

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15732

研究課題名(和文) 骨格発生においてヘッジホッグ蛋白の移動を制御する細胞表面分子ネットワークの同定

研究課題名(英文) Identification of the molecular network regulating movement of Hedgehog proteins on cell surface during skeletal development

研究代表者

大庭 伸介 (Ohba, Shinsuke)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：20466733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳類の骨格発生過程においてHedgehog (Hh) 蛋白の産生と放出に関わるメカニズムを統合的に理解することを目指した。Hhの産生・細胞表面制御に関わる遺伝子の変異マウスの解析を行った。また、マウス遺伝学と分子細胞生物学的手法の統合により、骨組織におけるIhh産生細胞について新たな知見が得られつつある。これらの知見は、骨格発生過程におけるHhの産生と細胞表面制御機構の統合的理解へつながり、Hhの骨形成効果を飛躍的に高める手法の開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to understand the mechanism underlying the secretion and release of Hedgehog (Hh) proteins during mammalian skeletal development in an integrative manner. Mutant mice of genes that were involved in the secretion and cell surface regulation of Hh were analyzed. In addition, a new finding on Ihh-expressing cells are being obtained by integrative approach of mouse genetics and molecular biology. These findings will lead to integrative understanding of the secretion and cell surface regulation of Hh during skeletal development and contribute to the development of strategies that enhance the osteogenic effect of Hh.

研究分野：骨軟骨生物学

キーワード：発生・分化

1. 研究開始当初の背景

モルフォゲンとは、産生部からの濃度勾配に従って細胞の運命を決定し、形態形成を制御する物質である。これまでに、ヘッジホッグ (Hedgehog - Hh)、BMP、Wnt をはじめとした多くのモルフォゲンが同定され、その生物学的作用は種を越えて高度に保存されていることが分かっている。

申請者らは、骨格再生における適切な分化誘導刺激を明らかにすることを目指し、骨格発生過程の分子機序の解明に一貫して取り組んできた。中でも、モルフォゲンの一つである Hh が、間葉系細胞から骨形成性細胞への運命決定を司ること (Long F, Ohba S et al. *Development*, 2004; Ohba S et al. *Dev Cell*, 2008; Hojo H, Ohba S et al. *J Biol Chem*, 2012; Hojo H, Ohba S et al. *J Biol Chem*, 2013)、成体の骨恒常性維持に関与し、骨格再生に有効であること (Kitaura Y, Ohba S et al. *PLoS ONE*, 2004; Maeda Y, Ohba S et al. *Biomaterials*, 2013) を報告してきた。また、骨発生過程を模倣する胚性幹細胞の分化系 (Kanke K, Ohba S et al. *Stem Cell Rep*, 2014) を使って、Hh シグナルの下流でおこる遺伝子発現・エピゲノム変化の分子機序の解析を進めている。このように、骨格系前駆細胞における Hh シグナルの生物学的作用と作用機序、さらには骨再生医療戦略として Hh シグナルを応用することへの proof of concept が示されつつある。

一方、骨格発生過程において、Hh が産生細胞から受容細胞へ到達する分子機序については未だ不明な点が多く、骨格発生過程における Hh の産生と細胞表面制御分子ネットワークへの統合的理解には未だ程遠い。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類の骨格発生過程において Hh 蛋白の産生に関わるメカニズムを分子

生物学・生化学的観点から統合的に理解することを目指す。Hh の産生と細胞表面制御に関わる分子群の作用を統合的に理解し、骨格発生過程におけるその分子ネットワークが明らかとなれば、骨格組織における Hh シグナルの適切かつ効率的な操作が可能となる。このことは、Hh の骨形成効果を飛躍的に高める手法の開発に貢献するものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス・ES 細胞骨分化系を用いた Hh の産生・細胞表面制御に関わる分子群の機能解析

マウス遺伝学の観点から、Hh の産生・細胞表面制御に関わる因子を欠失させたマウス (ノックアウトマウス - KO マウス) をそれぞれ作出し、その胎仔骨格組織の表現型を組織学的 (H&E 染色・各種分化マーカーの免疫染色・in situ hybridization) に検討した。

また、マウス ES 細胞の骨格系細胞への分化系において、次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンス解析により、遺伝子発現プロファイリングを行った。

(2) 分子細胞生物学的手法・生化学的手法による Hh の細胞表面制御分子ネットワークの同定

Hh の産生と細胞表面制御のメカニズムに関して、異なる細胞種の共培養系における遺伝子発現解析と分化状態のリードアウトとなる特殊染色を行った。

4. 研究成果

Hh の細胞表面制御に関わる因子のうち、Hh 放出に関与する膜蛋白質 Dispatched1 (Disp1) を Sox9 陽性細胞で欠失させたマウス (Sox9-Cre;Disp1-flox) を作出し、その胎仔骨格組織の表現型を組織学的に検討し

た。現在までに、野生型と比してヘテロ K0 マウスでは著明な異常を認めないことが明らかとなった。現在ホモ欠損マウスの解析を進めている。また、近年 Hh の細胞表面制御に関わる可能性が示されている、小胞体ストレスセンサー関連遺伝子の K0 マウス胎仔から採取した中足骨の器官培養系において、成長板の増殖と分化に関わる成長因子存在下での成長板軟骨の表現型を野生型マウスのものと比べて解析した。

