



Title	Hedgehog蛋白による軟骨分化制御
Author(s)	中村, 卓史
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40816">https://hdl.handle.net/11094/40816</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 <sup>なか</sup>中 <sup>むら</sup>村 <sup>たか</sup>卓 <sup>し</sup>史

博士の専攻分野の名称 博 士 (歯 学)

学 位 記 番 号 第 13781 号

学 位 授 与 年 月 日 平成10年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

歯学研究科歯学臨床専攻

学 位 論 文 名 「Hedgehog 蛋白による軟骨分化制御」

論 文 審 査 委 員 (主査)  
教 授 松矢 篤三

(副査)  
教 授 栗栖浩二郎 助教授 開 祐司 講 師 井上 博之

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【研究目的】

ヘッジホッグ (hedgehog : hh) はショウジョウバエのセグメントポラリティ遺伝子として単離された。その後脊椎動物の相同遺伝子として Sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh), Desert hedgehog の3種類のヘッジホッグがクローニングされた。これらのヘッジホッグは形態形成制御に重要な役割を担っていると考えられている。そのうち Shh は脊椎動物における中枢神経系の初期発生及び骨格パターン形成、肺、毛根、皮膚、歯牙など様々な器官形成に関与すると報告されている。肢芽において Shh は極性化域から分泌され、隣接周囲組織に誘導した骨形成因子 (BMP) や線維芽細胞増殖因子 (FGF) を介して前後軸的な骨格パターン形成に重要な役割を果たすと考えられている。最近 Shh ノックアウトマウスが重篤な骨格形成障害をきたすことが報告され、また著者らはヘッジホッグ蛋白が骨芽細胞前駆細胞及び骨芽細胞の分化を促進することを報告した。これらの知見はヘッジホッグが骨格形成に関与することを強く示唆している。そこで本研究ではヘッジホッグ蛋白が骨格形成の第一段階である軟骨初期分化及び軟骨細胞分化に及ぼす作用を検討した。

### 【研究方法】

#### 1) ヘッジホッグ蛋白の作製

Shh の活性ドメインであるニワトリ Shh N-末端 cDNA 及びマウス Ihh の全長 cDNA をレトロウイルスベクター RCAS (A) に組み込み (以下各々 RCAS/Shh-N, RCAS/Ihh), ウイルスベクターをニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) に導入した。それぞれのウイルスベクターを導入した CEF の培養上清を回収し (以下各々 Shh-N CM, Ihh CM) クルードな Shh-N 蛋白, Ihh 蛋白として実験に用いた。実験の対照には RCAS ウイルスベクターのみを感染させた CEF の培養上清を用いた。

リコンビナント Shh-N 蛋白 (rShh-N) は大腸菌発現系を用いて作製した。すなわち、マウス Shh-N 末端 cDNA を大腸菌発現ベクター pQE30 に組み込み、大腸菌に導入した。合成されたヒスチジン癒合蛋白をニッケルキレートリングカラムを用いて精製した。

#### 2) 軟骨初期分化過程の検討

軟骨初期分化の検討には軟骨分化能を有するラット未分化間葉細胞株 RMD-1 細胞およびマウス胚性腫瘍由来 ATDC5 細胞を用いた。RMD-1 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で、ATDC5 細胞を  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で I 型

コラーゲンコートプレート上に播種した。播種24時間後からヘッジホッグ蛋白を添加し、BMP-2の存在下あるいは非存在下で培養した。軟骨細胞への分化は軟骨細胞基質である硫酸ムコ多糖を染色するアルシアンブルー染色、グリコサミノグリカン (GAG) 合成および細胞形態を指標に検討した。

### 3) ヘッジホッグ受容体、ヘッジホッグ応答遺伝子及びBmpsの発現

10  $\mu$ g/mlのrShh-Nで処理したRMD-1細胞からtotal RNAを抽出しヘッジホッグ受容体複合体であるpatched, ヘッジホッグシグナル伝達に必要なsmoothed, gli, そしてBmp-2, -4, -5, -6, -7の遺伝子発現をRT-PCR法で検討した。

