

【軟骨細胞の分化制御機構と軟骨再生】

Regulation of chondrocyte differentiation and cartilage regeneration

妻木 範行

Noriyuki Tsumaki

Key words

内軟骨性骨化, 細胞リプログラミング,
軟骨細胞肥大化, SIK3

要 約

軟骨は成長軟骨と関節軟骨を構成し、体の成長と滑らかな関節運動を担う。軟骨細胞は発生過程において中胚葉の未分化間葉系細胞に由来し、幾つかのステップからなる分化過程をたどる。PTHrP-HDAC4-MEF2C経路はそのステップの一つである軟骨細胞の肥大化を制御する。最近、SIK3がHDAC4の細胞局在を制御して軟骨細胞肥大化を促進することが判明した。また一方で、細胞リプログラミング技術の進展により細胞のタイプを変換して、皮膚線維芽細胞から軟骨細胞を誘導することが可能になりつつある。これには、線維芽細胞から一旦iPS細胞を作り、軟骨細胞へと分化させる方法と、線維芽細胞を軟骨細胞へ直接変換する方法の2つのアプローチがある。誘導した細胞は、細胞分化を制御して維持する必要がある。軟骨細胞分化制御の知見と細胞の分化誘導技術の開発は、軟骨疾患の再生医療研究に役立つと考える。

はじめに

軟骨は胎児期においては骨格の原基として体を支え、生後は成長軟骨と関節軟骨として体の成長と滑らかな関節運動を担う。発生過程において軟骨細胞は中胚葉の間葉系細胞に由来し、多くのステップからなる分化過程をたどる。軟骨細胞の分化過程を制御する因子の研究が進み、分子レベルでの細胞分化制御機構が明らかになってきた。その一方で、iPS細胞に代表さ

れる細胞リプログラミング技術の進展により、細胞のタイプを変換することが可能になりつつある。これらの知見と技術は再生医療の進歩に貢献するだろう。本稿では軟骨細胞分化とその代表的な制御機構を説明し、細胞リプログラミング技術を用いた軟骨再生について概説する。

1. 内軟骨性骨化と軟骨細胞分化

頭蓋や鎖骨の一部を除き、体のほとんどの骨は内軟骨性骨化と呼ばれる過程を経て形成される。内軟骨性骨化の過程は間葉系細胞の凝集に始まる¹⁾(図1)。凝集した間葉系細胞は円形の軟骨細胞になり、増殖しながらII型コラーゲンとプロテオグリカンからなる軟骨細胞外基質を産生・構築して軟骨原基を形成する。軟骨原基の中心部に存在する軟骨細胞は分裂を止め、大きくなる(肥大化)。肥大軟骨細胞は基質産生をX型コラーゲンに変え、基質を石灰化し、血管の進入を誘導する。血管進入とともに骨芽細胞が進入し、軟骨原基の中心部に一次骨化中心と呼ばれる骨が形成される。血球系の細胞系譜である破骨細胞も軟骨原基内に進入し、肥大軟骨細胞層の基質を分解する。軟骨と一次骨化中心の境界の肥大軟骨細胞はアポトーシスに陥り、死ぬと考えられている。その一方で肥大軟骨細胞が骨芽細胞に分化転換する可能性も指摘されており²⁾、軟骨細胞の運命については議論の余地がある。

軟骨原基両端に存在する丸い軟骨細胞のうち、肥

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 増殖分化機構研究部門 細胞誘導制御学分野
Cell Induction and Regulation Field Dept. of Cell Growth and Differentiation Center for iPS Cell Research and Application Kyoto University 〒 606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53 TEL: 075-366-7045

