

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19390473  
 研究課題名（和文） インディアンヘッジホッグシグナルによる骨芽細胞分化誘導の分子メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Understanding of molecular basis by which Indian hedgehog signaling regulates osteoblast differentiation  
 研究代表者  
 西村 理行（NISHIMURA RIKO）  
 大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
 研究者番号：60294112

研究成果の概要（和文）：インディアンヘッジホッグ（Ihh）は、骨格や様々な組織の発生、形成過程において重要な役割を果たしている。特に、Ihh が骨芽細胞や軟骨細胞の分化を制御し、骨形成に深く関与している。そこで本研究では、Ihh の作用機序を明らかにするために、Ihh 細胞内シグナルの制御機構とその役割の解明を行った。その結果、Ihh は、転写因子 Gli ファミリー分子の発現ならびに機能を制御し、骨芽細胞分化を誘導していることが明らかとなった。さらに Ihh は、骨形成因子 BMP2 および Runx2 とクロストークし、骨芽細胞分化を相乗的に促していることも示された。

研究成果の概要（英文）：Indian hedgehog (Ihh) has been shown to play important roles in development of several tissues including skeletal tissues. In particular, Ihh conducts bone formation by regulating osteoblast and chondrocyte differentiation. In this study, to understand the mechanisms of Ihh, we investigated mechanisms and roles of Ihh signaling pathway. We found that Ihh controls expression and function of transcription factors, Gli family members, thereby regulating osteoblast differentiation. Furthermore, we demonstrated that Ihh signaling collaborates with Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) signaling and Runx2, and that this cross-talk enhances osteoblast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞、未分化間葉系細胞、骨形成、インディアンヘッジホッグ、細胞内シグナリング、転写因子、PTHrP

## 1. 研究開始当初の背景

骨の構造ならびに骨量は、骨形成を担う骨芽細胞と、骨吸収を司る破骨細胞が、調和の取れたリモデリングを行うことにより制御されている。加齢、ホルモンの分泌障害、腫瘍、外傷などにより、骨形成と骨吸収のバランスに破綻が生じると、骨粗鬆症などの代謝性骨疾患が発症する。これらの代謝性骨疾患に対する効果的治療法を開発するためには、骨吸収の亢進を防止するとともに、骨芽細胞の分化ならびに機能を賦活化させ、減少した骨量を増加させる科学的な方策の確立が必要である。骨芽細胞は、未分化間葉系幹細胞を起源とし、その分化、増殖、ならびに機能は、さまざまなホルモンやサイトカインにより緻密に調節されている。これらのサイトカインの中でも、ヘッジホッグファミリーに属するインディアンヘッジホッグ (Ihh) の骨形成における役割の重要性が注目されている (Kronenberg, *Nature*, 423:332-336)。Ihh は、消化管上皮、網膜色素上皮、腎臓などの組織に加えて、軟骨組織の前肥大化層や骨芽細胞にも発現しており、骨格組織の発生および分化に深く関わっている。Ihh 遺伝子欠損マウスでは、軟骨細胞の著しい増殖および分化の抑制と、長官骨での骨芽細胞分化障害が報告されている (St-Jacques B, *Genes Dev* 13: 2072-2086)。また *in vitro* においても、Ihh が、未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化誘導することが報告されている (Nakamura T, *Biochem Biophys Res Commun* 237: 465-469)。これらの知見は、Ihh が、骨芽細胞の分化を促進し、骨形成作用を有することを強く物語っている。

Ihh を始めとするヘッジホッグは、骨代謝に深く関与するサイトカイン、BMP、TGF- $\beta$ 、Wnt などの細胞内シグナルとクロストークを有し、骨代謝ネットワークに関与していることが示唆されている。最近、Mundy らのグループは、ヘッジホッグによる骨芽細胞分化促進のメカニズムとして、ヘッジホッグが骨形成因子 BMP2 の発現ならびに分泌することを明らかにしている (Garrett R, *J Clin Invest* 111: 1771-82 ; Zhao M, *Mol Cell Biol* 26:6197-208)。このように Ihh による骨芽細胞分化促進作用の概要が明らかになりつつあるが、その全容解明には至っていない。

