

## 【骨・軟骨形成の分子基盤と再生医療】

The molecular basis of bone and cartilage formation and regenerative medicine

菅家 康介<sup>1,2)</sup>・大庭 伸介<sup>1)</sup>・鄭 雄一<sup>1,3)</sup>

Kosuke Kanke

Shinsuke Ohba

Ung-il Chung/Yuichi Tei

## Key words

骨芽細胞, 軟骨細胞,  
軟骨内骨化, 再生医療

## 要 約

哺乳類の骨格は結合織内骨化と軟骨内骨化の2つの骨化様式を介して形成される。軟骨内骨化では、軟骨が最初に形成され、それが骨に置き換わっていく。このとき軟骨形成と骨形成は、様々なシグナルを介して、時間的・空間的に密接に相互作用しながら進んでいく。遺伝子改変マウスを中心とした最近の研究により明らかとなった骨及び軟骨の形成における分子メカニズムを概説するとともに、細胞・足場・シグナルの三要素の概要に触れ、再生医療の基礎的知見を紹介する。

## はじめに

骨格形成には結合織内骨化（膜性骨化）と軟骨内骨化（内軟骨性骨化）の2つの様式がある。結合織内骨化は頭蓋の扁平骨（前頭骨や頭頂骨）、上顎骨、下顎骨、鎖骨の一部に見られ、凝集した間葉系細胞が直接骨芽細胞に分化する。一方、軟骨内骨化は脊椎や長管骨など骨格の大部分で見られ、軟骨が最初に形成され、それが骨に置き換わっていく。本稿では、軟骨内骨化に焦点を絞り、長管骨における骨の発生において機能するシグナルや転写因子の分子制御機構を概説する。

不可逆性組織欠損に対して、再建外科医療と移植医療が従来から行われてきた。しかしながら、人工

臓器は耐久性と機能に制限を有し、臓器・組織移植はドナー不足と免疫抑制に課題を残すため、新たな治療法として、組織工学の手法を利用した再生医療が脚光を浴びている。本稿では、骨、軟骨再生療法の各論を次稿以降に譲るとして、1993年に Vacanti らが報告した再生医療に重要な3要素である「細胞源・足場・シグナル」について概説し、最後に今後の再生医療の展望と課題について考察する。

## 1. 軟骨内骨化 (図1)

軟骨内骨化では、まず未分化な間葉系細胞が将来の骨格形成部位に凝集する。中心部の細胞は軟骨細胞に分化して、II型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨基質を形成し、辺縁の細胞は軟骨膜を形成する。軟骨組織は、軟骨細胞の増殖・基質産生を伴い成長した後、中央部で肥大化し、X型コラーゲンを特徴とする細胞外基質を産生する。肥大軟骨細胞はさらに成熟して、周囲を石灰化させるとともに、血管誘導因子 VEGF などを産生し血管侵入を促した後、アポトーシスにより死滅する。残存する石灰化軟骨基質の内部には破軟骨細胞が血管と共に侵入し軟骨基質を分解する。

一方、軟骨膜には骨芽細胞と軟骨細胞に分化能を有する骨・軟骨前駆細胞が存在することが知られている<sup>1)</sup>。石灰化軟骨組織に隣接する軟骨膜細胞は、転写因子 Runt-related transcription factor 2 (Runx2) 陽性の

1) 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター臨床医工学部門 2) 東京大学大学院医学系研究科感覚運動機能医学講座口腔外科学 3) 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻  
Division of Clinical Biotechnology, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, The University of Tokyo Graduate School of Medicine<sup>1)</sup>, Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Sensory and Motor System Medicine, The University of Tokyo Graduate School of Medicine<sup>2)</sup>, Department of Bioengineering, The University of Tokyo Graduate School of Engineering<sup>3)</sup>  
〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 TEL: 03-5841-1427<sup>1)</sup>