内軟骨性骨化の各ステップ

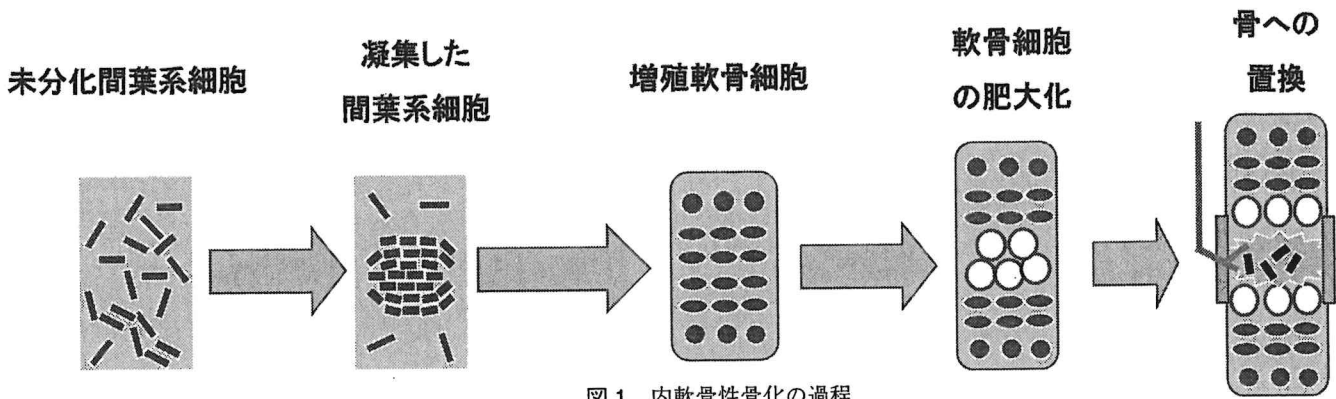


図1 内軟骨性骨化の過程

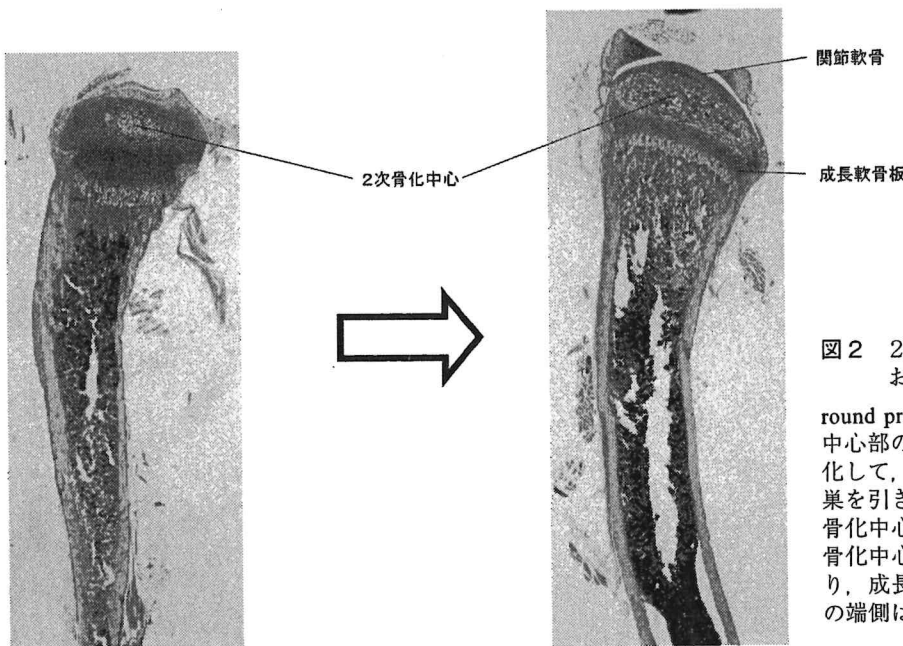


図2 二次骨化中心と成長軟骨板
および関節軟骨の形成 (マウス)

round proliferative chondrocyte zone の中心部の軟骨細胞も分裂を止め、肥大化して、血管進入とともに新たな骨化巣を引き入れる。この部分の骨を二次骨化中心と呼ぶ。一次骨化中心と二次骨化中心の間に挟まれる形で軟骨が残る、成長軟骨板になる。二次骨化中心の端側は関節軟骨になる。

