

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 軟骨細胞におけるヘッジホッグシグナルの
Cbfa1 および RANKL の発現調節

指導教官 武谷雄二教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 高本 真弥

ヘッジホッグシグナルは軟骨分化において中心的な役割を果たす因子の一つであり、種々の因子との相互作用が考えられるが、その作用機構にはなお不明な点がある。正常な軟骨分化は成人における骨量維持に必要であり、軟骨分化、特に内軟骨骨化の機構を明らかにすることは近年増加しつつある骨粗鬆症の病態の骨形成の側面を理解するうえでも重要である。本研究ではヘッジホッグシグナルの下流の標的として骨形成に必須の転写因子である core binding factor a1 (Cbfa1) および破骨細胞分化に必須の因子である receptor activator nuclear factor κ B (RANKL) に着目し、ヘッジホッグによるこれらの因子の調節を検討することで、ヘッジホッグの関与する内軟骨骨化の分子機構を明らかにすることを目的とした。

軟骨細胞は間葉細胞に由来し、長管骨においては増殖、肥大化、石灰化の過程を辿り最終的に細胞死に至る。発生において重要なシグナル蛋白であるヘッジホッグの一つインディアンヘッジホッグ (Indian hedgehog; Ihh) は増殖を終え肥大化の前の段階にある軟骨細胞 (前肥大軟骨細胞) に発現し、関節軟骨膜に発現する副甲状腺関連ペプチド (parathyroid hormone-related peptide; PTHrP) との負のフィードバックにより軟骨の肥大

化を抑制すると考えられている。すなわち、Ihh が PTHrP の発現を上昇させ、PTHrP は Ihh よりも分化段階が早い細胞に発現する自身の受容体に作用し、Ihh を発現する軟骨細胞への分化を抑制する。一方、Ihh は PTHrP を介さずに軟骨の最終分化を促進する作用ももつことが種々の実験系から示唆されている。また、軟骨における Ihh の作用として軟骨細胞増殖作用や bone morphogenetic proteins (BMPs) との相互作用も知られており、Ihh の下流の因子の制御に関してはなお不明な点が多い。

Runt 型転写因子である Core binding factor a1 (Cbfa1) は骨芽細胞の分化に必須の転写因子であり、その欠失マウスでは骨化が起こらず、軟骨形成にも異常が見られることが報告されている。また Cbfa1 を軟骨細胞に過剰発現させると軟骨が肥大化し、内軟骨骨化が異所性に発生することも報告されており、Cbfa1 が軟骨の肥大化を促進する作用をもち、軟骨分化においても重要な因子であることが示唆される。さらに最近 Ihh 欠失マウスが作成され、このマウスでは内軟骨骨化が見られず、軟骨膜/骨膜における Cbfa1 の発現が減弱していることが報告された。これらのことから軟骨においてヘッジホッグの下流に Cbfa1 が存在する可能性が示唆されるがこれまで直接的な証拠は得られていなかった。

軟骨細胞におけるヘッジホッグの Cbfa1 調節作用を調べるため、マウス新生仔の肋軟骨より酵素を用いて初代軟骨細胞を調整し、ヘッジホッグの存在下で培養した。ヘッジホッグ蛋白としてマウスソニックヘッジホッグの N 端リコンビナント蛋白 (rmShh-N) を用いた。ヘッジホッグ蛋白の N 端の構造はファミリー内で高度に保存されており、rmShh-N の作用は Ihh の生理活性作用を代替すると考えた。最初にこの細胞においてヘッジホッグシグナルが機能するために必要なヘッジホッグの受容体 Patched、またその下流の因子 Gli の mRNA が発現しており、ヘッジホッグ処理によりそれらの発現レベルが上昇することを確認した。ノーザンブロットにより Cbfa1 の発現を調べたところ、6.5-kb の Cbfa1 mRNA がこの軟骨細胞において発現しており、発現レベルがヘッジホッグの存在により上昇することが示された。この上昇機構を明らかにするため、Cbfa1

遺伝子の転写開始点より-1825bp 上流から開始する 1.8-kb のプロモーター領域を含むルシフェラーゼコンストラクトを初代軟骨細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を調べたところ、ヘッジホッグの存在によりこの 1.8-kb Cbfa1 プロモーターの活性は有意に上昇した。さらにこのプロモーター領域の塩基配列の解析から hepatocyte nuclear factor 3 β (HNF3 β) のエンハンサー上の Gli 結合配列として報告されている 9 塩基の配列 5'-GAACACCCA-3'が Cbfa1 転写開始点の上流-258bp から-250bp にわたって存在することが明らかとなった。この Gli 結合配列を含むルシフェラーゼコンストラクトを初代軟骨細胞に導入したところ、Gli1 の存在によりその活性は上昇し、Gli 結合配列が軟骨細胞において機能していると考えられた。これらの結果から、ヘッジホッグは下流の Gli を活性化し、Cbfa1 プロモーター上の Gli 結合配列への Gli の結合を介して Cbfa1 の転写活性を上昇させていることが示唆された。