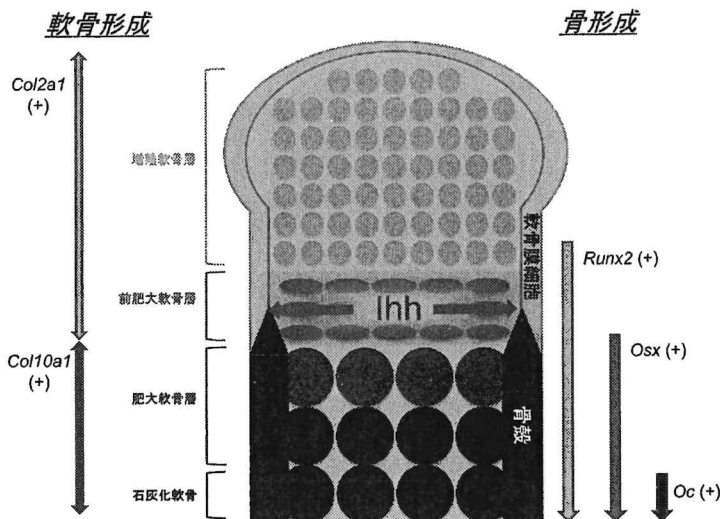


図1 軟骨内骨化における軟骨形成と骨形成のカップリング

軟骨内骨化では、骨端部から骨幹部に向かって軟骨形成と骨形成が共役して進んでいくように見える。軟骨細胞は増殖層、前肥大層、肥大層および石灰化層に分かれ、層状に配列している。軟骨膜の細胞が Runx2 陽性の骨芽細胞前駆細胞、Osterix (Osx) 陽性の骨芽細胞前駆細胞を経て骨芽細胞へと分化し、基質を産生して骨殻を形成する。さらに骨芽細胞は成熟し、Osteocalcin (Oc) 陽性の細胞へと分化する。軟骨内骨化において、Ihh は前肥大および肥大軟骨細胞層に特異的に発現しており、軟骨形成と骨形成をつなげる重要な因子であると考えられている。

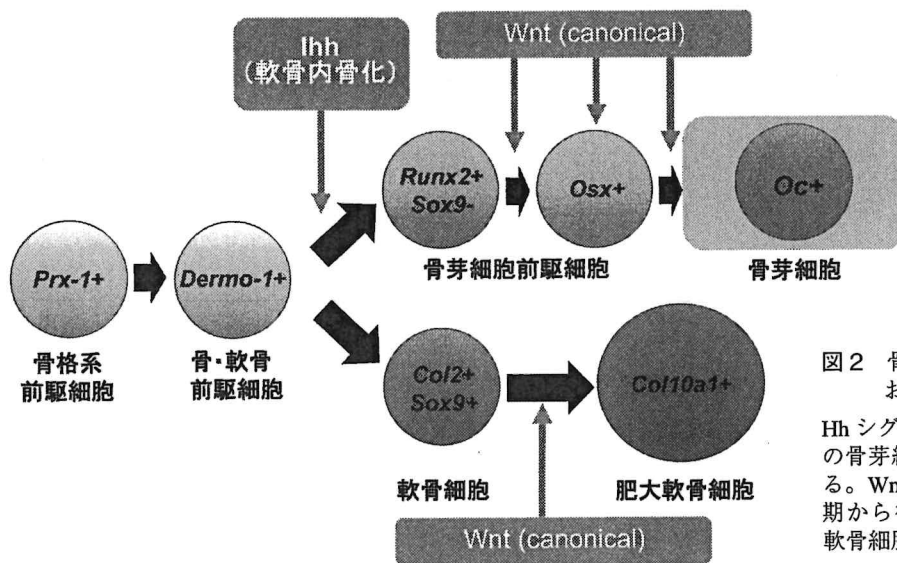


図2 骨芽細胞・軟骨細胞分化における各種シグナルの役割

Hh シグナルは、骨・軟骨前駆細胞の骨芽細胞への分化決定に関与する。Wnt シグナルは骨芽細胞の中期から後期の分化誘導と増殖と、軟骨細胞の肥大化に関与する。

骨芽細胞前駆細胞へと分化した後、転写因子 Osterix (Osx) 陽性の骨芽細胞前駆細胞に分化する。その後、骨芽細胞へと分化し、骨基質を産生しながら骨殻（将来の皮質骨）を形成する。成熟骨芽細胞は骨基質蛋白である Osteocalcin (Oc) を産生する。軟骨膜に存在する骨芽細胞前駆細胞および骨殻に存在する骨芽細胞は、石灰化軟骨組織に血管と共に侵入し、破軟骨細胞による石灰化軟骨基質分解と共役しながら骨基質を産生して一次海綿骨を形成し、後に骨梁と骨髓を形成する<sup>2)</sup>。

の分化制御に関わる代表的な転写因子及びシグナルに関して概説する。

### 骨芽細胞分化・軟骨細胞分化を制御する転写因子 Sox9

HMG 型転写因子 Sox9 は間葉凝集と軟骨分化に必須であるとされている<sup>3)</sup>。四肢特異的 Sox9 欠損マウスの四肢では、軟骨及び骨が欠損し、軟骨細胞特異的 Sox9 欠損マウスでは、肥大軟骨細胞を軟骨細胞の中心部に認めるものの、軟骨細胞マーカー Col2a1 が消失する。