大軟骨細胞に近い層の細胞は扁平化し、増殖を続けて柱上に配列する構造がはっきりしてくる。この結果、軟骨原基はその両端から中心に向かい、round proliferative chondrocyte zone (円形増殖軟骨細胞層)、columnar flat proliferative chondrocyte zone (柱上扁平増殖軟骨細胞層)、hypertrophic zone (肥大軟骨細胞層)、一次骨化中心で構成される。やがてround proliferative chondrocyte zoneの中心部の軟骨細胞も分裂を止め、肥大化して、血管進入とともに新たな骨化巣を引き入れる。この部分の骨を二次骨化中心と呼ぶ。一次骨化中心と二次骨化中心の間に挟まれる形で軟骨が残る、成長軟骨板になる(図2)。成長軟骨は組織学的に細胞の形態から、3つの層に分けられる。骨格コンポーネントの端から中心の方向に

順に、静止軟骨細胞層、増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層である。マウスにBrdUラベリングを行うと、増殖軟骨細胞のみに取り込みが見られ、静止軟骨細胞と肥大軟骨細胞には取り込みが見られない。よって増殖軟骨細胞は活発に分裂するが、静止軟骨細胞と肥大軟骨細胞はほとんど分裂しないと理解される。成長軟骨板はヒトでは成長が終了する10歳代後半に閉鎖して消失する。

二次骨化中心の両端側の軟骨は関節軟骨になる。相対する骨の端の関節軟骨が関節を形成する(図2)。関節軟骨は一生を通じて存在し、滑らかな関節運動を担う。マウスにBrdUラベリングを行うと、関節軟骨細胞には取り込みが認められず、殆ど増殖しない。

2. 軟骨細胞肥大化の制御

軟骨細胞分化は、Fibroblast Growth Factor (FGF), Bone Morphogenetic Protein (BMP), Indian hedgehog (Ihh), C-type Natriuretic Protein (CNP), Insulin-like Growth Factor (IGF), Wnt, そして核内レセプターの種々のリガンド (レチノイン酸, グルココルチコイド, 甲状腺ホルモン, エストロゲン, アンドロゲン), Parathyroid Hormone related Peptide (PTHrP) などによって調節されている。軟骨細胞分化の各ステップの中で、増殖軟骨細胞が肥大軟骨細胞に分化する軟骨細胞肥大化のステップは、細胞分裂の停止、発現するマトリックス遺伝子の交代 (Ⅱ型コラーゲンからⅩ型コ

ラーゲンへ), 細胞の形態変化 (肥大化) という劇的な変化が細胞に起こる。このステップは上述の因子の制御をうけるが, 中でも PTHrP による制御が重要で, 細胞内作用機序の研究がなされている。

PTHrP はもともと悪性腫瘍が分泌し血中に入って全身に回ると高カルシウム血症を引き起こすペプチドとして発見された。PTHrP は全身の多様な組織で発現するが, この遺伝子を欠失させたマウスは内軟骨性骨化の異常により死亡することから, 軟骨細胞分化における重要性が知られるようになった。軟骨原基では PTHrP は軟骨周膜と軟骨原基端にある軟骨細胞が分泌し, 軟骨原基内を拡散する。PTHrP は軟骨細胞に存在する PTHrP 受容体に結合し, 軟骨細胞に増殖を続けさせ, 前肥大軟骨細胞や肥大軟骨細胞への分化を抑制する。PTHrP 受容体の発現は増殖軟骨細胞で認められるが, 増殖を止めたところの細胞で最も強い。

PTHrP による軟骨細胞肥大化抑制シグナルを軟骨細胞内で伝達する機序として, HDAC4-MEF2C 経路が考えられている (図 3)。HDAC4 のノックアウトマウスでは軟骨細胞の肥大化が促進する³⁾。MEF2C のノックアウトマウスでは軟骨細胞肥大化が抑制される⁴⁾。MEF2C は転写因子で, X 型コ

