

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591756  
 研究課題名 (和文) 細胞内骨格改変による骨成長と骨折仮骨成熟の制御—ケモカイン SDF-1 の関与—  
 研究課題名 (英文) SDF-1 plays a role in bone growth and repair by cytoskeleton modulation  
 研究代表者  
 伊藤 宣 (ITO HIROMU)  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：70397537

## 研究成果の概要：

マウス肋骨骨折において、軟骨細胞肥大化に伴って SDF-1 の遺伝子発現、タンパク発現が上昇し、またマウス胎仔の中足骨において、肥大化軟骨に SDF-1 の発現が上昇し、阻害薬でその成長が阻害される。また軟骨細胞に SDF-1 を加えると actin の polymerization が促進され、阻害薬はこれを抑制する。以上のことから SDF-1 は細胞内骨格の改変を通じて軟骨細胞の肥大化に役割を果たしていると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨折、成長軟骨、ケモカイン、細胞内骨格

## 1. 研究開始当初の背景

骨軟骨代謝の基礎的な研究は近年飛躍的な進歩を見せている。そしてそれに応じて新しい知見を骨軟骨疾患における治療に活かそうという研究も再生医療研究に代表されるように華々しい。しかしそれでもなお現実の骨軟骨疾患の臨床の現場では多くの課題が残されている。骨治癒にかかわる治療においては難治性骨折の治療、巨大骨欠損の治療、骨延長時の様々な問題点の解決などが挙げられる。これらの解決にはまず骨の成長帯がどのよう

にして形成され骨が成長していくのかという正常の骨成長のメカニズムの解明が必須であり、また骨折に代表される生後におこる骨の傷病における骨治癒において、いかに骨が治るのか、あるいはどのようなときに治らないのかという生物学的機構の解明が不可欠である。

さて骨治癒における仮骨の成熟および成長帯における骨の伸長は、間葉系幹細胞が軟骨細胞に分化し、軟骨細胞がいくつかの明確な分化段階を経て最終的に骨に置換されていく

過程に多くの部分を負っている。その機構の解明はbone morphogenic proteinファミリーを初めとする成長因子の研究や (reviewed by Rosen et al, Ann NY Acad Sci, 2006)、RUNX (reviewed by Komori, J Bone Miner Metab, 2003) やSOXファミリー (reviewed by Ikeda et al, J Bone Miner Metab, 2005) に代表されるtranscription factorの研究に代表されるように近年著しい発展をみせている。しかし骨治癒、成長帯伸長における軟骨細胞分化において骨が伸長する、あるいは骨折仮骨が骨折部を安定化するまで増大、成熟するためには、細胞増殖による細胞数の増加や細胞外マトリックスの産生以外に、軟骨細胞の肥大化という細胞自身の形態学的変化を伴わなければならない。これまでこの点に関して肥大化に働く因子の研究は散見されるが、それらの研究の多くは成長因子やtranscription factorがマーカー遺伝子の発現を調節するかどうかをlead outにしてのみ行われ、細胞ひとつひとつの肥大化という形態学的変化については、ここにどのような分子生物学的機構が働いているのか、これに関連付けて細胞内の骨格においてはなにがおこっているのかということはこれまでほとんど研究されていない。

近年Beierらのグループが、細胞内骨格を制御するRhoA/ROCK signalingが軟骨細胞の肥大化の遺伝子発現を制御する可能性について新しい知見を発表した(Wang et al, J Biol Chem, 2004)。また彼等は続けてこのシグナルがSox9の発現を制御することでchondrogenesisの段階でactin organizationをコントロールしている可能性について報告した(Woods et al, J Biol Chem, 2005)。また同時にRho GTPaseのメンバーであるRac1, Cdc42がRhoAとともに軟骨分化を支配している可能性についても報告した(Woods et al, J Bone Miner Res, 2005)。しかし軟骨細胞肥大化において、実際にこれらのシグナルが肥大化という形態学的現象を制御している直接的な証拠は得られていない。また更に軟骨細胞がどのようなシグナルを得てこれらを動かすのか、言い換えればこれらの上流にあたるシグナルはほとんどわかっていない。

