cbfa1*-Deficient Mice. *Bone* 25 : 639-651, 1999.
- 4) M. Inada, T. Yasui, S. Nomura, S. Miyake, K. Deguchi, M. Himeno, M. Sato, H. Yamagiwa, T. Kimura, N. Yasui, T. Ochi, N. Endo, Y. Kitamura, T. Kishimoto, and T. Komori. Maturation disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice. *Dev. Dyn.* 214 : 279-290, 1999.
- 5) K. Deguchi, H. Yagi, M. Inada, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, and T. Komori. Excessive extramedullary hematopoiesis in *Cbfa1*-deficient mice with a

- congenital lack of bone marrow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 : 352-9, 1999.
- 6) T. Komori. A fundamental transcription factor for bone and cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press
 - 7) T. Komori. Cbfa1, a key transcription factor for skeletogenesis. In *Recent Research Development in Molecular & Cellular Biology*, S. G. Pandalai ed. (Research Signpost) in press.
 - 8) 小守壽文. 間葉系細胞からの骨芽細胞分化の転写制御. 新・分子骨代謝学と骨粗鬆症. 松本俊夫編 (メディカルレビュー社) in press.
 - 9) A. Yamaguchi, T. Komori, and T. Suda. Regulatory mechanism of osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrine Rev.* in press.
 - 10) 小守壽文. 硬組織形成における Cbfa1 の役割. *硬組織生物学会誌* in press
 - 11) 小守壽文. 骨芽細胞分化因子 Cbfa1 の変異と cleidocranial dysplasia. *医学のあゆみ* 192 : 667-671, 2000
 - 12) 小守壽文. 骨形成のマスターレギュレーター PEBP2 α A/CBFA1. *蛋白質 核酸 酵素* 45: 13-17, 2000.
 - 13) T. Komori. An essential transcription factor for hard tissue formation. *J. Hard tissue Biol.* 8 : 22-26, 1999.
 - 14) T. Komori. Role of Cbfa1 in osteoblast and chondrocyte differentiation. In *Bioceramics* vol. 12, H. Ohgushi, G. W. Hastings, and T. Yoshikawa ed. (World Scientific Publishing Co. Ltd.) pp225-228, 1999.
 - 15) 小守壽文. 骨・軟骨における Cbfa1 のターゲット遺伝子 腎と骨代謝 12 : 319-323, 1999.
 - 16) 小守壽文. 骨形成因子 リウマチ科 21 : 503-509, 1999.
 - 17) 小守壽文. 硬組織形成を制御する因子 Cbfa1 *実験医学* 17 : 107-112, 1999
 - 18) 小守壽文. Cbfa1/Pebp2 α A 遺伝子変異マウス *現代医療* 30 : 77-80, 1998.
 - 19) 小守壽文. Cbfa1/Pebp2 α A と骨形成. *臨床科学* 9 : 1256-1260, 1998.
 - 20) T. Komori and T. Kishimoto. Cbfa1 in bone development. *Curr. Opin. in Genet. Dev.* 8 : 494-499. 1998.
 - 21) 小守壽文. Cbfa1/Pebp2 α A による骨形成の新展開と展望 *実験医学* 16 : 20-24, 1998.
 - 22) 小守壽文. 骨および骨髄形成の分子機構 *免疫*1998-99 30-35, 1998

- 23) 小守壽文. 遺伝子 CBFA1/PEBP2 α A 日本臨床 6 : 72-76, 1998.
- 24) 小守壽文. 骨芽細胞分化における Cbfa1 の働き Molecular Medicine 35 : 460-466. 1998.

国際学会招待講演

1. T. Komori Cbfa1, a transcription factor for bone formation. 6th International Rheumatology Symposium in Kyoto, Japan, March, 1998.
2. T. Komori Role of Cbfa1 in osteoblast and chondrocyte differentiation. 12th International Symposium on Ceramics in Medicine in Nara, Japan, 1999.
3. T. Komori Role of Cbfa1 in endochondral ossification. International Workshop on the Runt-domain Transcription Factors in Kyoto, Japan, July, 2000.

外部発表 (論文 5 件、総説・解説19件、口頭発表: 国際会議 4 件、国内会議17件)