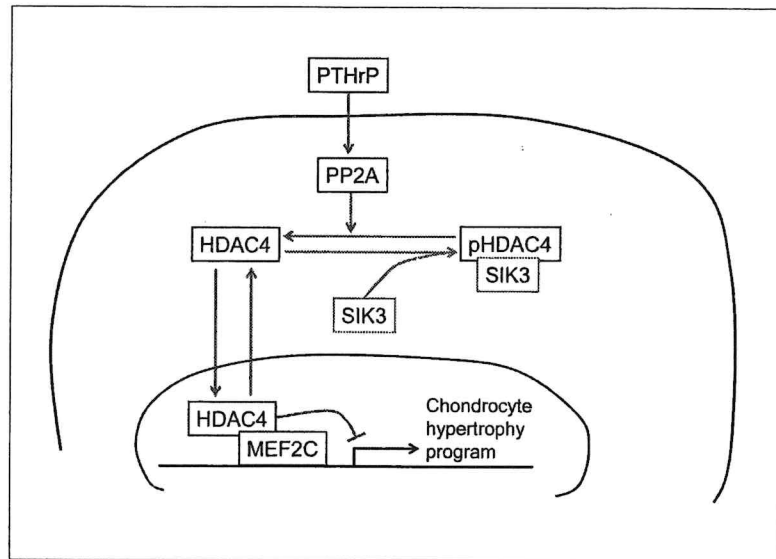


図 3 PTHrP-HDAC4-MEF2C による, 軟骨細胞肥大化の制御機構。PP2A は PTHrP シグナルを受けて, HDAC4 を脱リン酸化し核内へと移行させる。SIK3 は HDAC4 を細胞質に留め置き, 核内の HDAC4 を減らす。PP2A と SIK3 の作用のバランスにより, 軟骨細胞の肥大化が制御されていると考えられる。

ラーゲン遺伝子の発現を上げ, 軟骨細胞を肥大化させる。HDAC4 は脱リン酸化されると核内に移行し, 転写因子である MEF2C に作用してその活性を抑制することで, 軟骨細胞の肥大化を抑制する。HDAC4 を脱リン酸化するのは PP2A で, PTHrP シグナルは PKA を介して PP2A の脱リン酸化作用を増強する⁵⁾。即ち, HDAC4 のリン酸化状態と, その核内と細胞質の間の移行で, 軟骨細胞の肥大化が調節されていると考えられる。我々は最近, PP2A に対抗して軟骨細胞肥大化作用を促進する機序を発見したので紹介する。Salt-Inducible Kinase (SIK) は AMP-activated Protein Kinase (AMPK) ファミリーに属するキナーゼで, SIK1, 2, 3 がある。SIK3 のノックアウトマウスでは軟骨細胞の肥大化が著しく抑制されており⁶⁾, その軟骨表現型は HDAC4 過剰発現トランスジェニックマウスに似ていた。生化学的解析により, SIK3 は細胞質に局在して HDAC4 と結合することが判明した。この作用により SIK3 は HDAC4 を細胞質に留め置き, 核内の HDAC4 を減少させる。その結果, HDAC4 による軟骨細胞肥大化抑制の作用が抑制されて, SIK3 は軟骨細胞の肥大化を促進させる (図 3)。