我々はこれまで軟骨細胞の分化に働く因子の研究に従事してきた (Ito et al, BBA, 2000, Ito et al, BBA, 1999, Ito et al, BBRC, 1999)。特に軟骨分化後期に発現する新規遺伝子 LOXC のクローニングなど、軟骨細胞分化についていくつかの新知見を報告してきた (Ito et al, J Biol Chem, 2001)。一方平成 17~18 年度に科研費を得て骨移植治癒における間葉系幹細胞の遊走に関する

SDF-1 の研究を施行中であり、この過程で実際骨折仮骨において SDF-1 がどの部位に発現しているのか preliminary な組織学的実験を行ったところ、骨折仮骨成熟ないし成長帯における軟骨細胞分化においては、分泌タンパクである SDF-1 が肥大化軟骨ないし前肥大化軟骨にかなり特異的に発現している結果を得ている。これまで骨代謝研究においてはほとんど破骨細胞の遊走 (Yu et al, J Bone Miner Res, 2003) ないし hematopoietic stem cell における役割 (Kollet et al, Nat Med, 2006) のみしか解明されていない SDF-1 が、破骨細胞を導きようのないこの時点で軟骨細胞分化にどのような役割を果たしているのか、非常に興味深い。面白いことに SDF-1 は白血球などの研究で、Rho シグナルなどの細胞骨格をコントロールする因子として知られている (Vicente-Manzanares et al, J Immunol 2002)。まさに軟骨細胞が肥大化する stage で発現している SDF-1 が細胞内骨格の改変を通じてこれを制御している可能性が充分考えられる。したがって SDF-1 の発現と機能は上記細胞内骨格の変化と関連して非常に興味深い研究課題であると考えられた。

## 2. 研究の目的

今回我々は特に SDF-1 をその候補分子として、軟骨細胞が肥大化をおこすときにどのような細胞内シグナルを動かして細胞内骨格を改変し軟骨細胞の肥大化という興味深い現象をおこしていくのかということをも明らかにすることを研究目的とした。ただし臨床的な問題の解決を踏まえ、正常の骨成長帯における発現と機能だけでなく、骨折仮骨における発現と機能を同時に研究した。それにはまず骨の成長帯および骨折仮骨において SDF-1 がどの分化段階に発現しているのかを分化マーカーとの比較で確定し、その上で軟骨の成長、特に肥大化に SDF-1 がどのような働きを果たしているのかを in vivo の成長帯および骨折モデルを用いて明らかにすることとした。引き続き軟骨細胞の細胞内骨格にどのような影響を与えるかを in vitro のモデルを用いて解明し、さらにどのような細胞内シグナルを通じてこれを制御しているのかを in vitro のモデルにおいて明らかにしていった。更に SDF-1 だけでなく軟骨細胞の肥大化期に発現する様々な因子が、細胞内骨格にどのような働きを果たしているのか比較検討することで細胞内骨格改変の重要性を解明することをも視野に研究を進めることとした。

前述したように、これまでの骨軟骨代謝学の研究において、軟骨細胞の細胞内骨格の改変や変化をさまざまな成長因子や

transcription factor などとの関連で調べた研究は少ない。特に軟骨細胞の肥大化においてはそのような研究はほとんど見当たらない。しかし細胞の肥大化は細胞内骨格の変化を伴うことは自明とも考えられ、肥大化が軟骨細胞の分化に特徴的で必須の過程であることからこのことは重要な課題と考えられる。今回は細胞内骨格改変因子である Rho シグナルとの関連が深いとされる SDF-1 をターゲットとして研究を行うが、いままで軟骨細胞分化の肥大化期に発現していることが報告されているがその機能は明らかでなかったいくつかの因子、ないしこれまで肥大化軟骨に発現していて軟骨細胞分化を促進ないし抑制すると報告されている因子にも、軟骨細胞の肥大化という特殊な形態学的変化に細胞内骨格の改変を通じて寄与している可能性が充分ある。そしてこのメカニズムを解明することで、骨の成長、骨折仮骨の成熟において軟骨の肥大化をコントロールできる可能性が拓け、またそれによって難治性骨折、巨大骨欠損の修復、骨延長の期間短縮や成功率上昇などさまざまな骨軟骨疾患の治療に多大な寄与ができる新しい可能性が生まれると期待される。