### 4) 軟骨細胞の細胞分化に及ぼすヘッジホッグの影響

軟骨に分化したRMD-1細胞をrShh-NおよびShh-N CMで処理し3日後にII型コラーゲン合成を分析した。ニワトリ胚胸骨より分離した軟骨細胞にRCAS/Shh-Nウイルスベクターを感染させ、7日後の分化マーカー発現をノーザンブロット解析した。

### 5) ヘッジホッグによる異所性軟骨内骨化の誘導

ヘッジホッグ産生CEFをヌードマウス背部筋膜下に移植し2週間後に摘出し組織学的に検討した。

## 【結果】

1) RMD-1細胞はヘッジホッグ受容体であるpatchedを発現しヘッジホッグのシグナル伝達に必要なsmoothed, gliを発現していた。Shh-N CMあるいはrShh-Nで処理するとShh応答遺伝子であるpatched, gli遺伝子の発現が増強された。

2) RMD-1細胞はアルシアンブルー陰性で線維芽細胞様の形態を呈し、100ng/mlのBMP-2で処理することによりアルシアンブルー陽性の軟骨細胞に分化した。1  $\mu$ g/mlのrShh-Nで処理した細胞は多角形の細胞形態を呈しアルシアンブルー弱陽性で軟骨細胞への分化が示唆された。さらにBMP-2, rShh-Nで同時処理するとすべての細胞が類円形の細胞形態を呈しアルシアンブルー強陽性の軟骨細胞に分化した。100ng/mlから1  $\mu$ g/mlのrShh-Nは濃度依存性に細胞のGAG合成を増大させた。Shhは低濃度のBMP-2存在下で、BMP-2は低濃度のShh存在下でRMD-1細胞のGAG合成を著明に促進しShhとBMP-2の相互作用は過剰量のBMP-2の作用より強力であった。rShh-NはATDC5細胞の軟骨分化も促進し、その分化はBMP-2存在下で著明に促進された。Ihh CMもまたRMD-1細胞のGAG合成を促進し、BMP-2存在下でGAG合成、アルシアンブルー染色性を著明に促進した。

3) RMD-1細胞はBmp-2, Bmp-4遺伝子を発現していたが、rShh-N処理後もその発現レベルは一定であった。Bmp-5, 6, 7発現はrShh処理後48時間で検出されなかった。

4) rShh-NによるRMD-1細胞のGAG合成促進作用は可溶性BMP I型受容体で抑制されなかった。

5) 軟骨に分化したRMD-1細胞はII型コラーゲンを合成していたが、Shh処理後も合成量に変化はなかった。また、ニワトリ胸骨から分離した初代軟骨細胞にRCAS/Shh-Nウイルスベクターを感染させてもアグリカン, II型コラーゲン, X型コラーゲンの遺伝子発現及び細胞形態に影響を及ぼさなかった。

6) Shh産生CEFを移植した近傍に軟骨組織および骨組織が形成され、異所性の軟骨内骨化が観察された。

## 【結語】

本研究はヘッジホッグの骨格形成への関与に着目し、ヘッジホッグの軟骨分化への作用をin vitroで検討したものである。その結果、軟骨前駆細胞であるRMD-1細胞およびATDC5細胞がヘッジホッグ蛋白に応答し軟骨細胞に分化し、その軟骨分化はBMP-2の存在下で著明に促進されることを明らかとした。本研究結果から骨格形成期に発現するヘッジホッグが直接、間充細胞の軟骨分化を促進し、さらにBMPとの相互作用で軟骨形成を著明に促進することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は形態形成を制御する因子の一つであるヘッジホッグ蛋白が骨格形成に重要な役割を演じている事に着目し、

軟骨分化過程でのヘッジホッグの作用および骨形成因子（BMP）との相互作用について検討したものである。その結果、軟骨前駆細胞にヘッジホッグ受容体複合体が存在し、ヘッジホッグが直接軟骨前駆細胞の軟骨初期分化を促進することを示した。さらにヘッジホッグはBMP 2の共存下で軟骨分化を著明に促進することを明らかにした。これらの結果から、生体での骨格形成期にヘッジホッグは直接あるいはBMPとの相互作用で軟骨初期分化を制御することが示唆された。

本研究は生体でのヘッジホッグの作用を解明する上で重要な知見を与えるものであり、価値ある業績と認められる。従って、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。