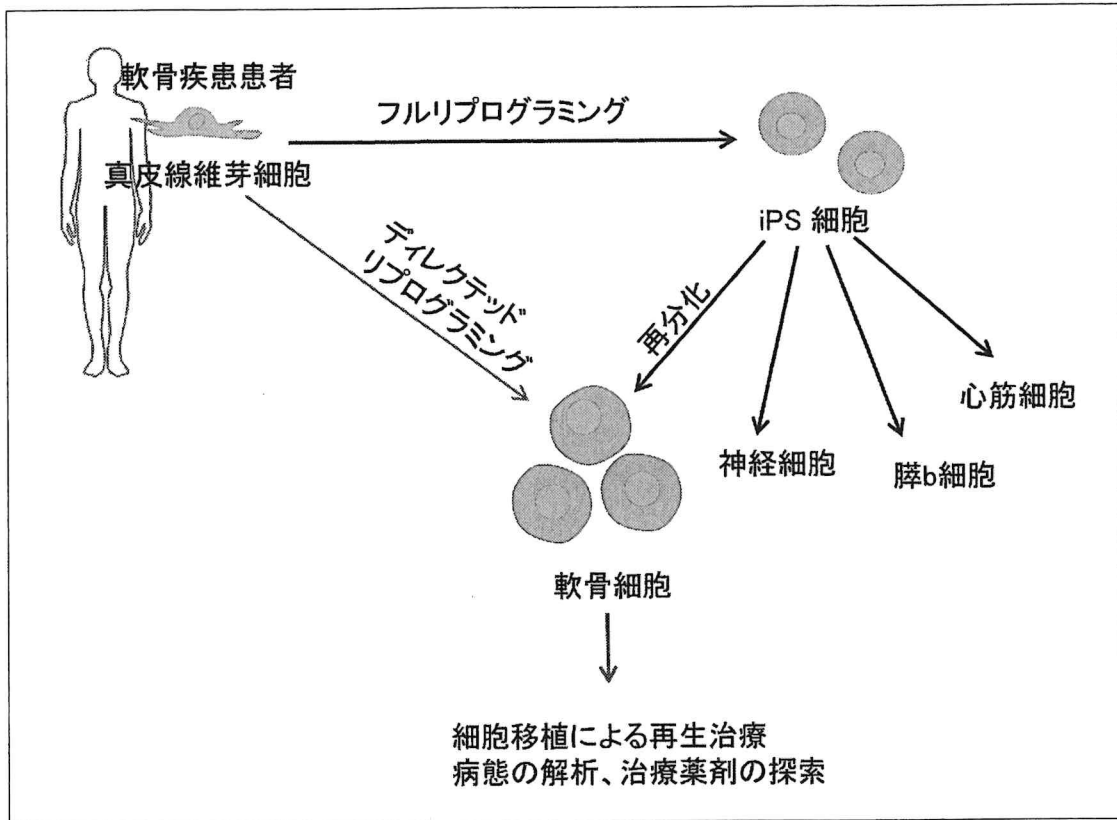


図4 iPS細胞リプログラミング技術を用いた再生医療

軟骨疾患患者の皮膚細胞から、iPS細胞を通して、あるいは直接、軟骨細胞を誘導する。その誘導軟骨細胞を用いて関節軟骨欠損部に移植し、再生治療を行う。未分化多能性を持つiPS細胞への細胞変換をフルリプログラミングと呼ぶのに対し、特定の細胞タイプに直接変換することをディレクテッドリプログラミングと呼ぶ。

3. 軟骨再生

関節軟骨は治癒力に乏しく、一旦損傷されると治らない。また治癒させる薬が無い。ゆえに、再生医療による軟骨損傷の治療が期待されている。現在、非荷重部から軟骨を少量採取し、欠損部に移植する自家軟骨細胞移植が行われている。より大きな欠損を充填するためには軟骨細胞の数がたくさん必要であるが、軟骨細胞を培養で増やすことは難しい。脱分化して軟骨細胞の性質を失うためである。軟骨細胞の性質を保ったまま軟骨細胞数を増やす方法、あるいは脱分化した軟骨を細分化させる方法の研究が行われている。別のアプローチとして、骨髄間葉系幹細胞や滑膜細胞など、軟骨細胞以外の細胞から軟骨細胞を誘導して移植する研究が行われている。ES細胞は他家であること、その由来が倫理的な問題をはらんでい

ることから、その使用は積極的には考えられていない。近年は induced Pluripotent Stem (iPS) 細胞が新たな細胞ソースとして注目されている。iPS細胞は、例えば皮膚細胞に、c-MYC, KLF4, OCT3/4, SOX2 という4つのリプログラミング因子を導入することで作り出せる細胞で、無限に増やせ、かつ体の全てのタイプの細胞に分化しうる能力を持つ。すなわち、この点においてES細胞と同等の性質をもつ。患者の皮膚細胞を採取して培養し、iPS細胞に変換した後に軟骨細胞に分化させることができれば、本人の軟骨欠損部に移植できる(図4)。軟骨細胞への分化は、BMP, FGF, WNTといった増殖因子を順次添加することで行う。別のアプローチとして間葉系幹細胞や線維芽細胞にSOX5/6/9などの軟骨因子を導入して軟骨細胞を誘導することが行われている。我々はiPS細胞リプログラミング技術を応用し、マウス皮膚線維

芽細胞に2つのリプログラミング因子 (c-Myc, Klf4) と1つの軟骨因子 (SOX9) を導入することによって、軟骨細胞を直接誘導することを行った⁸⁾ (図4)。このようにして得られる軟骨細胞は、再生医療において軟骨損傷部の充填に用いる細胞ソースの候補の一つになり得る。