## 2. 研究の目的

1) Ihh のシグナル伝達においては、転写因子 Gli1, Gli2, Gli3 の Gli ファミリーが重要な役割を果たしている。そこで本研究計画では、Ihh シグナル分子 Gli ファミリーの発現なら

びに機能の制御機構の解明を試みた。

2) 骨芽細胞分化過程および骨形成過程における Ihh シグナル伝達経路の役割の解明を目指した。

3) Gli ファミリーの制御には、ユビキチン=プロテアソーム経路を介したタンパク質分解の関与が示唆されている。そこで本研究計画では、骨芽細胞分化過程におけるユビキチン=プロテアソーム経路の役割についても検討した。

## 3. 研究の方法

1) 未分化間葉系幹細胞株 C3H10T1/2、マウス胎児由来間葉系線維芽細胞 (MEF) を用いて、Ihh による Gli ファミリーの発現と、骨芽細胞への分化を経時的に解析し、両者の関連を検索する。Gli ファミリーの発現は、ウエスタンブロッティング法とリアルタイム RT-PCR にて検索した。

2) Ihh と BMP2 が、骨芽細胞分化に対して相乗効果を示す分子メカニズムを明らかにするために、Gli1, Gli2 あるいは Gli3 の過剰発現と BMP2 添加が及ぼす骨芽細胞分化への効果を検索する。また、Gli ファミリーと BMP2 シグナルとのクロスポイントを検索するために、BMP2 の下流分子として機能する Smad, Runx2, Osterix、および Msx2 との関連を、骨芽細胞分化を指標に検索する。このアプローチにより、Gli ファミリーと相互関係を有する分子との連関を解析した。

3) Ihh による骨芽細胞分化誘導効果が、Wnt の産生、分泌を介している可能性を検索するために、Ihh 添加した C3H10T1/2 細胞に、Wnt シグナルを阻害した際の Ihh による骨芽細胞分化への関与を検討した。さらに Ihh シグナルと Wnt シグナルの相互関連を検索するために、C3H10T1/2 細胞あるいはマウス初代骨芽細胞に Ihh と Wnt を作用させ、相加効果あるいは相乗効果を発揮するか否かを検討した。

## 4. 研究成果

1) C3H10T1/2 細胞に Ihh を非添加の状態でも Gli2 および Gli3 は恒常的に発現していた。一方、Ihh 非添加の状態では、Gli1 の発現は認められなかった。次に、C3H10T1/2 細胞に Ihh を添加すると、骨芽細胞への分化が誘導された。この時、Gli2 および Gli3 の発現レベルは、非添加の状態と変化は無かったが、細胞核への移行が観察された。さらに興味あることに、Ihh 添加により、Gli1 の発現が著しく誘導された。

2) Gli ファミリーの骨芽細胞分化に対する骨芽細胞分化への効果を検討した結果、Gli1 および Gli2 の過剰発現は、骨芽細胞分化を促進した。しかしながら Gli3 の過剰発現は、骨芽細胞分化を抑制した。したがって Gli ファミリーは、骨芽細胞分化に対して異なる作用を有していることが示された。

3) Ihh による Gli1 発現誘導に対する Gli2 および Gli3 の関与を検討した結果、Gli2 は Gli1 の発現を促進する一方で、Gli3 は、Gli1 の発現を阻害することを見出した。