## 2. 骨芽細胞分化・軟骨細胞分化の分子メカニズム (図2)

### Runx2

本章では軟骨内骨化における骨芽細胞及び軟骨細胞

Runx2 はシヨウジョウバエの体節形成遺伝子のなかのペアルール遺伝子の一つ runt にホモロジーをもつ Runx ファミリーに属する転写因子である。

Runx2 欠損マウスでは、結合織内骨化及び軟骨内骨化からなる骨形成が完全に欠損すると同時に軟骨の肥大化が障害される。すなわち、Runx2 は骨芽細胞分化に必須であるだけでなく、軟骨の肥大化にも関与する<sup>9)</sup>。

#### Osterix (Sp7)

Osterix (Osx) は Sp ファミリーに属する転写因子である。Osx 欠損マウスでは、全身において骨形成が全く起こらない。Runx2 欠損マウスでは、Osx の発現が消失し、Osx 欠損マウスでは、Runx2 の発現が保持されているから、Osx は遺伝学的に Runx2 の下流に位置し、骨芽細胞分化に必須であると考えられる<sup>9)</sup>。

#### 骨芽細胞分化・軟骨細胞分化を制御するシグナル

##### Ihh signaling

Ihh は前肥大軟骨細胞層に主に発現しており、周関節部軟骨細胞で発現する副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) とネガティブフィードバックループを形成して、長管骨の長さを厳密に制御していると考えられている<sup>6)</sup>。また、Ihh 欠損マウスでは骨殻形成が全く認められず、Runx2 陽性の前骨芽細胞が消失することから、Ihh 前骨芽細胞への初期分化に必須であると考えられる<sup>7)</sup>。

##### Canonical Wnt signaling

Wnt シグナルは  $\beta$ -catenin 依存性の canonical および非依存性 non-canonical 経路を介して生物学的作用を発揮する。骨・軟骨前駆細胞特異的  $\beta$ -catenin 欠損マウスでは正常な骨殻が喪失し、軟骨膜において Runx2 の発現を認めるが Osx の発現が消失する<sup>9)</sup>。一方、Osx1-GFP: cre マウスを用いた Osx 陽性細胞特異的  $\beta$ -catenin 欠損マウスでは Osx 陽性の骨芽細胞前駆細胞を認めるが、Oc 陽性の成熟骨芽細胞が消失する<sup>9)</sup>。 $\beta$ -catenin 欠損マウスにおけるこれら一連の結果は、canonical Wnt シグナルが骨芽細胞初期 (Runx2 陽性細胞から Osx 陽性細胞へ) および後期 (Osx 陽性細胞から Oc 陽性細胞へ) の両方で分化を促進させることを示唆している。また、軟骨細胞においては、肥大分化を正に制御している<sup>10)</sup>。

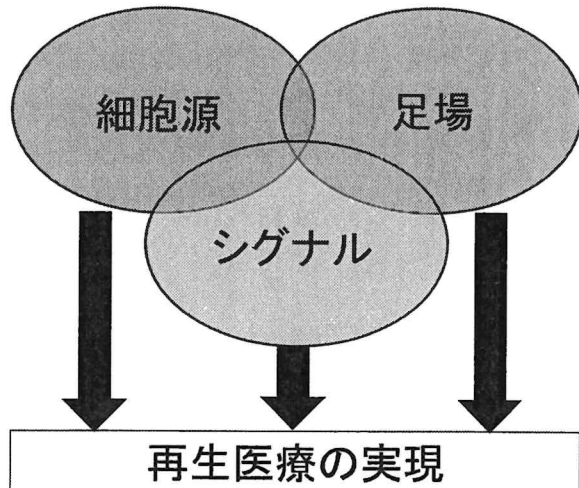


図3 再生医療の3要素

組織や臓器をつくるための細胞源、細胞やシグナル因子の足場 (担体)、細胞の挙動を制御するシグナル因子 (生理活性因子) の3要素が再生医療の実現に必須である。

### 3. 再生医療にむけて (図3)

1993年に Langer らによって、再生医療の実現には細胞源・足場・シグナルの三要素を組み合わせることが必須であることが提案されて以来、各分野において様々な研究がなされてきた<sup>11)</sup>。ここではこの三要素を概説し、最後に今後の展望に関して考察する。