おわりに

関節軟骨は一生存在するのに対し、成長軟骨の細胞は肥大化してやがて無くなる。関節軟骨の再生医療においては、移植後は肥大化せずに長期間とどまるような軟骨細胞が求められる。しかし、骨髄間葉系幹細胞やES細胞から誘導した軟骨細胞は成長軟骨細胞に似た性質を持ち、肥大化してやがてアポトーシスに陥る⁹⁾。よって軟骨再生における課題の一つは、軟骨細胞の肥大化をコントロールする方法を開発することである。そこでPTHrP-HDAC4-MEF2C系は軟骨細胞肥大化コントロールのターゲットになるだろう。そしてその系の制御に係るSIK3も創薬のターゲットになり得ると考える。軟骨再生医療にむけて大量の良質な細胞を供給するために、的確な細胞の誘導方法と誘導した細胞の維持方法を開発することが求められている。

また、成長軟骨の障害である骨系統疾患についてはその病態はまだ不明で、治療薬が無い。細胞リプログラミング技術の進展に伴い、骨系統疾患患者の皮膚線維芽細胞を採取し、iPS細胞を経て、あるいは直接、軟骨細胞に分化誘導することで疾患を再現した軟骨細胞を試験管の中で作ることが可能になっ

てきた。分化誘導した軟骨細胞を、病態を調べたり、治療薬を探索する材料に用いることで、研究の進展が期待できる。

文 献

- 1) Olsen, B. R., Reginato, A. M. and Wang, W.: Bone development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 191-220, 2000.
- 2) Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M. K. *et al.*: Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 19 (2) : 329-44, 2010.
- 3) Vega, R. B., Matsuda, K., Oh, J. *et al.*: Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119 (4) : 555-66, 2004.
- 4) Arnold, M. A., Kim, Y., Czubyrt, M. P. *et al.*: MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Dev Cell* 12 (3) : 377-89, 2007.
- 5) Kozhemyakina, E., Cohen, T., Yao, T. P. *et al.*: Parathyroid hormone-related peptide represses chondrocyte hypertrophy through a protein phosphatase 2A/histone deacetylase 4/MEF2 pathway. *Mol. Cell. Biol.* 29 (21) : 5751-62, 2009.
- 6) Sasagawa, S., Takemori, H., Uebi, T. *et al.*: SIK3 is essential for chondrocyte hypertrophy during skeletal development in mice. *Development* 139 (6) : 1153-63, 2012.
- 7) Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A. *et al.*: The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.* 50 (11) : 3561-73, 2004.
- 8) Hiramatsu, K., Sasagawa, S., Outani, H. *et al.*: Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. *J. Clin. Invest.* 121 (2) : 640-57, 2011.
- 9) Peltari, K., Winter, A., Steck, E. *et al.*: Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum.* 54 (10) : 3254-66, 2006.

< 細胞 ニュース >

第78回大腸癌研究会

開催年月日：2013年1月18日(金)
 代表者：亀岡 信悟(東京女子医科大学)
 開催地：東京都千代田区 会場：都市センターホテル
 事務局連絡先：第78回大腸癌研究会運営事務局
 TEL：03-3263-8688 FAX：03-3263-8693
 常設事務局 URL：http://www.jsccr.jp/
 開催案内 URL：http://jsccr.umin.jp/78/
 E-mail：jsccr78@umin.ac.jp

主題Ⅰ 局所進行直腸癌の治療戦略

局所進行直腸癌に対し、欧米では術前化学放射線療法が標準的治

療だが、本邦では普及していないのが現状であり、積極的治療として骨盤内臓全摘、仙骨合併切除が行われているが、周期合併症の低減およびQOLの保持が課題となる。一方、術前化学療法を応用して根治性を高める治療法も検討されつつある。本主題では、拡大手術の適応やその治療成績、放射線治療や化学療法を組み合わせた治療戦略について報告していただく。

主題Ⅱ 大腸癌の診断と治療のイノベーション

大腸癌の診断と治療において革新的な変化を得るためには、新しい技術の発明だけでなく、新しいアイデアから新たな価値や判断基準を創造することが必要である。内視鏡診断・治療や新しい知見に基づく病理判断、新しい技術を用いた手術、新しい概念の化学療法など、近未来の大腸癌治療のイノベーションにふさわしい取り組みについて報告していただく。 …他