4) BMP2 と Ihh の相互関係を検討した結果、BMP2 と Ihh は、相乗的に骨芽細胞分化を促進することが示された。そこで、その分子作用機序を検討した結果、Gli2 が、転写因子 Runx2 と物理的に結合することが確認された。この現象に一致して、Gli2 と Runx2 を C3H10T1/2 細胞に過剰発現すると、骨芽細胞分化が強力に誘導された。一方、Gli2 と、Osterix あるいは Msx2 と過剰発現しても、相乗効果、相加効果は認められなかった。Gli2 と Runx2 の相互関係をさらに検討するために、Runx2 遺伝子欠損マウス由来の未分化間葉系細胞に Gli2 あるいは Ihh を作用させても、骨芽細胞分化は、認められなかった。外的に Runx2 を導入すると、Gli2 あるいは Ihh との Runx2 の相乗効果が回復した。したがって、Ihh は、Runx2 を介することにより骨芽細胞分化誘導効果を発揮していること、Ihh と BMP2 の相乗効果には Runx2 が必須であることが明らかとなった。

5) Runx2 遺伝子欠損マウス由来の未分化間葉系幹細胞に BMP2 を作用させることに Smad シグナルを介して、Osterix の発現が誘導されるメカニズムを探索した結果、Smad シグナルにより活性化されるホメオボックス遺伝子群により、Osterix の発現がコントロールされていることを見出した。

6) Ihh による骨芽細胞分化誘導効果は、Wnt シグナルの抑制しても影響を受けなかった。また、Wnt と Ihh の相互シグナルの関連を検討したが、両者の連関は観察されなかった。

7) 内軟骨性形成過程においては、Ihh は、PTHrP の上流で機能することが示されている。その分子作用メカニズムをさらに検討した結果、Ihh が軟骨細胞の分化、特に石灰化などの後期分化を著しく促進することを見出した。この作用は、PTHrP に非依存性であった。したがって内軟骨性骨形成過程においては、Ihh は、PTHrP 依存性経路と PTHrP 非依存性経路の二つの作用を有していることが示された。さらに Ihh は、Gli シグナルを活性化し、Gli は転写因子 Sox9 ファミリーと相互関係することにより、PTHrP 産生を著明に促進することが見いだされた。さらに Sox9 ファミリーが PTHrP プロモーター領域に直接結合し、その転写活性を著しく促進すること

が明らかとなった。この PTHrP 誘導効果は、ドミナントネガティブ Sox9 の過剰発現、ヘッジホッグ阻害剤シクロパミン処理、あるいは、ドミナントネガティブ Gli2 の過剰発現により抑制された。したがって、PTHrP は、Sox9 の新たな転写ターゲットとして同定され、さらに Ihh シグナルと Sox9 のクロストークが重要な役割を担っていることが強く示唆された。

8) ユビキチン=プロテアソーム経路と Ihh シグナルの関連を検討した結果、Gli3 は、ユビキチン化機構により、切断され dominant-negative 型になり易いことが観察された。一方、Gli2 もユビキチン化による切断を受けたが、その影響は、弱かった。したがって、Gli2 と Gli3 が骨芽細胞分化に対して異なる作用を有している原因として、ユビキチン化による切断効果が関与していると推察された。さらに興味あることに、Gli1 は、ユビキチン化による切断に対して、強い抵抗性を示した。したがって Gli1 が Gli2 に比較して、さらに強い転写活性および骨芽細胞分化誘導能を有しているのは、上記に起因していると考えられた。

## 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 20 件)

1) Saito A, Hino S, Murakami T, Kondo S, Kanemoto S, Sekiya H, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Furuichi T, Ikegawa S, Ikawa M, Okabe M, Imaizumi K (2009) Regulation of ER stress response by BBF2H7/Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nature Cell Biol* 11: 1197-1204. (査読有り)

2) Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, Sekiya H, Tsumagari K, Ochiai K, Yoshinaga K, Saitoh M, Nishimura R, Yoneda T, Kou I, Furuichi T, Ikegawa I, Ikawa M, Okabe M, Wanaka A, Imaizumi K (2009) The signaling mediated by the ER stress transducer. OASIS is involved in bone formation. *Nature Cell Biol* 11: 1205-1211. (査読有り)