Hh の細胞表面制御の根幹は Hh 産生細胞と考えられるが、本研究により骨組織における Ihh 産生細胞について新たな知見が得られた。これまでに知られている前肥大・肥大軟骨細胞に加えて、別の細胞種も Ihh 産生能を有することを示唆するデータが得られた。まず、骨組織に存在する各種細胞種間の相互作用を細胞培養系で解析したところ、軟骨細胞以外の細胞から産生された Ihh がこの相互作用に関与する可能性が示された。次に、マウスの成獣骨組織において *in situ* hybridization による Ihh 遺伝子の発現を検討すると、軟骨細胞以外の Ihh 発現細胞を確認することができた。さらに、新しい Ihh 発現細胞の候補となる細胞種において特異的に活性化するプロモーター下で Cre を発現するマウスと Ihh-flox マウスを交配し、Ihh を特異的に除去したマウスを作出した。その骨組織の表現型解析が現在進行中である。また、マウス ES 細胞の骨格系細胞への分化系における遺伝子発現プロファイリング (RNA-seq) も併用した解析も進行中である。Ihh 発現細胞として新たに候補となった細胞種の機能と生理的意義に関する検討を今後も継続し、骨格発生における Hh の産生と細胞表面制御の理解につなげたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

全て査読有

1. Hojo H, [Chung UI](#), [Ohba S](#): Identification of the gene-regulatory landscape in skeletal development and potential links to skeletal regeneration. *Regenerative Therapy* 6:100-107, 2017 (doi: [org/10.1016/j.reth.2017.04.001](#))
2. Onodera S, Saito A, Hasegawa D, Watanabe K, Morita N, Nomura T, Shibahara T, [Ohba S](#), Yamaguchi A, Azuma T: Multi-layered mutation in hedgehog-related genes in Gorlin syndrome may affect the phenotype. *PLOS ONE* 12(9): e0184702, 2017 (doi: [10.1371/journal.pone.0184702](#))
3. Hojo H, McMahon AP, [Ohba S \(corresponding author\)](#): An emerging regulatory landscape for skeletal development. *Trends Genet* 32(12):774-787, 2016 (doi: [10.1016/j.tig.2016.10.001](#))
4. Kashiwagi M, Hojo H, Kitaura Y, Maeda Y, Aini H, Takato T, [Chung UI](#), [Ohba S \(corresponding author\)](#): Local administration of a hedgehog agonist accelerates fracture healing in a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 479(4):772-778, 2016 (doi:[10.1016/j.bbrc.2016.09.134](#))
5. He X, [Ohba S \(co-first\)](#), Hojo H, McMahon AP: AP-1 family members act with Sox9 to promote chondrocyte hypertrophy. *Development* 143(16):3012-3023, 2016 (doi: [10.1242/dev.134502](#))
6. [Ohba S \(corresponding author\)](#), He X, Hojo H, McMahon AP: Distinct transcriptional programs underlie Sox9 regulation of the mammalian

chondrocyte. *Cell Rep* 12(2):229-243, 2015 (doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.013)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Ichsan M, Kanke K, Hojo H, Chung UI, Ohba S: A system level investigation to unravel mechanisms and potential direct targets of the osteogenic small molecule TH. EMBL Conference: Mammalian Genetics and Genomics: From Molecular Mechanisms to Translational Applications. 2017 (selected as a awardee of the scholarship from IMGS-International Mammalian Genome Society)
2. Kitaura Y, Nakamura U, Sakashita M, Yamaguchi M, Kim M, Chung UI, Ohba S: Oral administration of an egg yolk-derived peptide promotes fracture healing in a mouse model. 39th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2017
3. 山川晃, 北條宏徳, 鄭雄一, 大庭伸介: 軟骨細胞特異的な Ihh のエンハンサーの同定と Sox9 によるその活性化機構. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会, 2017. 7, 福岡(口演)(優秀演題賞)
4. 山川晃, 鄭雄一, 大庭伸介: 軟骨細胞における Indian hedgehog の発現制御機構. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会, 2016
5. Yamakawa A, Chung UI, Ohba S: Regulatory mechanisms underlying Ihh transcription in chondrocytes. 38th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2016 (Young Investigator Award)
6. 大庭伸介: 骨形成の分子メカニズムとその骨再生への応用. 日本セラミックス協会 - 第 29 回秋季シンポジウム「生体

との調和を生み出すセラミックスの開発と評価」, 2016.9.8, 広島(招待講演)

7. Ohba S: Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using small molecules under defined conditions. 2015 International Congress of Osteoporosis (ICO), 2015 (招待講演)
8. Ohba S, He X, Hojo H, McMahon AP: Distinct modes of Sox9 action in the transcriptional regulation of developing mammalian chondrocytes. 37th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2015
9. 大庭伸介: 多能性幹細胞の段階的骨芽細胞分化誘導とその応用. 第 26 回日本小児整形外科学会学術集会 - パネルディスカッション 4「小児整形での組織移植・再生医療」, 2015 (招待講演)
10. 大庭伸介: 医工の融合によるメディカルイノベータ - 創出. 第 67 回日本気管食道科学会総会・学術講演会 - シンポジウム「気管食道科から次世代リーダーを育成する」, 2015 (招待講演)
11. 大庭伸介: 多能性幹細胞の段階的骨芽細胞分化誘導法の開発とその応用. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 - シンポジウム 3「骨・軟骨疾患の基礎と臨床の最先端」, 2015 (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

1. 大庭伸介, 鄭雄一: 第 11 章 Hedgehog シグナル, サイトカイン・増殖因子キーワード事典(宮園浩平, 秋山徹, 宮島篤, 宮沢恵二編) 375-383, 羊土社, 東京, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tetrapod.t.u-tokyo.ac.jp/ohba-tei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大庭 伸介 (OHBA, Shinsuke)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20466733

(2) 研究分担者

鄭 雄一 (TEI, Yuichi)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：30345053

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

北條 宏徳 (HOJO, Hironori)

山川 晃 (YAMAKAWA, Akira)

ムハammad イクサン (ICHSAN, Mochammad)