

## 研究課題別研究評価

### 1. 研究課題名： 骨形成過程に関わる遺伝子群の解明

### 2. 研究者名： 小守 壽文

### 3. 研究の狙い：

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かかる）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、肋骨等にかかる）がある。したがって、骨形成を理解するためには、軟骨細胞・骨芽細胞の分化およびそれらの細胞からの基質産生に関わる遺伝子群を明らかにする必要がある。転写因子 Cbfa1 は、そのノックアウトマウスより骨形成、特に骨芽細胞分化に必須な因子であることを明らかにできたが、この因子の軟骨形成における働きを検討するとともに、骨形成過程で転写調節している遺伝子群を同定し、骨形成過程を分子レベルで解明することを目指した。

### 4. 研究結果及び自己評価

#### 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る。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する。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、胎生期 18.5 日の胎仔の頭蓋冠の細胞を *in vitro* で培養し、その分化能を検索した。その結果ノックアウトマウスの頭蓋冠由来間葉系細胞は、骨芽細胞分化能を完全に失っていたが、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った。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る。また、脂肪細胞に自然に分化しており、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いる。Cbfa1 が骨芽細胞分化のどの段階に重要であるかを明らかにできたが、ここからさらに進んで、骨芽細胞系列への分化決定に関わる Cbfa1 のターゲット遺伝子を同定するまでには至らなかった。さらに、間葉系の各細胞系列の分化決定において、それらに関わる転写因子がどのように相互作用しているかを明らかにすることも今後の課題である。

#### 2) Cbfa1 による軟骨細胞分化

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軟骨細胞の成熟が阻害されていることを明らかにした。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ため、軟骨細胞に分化成熟する ATDC5 細胞株及びニワトリの軟骨細胞を用い *in vitro* で検討した。Cbfa1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは ATDC5 細胞株の分化を著明に抑制し、Cbfa1 をニワトリの軟骨細胞にレトロウイルスを用いて強制発現させると軟骨細胞の成熟を強力に誘導、またドミナントネガティブ型（DN）Cbfa1 を強制発現させると軟骨細胞分化を完全に抑制した。したがって、Cbfa1 が軟骨細胞分化に重要な因子であることが *in vitro* で明らかにできた。さらに生体内でも 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）を作製した。同時に Cbfa1 の機能を抑制するために、DN Cbfa1 Tg も作製した。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 Cbfa1 Tg では、軟骨細胞の成熟及び内軟骨性骨化が抑制された。したがって、Cbfa1 は骨芽細胞分化因子であるとともに軟

骨細胞の分化因子であることを証明することができた。さらに Cbfa1 は成長軟骨と永久軟骨の性格を決定づける上でも重要な働きをしていることを明らかにした。すなわち、Cbfa1 の過剰発現は本来永久軟骨になるべき軟骨をも成長軟骨化し、DN Cbfa1 で正常の Cbfa1 の機能を阻害すると、本来の成長軟骨でも永久軟骨の形質を保持した。しかし、軟骨細胞分化に関わる Cbfa1 の直接のターゲット遺伝子を同定するには至らず、今後の課題である。

### 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たが、そこでも軟骨への血管侵入が全く見られなかった。そして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、コラゲナーゼ3の発現を認めなかった。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あることをルシフェラーゼアッセイを用いた *in vitro* の実験でも明らかにした。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る。Cbfa1 はそのターゲット遺伝子の転写調節において多くの他の因子(TGF- $\beta$ 、PDGF、IL1- $\beta$ )との相乗効果が見られた。今後 Cbfa1 と相互作用し協調的に働く転写因子も同定していきたい。

## 5. 領域総括の見解:

転写因子遺伝子 Cbfa1 をノックアウトしたマウスが骨形成をしないことを発見し、Cbfa1 が骨芽細胞の初期分化に機能していることを示した研究は、生物学、医学上大変有意義である。さらに、Cbfa1 が軟骨分化因子であることを明らかにした。Cbfa1 が直接制御する遺伝子の同定が期待される。

## 6. 主な論文等:

- ・T. Komori. A fundamental transcription factor for bone and cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 : 813-6, 2000.
- ・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.
- ・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.
- ・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.