3) Nishimura R (2009) A Novel Role for TGF- $\beta$ 1 in Bone Remodeling. *JBMS BoneKey* 6: 434-438. (査読有り)

4) Amano K, Hata K, Suigita A, Takigawa Y, Ono K, Wakabayashi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda T (2009) Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through

- up-regulation of PTHrP. *Mol Biol Cell* 20: 4541-4551. (査読有り)
- 5) Nishimura R, Hata K, Ikeda F, Ichida F, Shimoyama A, Matsubara T, Wada W, Amano K, Yoneda T. (2008) Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. *J Bone Miner Metab* 26: 203-121. (査読有り)
- 6) Zhang J, Zhu J, Valverde P, Li L, Pageau S, Tu Q, Nishimura R, Yoneda T, Yang P, Zheng W, Ma W, Chen J. (2008) Phenotypic analysis of Dlx5 overexpression in post-natal bone. *J Dent Res* 87: 45-50 (査読有り)
- 7) Amano K, Ichida F, Sugita A, Hata K, Wada M, Takigawa Y, Nakanishi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda Y (2008) Msx2 stimulates chondrocyte maturation by controlling Ihh expression. *J Biol Chem* 283: 29513-29521 (査読有り)
- 8) Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aruratani H, Nishimura R, Yoneda T (2008) BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 283: 29119-29125 (査読有り)
- 9) Shimoyama A, Wada M, Ikeda F, Hata K, Matsubara T, Nifuji A, Noda M, Amano K, Yamaguchi A, Nishimura R, Yoneda T (2007) Ihh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function. *Mol Biol Cell* 18: 2411-2418 (査読有り)
- 10) Muramatsu S, Wakabayashi M, Ohno T, Amano K, Ooishi K, Sugahara T, Shiojiri S, Tashiro K, Suzuki Y, Nishimura R, Kuhara S, Sugano S, Yoneda T, Matsuda A (2007) Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation *J Biol Chem* 282: 32158-67 (査読有り)

[学会発表] (計 22 件)

- 1) Takigawa Y, Hata K, Muramatsu S, Amano K, Ono K, Takada K, Wakabayashi M, Matsuda A, Nishimura R, Yoneda T. (2009) A transcription factor Znf219 regulates chondrogenesis by forming a transcriptional factory complex with Sox9. 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the International Bone & Mineral Society and the Australian & New Zealand Bone & Mineral Society. Sydney
- 2) Wada M, Matsubara T, Hata K, Imamura T, Nishimura R, Yoneda T. (2007)  $\beta$ Trcp1 Ubiquitin Complex Regulates Ihh-promoted Osteoblast Differentiation Through Gli2 Ubiquitination. The 29th American

Society for Bone and Mineral Research. Honolulu

- 3) Amano K, Ichida F, Sugita A, Hata K, Kogo M, Nishimura R, Yoneda T. (2007) Msx2 Promotes Late Stages of Chondrocyte Differentiation by Up-regulating Ihh Expression. The 29th American Society for Bone and Mineral Research. Honolulu

- 4) Matsubara T, Kumiko K, Hata K, Yamaguchi A, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. (2007) Osterix Functions as Downstream of Runx2 and Msx2 During BMP2-Regulated Osteoblastogenesis. The 29th American Society for Bone and Mineral Research. Honolulu

[図書] (計 2 件)

- 1) 米田 俊之、西村 理行 「骨の分子生物学」23-37 (2009) 「口腔外科ハンドマニュアル」(総 291 ページ、クインテッセンス出版)
- 2) 西村 理行、齋藤 正寛、波多 賢二、米田 俊之. 「分子生物硬組織研究のイノベーション」2-23 (2008) 「生命歯科医学のカッティング・エッジ」(総 287 ページ、大阪大学出版会)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 理行 (NISHIMURA RIKO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：60294112

### (2) 研究分担者

米田 俊之 (YONEDA TOSHIYUKI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：80142313  
波多 賢二 (HATA KENJI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：80444496