### 3. 研究の方法

(1) ①5週齢のICRマウスの第8肋骨にはさみで骨折を作成する。この骨折部を含む4X4mm大の組織を経時的に採取し、この組織片を液体窒素で凍結し、homogenizerで粉々にしてRNAを抽出する。このRNAを用いてRT-PCRを行い、骨折治癒の過程で発現するSDF-1およびそのreceptorであるCXCR4のmRNA発現量を定量する。この遺伝子発現の増減を軟骨分化のマーカー遺伝子であるcol II, col Xなどと比較検討する。またこの採取した組織をパラフィン包埋し、SDF-1およびCXCR4のタンパク発現を免疫染色で組織学的に確認する。なおこのマウスの骨折治癒の実験系はすでに当教室で確立し報告済みである (Ito et al, BBRC, 1999)。また5週齢のICRマウスの脛骨近位端を脱灰後パラフィン包埋し、同様にSDF-1およびCXCR4のタンパク発現を免疫染色で組織学的に確認する。

②マウス肋骨骨折の実験系において、recombinant SDF-1 および CXCR4 阻害薬 TN14003 を、マウス背部皮下に埋没した osmotic pump を用いて持続的に投与し、骨折仮骨の成熟に与える影響を組織学的に検討する。投与は全身投与を試みるが、効果が弱いと判断した場合は、骨折部ごく近傍にチューブを設置して投与を行う。

(2) ①妊娠15.5日目のICRマウスから胎仔を採取し、この胎仔の中足骨を採取する。この中足骨を10%FBS入りDMEM培養液の中で explant culture し、経時的に採取し、パラフィン包埋して組織切片を作成する。経時的に中足骨の proliferating zone, hypertrophic zone がどのように成長していくか、その長さを測定する。またこの組織切片でSDF-1およびCXCR4の発現を免疫染色で確認し、マーカー遺伝子であるcol Xなどと比較する (Alvarez, Development, 2002)。

②マウス中足骨 explant culture の実験系において、recombinant SDF-1 および CXCR4 阻害薬 TN14003 を投与し、骨の伸長、特に肥大化軟骨部分の成長に与える影響を検討する。Recombinant SDF-1 の働きが不十分と判断される場合は、分担研究者の田代からSDF-1を発現するadenovirusの提供をうけその効果について検討する。また同時にこれらの投与において、軟骨細胞の分化にどのような影響を与えるかをRNAを抽出して遺伝子発現を調べる。

(3) 妊娠 15.5 日目の ICR マウスから胎仔を採取し、脛骨を取り出す。軟骨膜、骨膜を含む周囲組織を顕微鏡下に切除する。骨化している部分を除く軟骨部分を採取し、コラーゲン処理にて軟骨片から軟骨細胞を単離、単層培養する。これに recombinant SDF-1 および SDF-1 の受容体 CXCR4 の特異的阻害薬 4F-Benzoyl-TN14003 を加え、経時的に細胞の actin を染色し、それらの細胞内骨格の改変に対する働きを調べる (Woods, J Biol Chem, 2005)。

### 4. 研究成果

(1) ①5週齢のICRマウスの第8肋骨にはさみで骨折を作成した。この骨折部を含む4X4mm大の組織を経時的に採取し、この組織片を液体窒素で凍結し、homogenizerで粉々にしてRNAを抽出した。このRNAを用いてRT-PCRを行い、骨折治癒の過程で発現するSDF-1およびそのreceptorであるCXCR4のmRNA発現量を定量したところ、CXCR4は恒常的に発現していたのに対し、SDF-1は骨折とともに発現が上昇し、骨折後7ないし10日で発現のピークを迎えた。これを軟骨分化のマーカー遺伝子であるcol II, col Xなどと比較したところ、骨折化骨において軟骨が肥大化を起こす時期とほぼ一致して発現が上昇することがわかった。また採取した組織をパラフィン包埋し、SDF-1およびCXCR4のタンパク発現を免疫染色したところ、発現部位は前肥大化層から肥大化軟骨層であることを組織学的に確認した。