#### 細胞源

現在、幹細胞が再生医療における細胞源として広く研究されている。幹細胞は自己複製能と多分化能という二つの大きな特徴を持つ<sup>12)</sup>。成人に由来する幹細胞の代表的なものに造血幹細胞 (HSC)、間葉系幹細胞 (MSC) が広く知られている。ともに組織再生の可能性を有することに加え、癌化などの心配が少なく臨床応用に有効と考えられているが、得られる細胞数も少なく、分化能に限られるという短所も有する。そこで注目されたのが胚性幹細胞 (ES 細胞)、誘導性多能性幹細胞 (iPS 細胞) である。ともに生体外にて、多能性を保ちつつ、ほぼ無限に増殖させる事ができ、体性幹細胞における問題点を一部克服すると期待を集めている。ES 細胞とは初期胚の胚盤胞に存在する内部細胞塊に由来する。パーキンソン病などの神経変性疾患、脊髄損傷、脳梗塞、糖尿病、肝硬変、心筋症など

根治できなかった疾患治療に応用できる可能性を秘めているが、受精卵を破壊するという倫理的問題も存在する。iPS細胞とは体細胞へ数種類の遺伝子を導入することにより、ES細胞に匹敵する多能性と自己複製能を持たせた細胞のことであり、生命倫理と免疫拒絶の問題を解決するものとして期待されている。iPS細胞の課題は癌化が引き起こされる可能性を有することである。現在、がん化の可能性を抑えた作成法が盛んに研究されている<sup>13)</sup>。

### 足場

細胞を移植もしくは播種をする際、細胞と接着し、組織構造を保持する細胞外マトリクスの構造を模倣した足場材料が必須となる。足場の役割は、細胞接着及び細胞の移動を助けること、Drug Delivery System (DDS)の機能を持たせ、シグナル因子(bioactive factors)の送達を行うこと、細胞の挙動を修飾する機械的かつ生物学的効果を与えることなどである。足場材料は一般的にPLA・PLGAに代表される人工材料とコラーゲンやフィブリンに代表される天然材料に分けられる。現在、人工材料と生体の相互作用も注目を集め盛んに研究されている<sup>14)</sup>。

### シグナル

シグナルは生理活性因子(bioactive factors)と広義で解釈され、成長因子、レセプターやキナーゼ、転写因子、生体分子の構造や活性を模倣した天然もしくは合成化合物を含む。それぞれの器官発生の過程においてこれらbioactive factorsの寄与は異なり、これまでにそれぞれの器官で必須な因子が報告されているが、多くの場合、器官発生のメカニズムは明らかになっていない。本稿における骨・軟骨の発生メカニズムも例外ではなく、bioactive factorが器官発生にどのように寄与しているかの理解が急がれる分野である。

### おわりに

骨・軟骨の発生は、複雑な分子ネットワークを介している。分析方法の進歩によりそのメカニズムに関して多くのことが見出されてきたが、その複雑な相互作用に関しては未だ不明な点が多い。また、足場やシグ

ナルに関する基礎的知見をどう再生医療に応用するかという点に加え、ES細胞やiPS細胞などの臨床応用においては、我々が乗り越えなくてはならない壁は数多く存在する。再生医療の使命は、失われた組織を再び取り戻すことで、従来の医療の限界を克服することであり、複数の学際領域が融合しながら研究を進める必要がある。

### 文 献

- 1) Maes C, *et al.*: Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* (2010) 19: 329-344
- 2) Colnot C, *et al.*: Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev Biol* (2004) 269: 55-69
- 3) Akiyama H, *et al.*: The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* (2002) 16: 2813-28
- 4) Komori T, *et al.*: Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* (1997) 89:755-764
- 5) Nakashima K, *et al.*: The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* (2002) 108:17-29
- 6) Kronenberg HM: Developmental regulation of the growth plate. *Nature* (2003) 423: 332-336
- 7) St-Jacques B, *et al.*: Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* (1999) 13: 2072-2086
- 8) Day, T. F, *et al.*: Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*, (2005) 8: 739-750
- 9) Rodda, S. J, *et al.*: Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development*, (2006) 133:3231-3244
- 10) Karsenty G, *et al.*: Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* (2009) 25: 629-48.
- 11) Langer R, *et al.*: Tissue engineering. *Science* (1993) 260:920-926
- 12) V. Ramakrishna, *et al.*: Stem Cells and Regenerative Medicine – A Review. *Annual Review & Research in Biology* (2011) 1: 79-110,
- 13) Barrilleaux B, *et al.*: Inducing iPSCs to escape the dish. *Cell Stem Cell.* (2011): 103-11.
- 14) Renth AN, *et al.*: Leveraging "raw materials" as building blocks and bioactive signals in regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* (2012) 18: 341-62.