②5週齢のICRマウスの第8肋骨にはさみで

骨折を作成し、SDF-1の受容体CXCR4の特異的阻害薬4F-Benzoyl-TN14003をosmotic pumpで連続的に加えた。術後1, 2, 4週で組織を採取し、HE染色を行ったが、PBSを加えたコントロールと比べ、特に有意な差は認めなかった。X線でも検索を行ったが、両者の間に特に有意な差は認められなかった。

(2) 妊娠15.5日目のICRマウスから胎仔を採取し、この胎仔の中足骨を採取した。この中足骨培養液に、recombinant SDF-1タンパクおよびCXCR4の特異的阻害薬

4F-Benzoyl-TN14003を加えて、骨の成長がどのようになるかを調べたところ、recombinant SDF-1タンパクを加えても特に変化は認めなかったが、4F-Benzoyl-TN14003を加えたところ、軟骨の成長に抑制効果が観察された。また同様に中足骨をvon Kossa染色したところ、軟骨の骨化も、この阻害薬を加えたものでは遅延することが判明した。この軟骨の成長抑制効果が、細胞の増殖によるものかどうか調べるために、この培養液にBrdUを加えて中足骨を培養し、取り出したものを染色したところ、BrdUの取り込みには両者で有意な差は認めなかった。

(3) 妊娠15.5日目のICRマウスから胎仔を採取し、脛骨を取り出した。軟骨膜、骨膜を含む周囲組織を顕微鏡下に切除した。骨化している部分を除く軟骨部分を採取し、コラーゲン処理にて軟骨片から軟骨細胞を単離、単層培養した。これにrecombinant SDF-1およびSDF-1の受容体CXCR4の特異的阻害薬4F-Benzoyl-TN14003を加えたところ、recombinant SDF-1によって軟骨細胞内のactinはpolymerizationが促進されることがわかった。そしてこれをCXCR4の特異的阻害薬4F-Benzoyl-TN14003が阻害することがわかった。

以上のことから、SDF-1は成長軟骨、骨折治癒における軟骨細胞の肥大化において、細胞骨格を調節することで骨成長になんらかの影響を及ぼしている可能性があることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Toshiyuki Kitaori, Hiromu Ito, Edward M. Schwarz, Ryosuke Tsutsumi, Hiroyuki Yoshitomi, Shinya Oishi, Masakazu Nakano, Nobutaka Fujii, Takashi Nagasawa, Takashi Nakamura: SDF-1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair. Arthritis and

Rheumatism 60:813-823, 2009. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① Hiromu Ito, Toshiyuki Kitaori, Edward M. Schwarz, Takashi Nakamura: SDF-1/CXCR4 recruits mesenchymal stem cells in bone healing. The 6th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, October 21-24, 2007, in Honolulu, Hawaii, USA

② 北折俊之、伊藤 宣、E.M. Schwarz、中村孝志: ケモカインSDF-1は内軟骨骨化による骨修復に必要である 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月24日 京都

③ Toshiyuki Kitaori, Hiromu Ito, Edward Schwarz, Takashi Nakamura: The involvement of SDF-1/CXCR4 axis in endochondral bone repair. The 55<sup>th</sup> annual meeting of the Orthopaedic Research Society. February 25, 2009, in Las Vegas, USA

④ 伊藤 宣、北折俊之、Edward Schwarz、藤井信孝、長澤丘司、中村孝志: 間葉系幹細胞の遊走による骨治癒-SDF-1/CXCR4の役割- 第8回日本再生医療学会総会 2009年3月5日 東京

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 宣 (ITO HIROMU)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 70397537

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

渡邊 直樹 (WATANABE NAOKI)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 80303816  
田代 啓 (TASHIRO KEI)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 10263097  
中村 孝志 (NAKAMURA TAKASHI)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 10201675