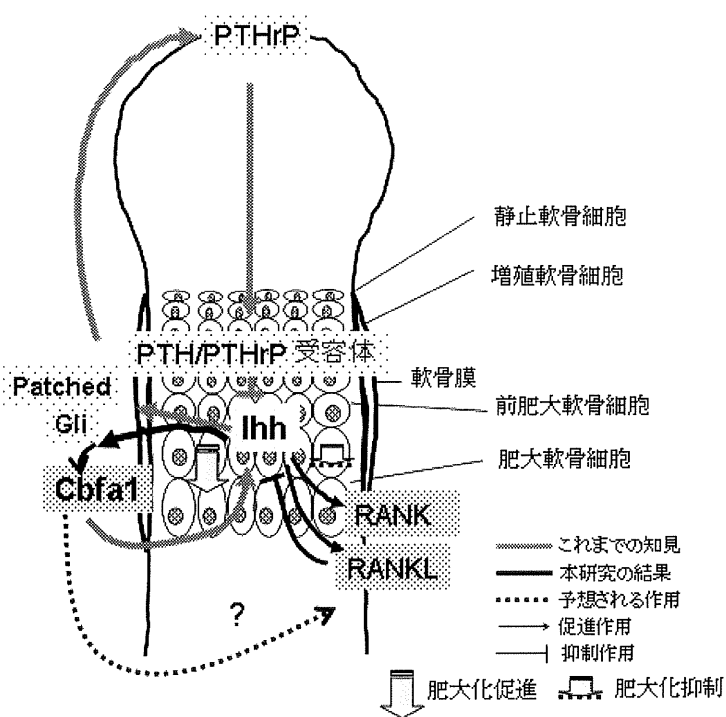
ヘッジホッグと相互作用をもつことが知られる BMP に関しても本実験系において調べたところ、BMP 処理により Cbfa1 mRNA の発現レベルは変化せず、プロモーター活性も変化しなかったことから、初代軟骨細胞におけるヘッジホッグによる Cbfa1 遺伝子発現の上昇作用は BMP シグナルとは独立した系によるものと考えられた。

正常な軟骨分化は軟骨形成とともに軟骨吸収も必要とする。ヘッジホッグ処理により骨の吸収窩が増加することが報告されており、ヘッジホッグシグナルが吸収に関与する因子の発現も調節している可能性があると考えた。RANKL は主に骨芽細胞表面に発現し、受容体の receptor activator nuclear factor κ B (RANK) と結合することにより破骨細胞の分化、活性化に際し中心的な役割を果たすことが知られるが、軟骨においてもその発現が見られることや RANKL, RANK の欠失マウスにおいて成長板軟骨の柱状構造が乱れていることが報告されており、軟骨分化への関与も注目されている。さらに軟骨分化能のある ATDC 細胞ではヘッジホッグ処理により RANKL の発現が上昇することが報告されており、軟骨細胞におけるヘッジホッグシグナルの RANKL の調節について検討した。RT-PCR 法により、ヘッジホッグシグナルは、初代軟骨細胞において RANKL および

RANK の mRNA の発現レベルを上昇させることが示された。さらに、RANKL の共存によりヘッジホッグシグナルによる軟骨細胞のアルカリフォスファターゼ活性の上昇作用が消失することが明らかとなり、RANKL がヘッジホッグの軟骨最終分化促進作用に対し抑制的な作用をもつことが考えられた。また、ヘッジホッグシグナルと RANKL が負のフィードバックの関係を形成する可能性も示唆された。

RANKL 遺伝子のプロモーター上には Cbfa1 の結合配列が存在することが知られており、軟骨細胞におけるヘッジホッグの RANKL 調節は Cbfa1 を媒介する可能性も考えられた。

本研究では初代軟骨細胞においてヘッジホッグシグナルが Cbfa1 遺伝子のプロモーター活性を増大させることでその発現を上昇させること、さらに RANKL, RANK の遺伝子発現レベルを上昇させることが明らかとなった。これらの因子を介してヘッジホッグシグナルが軟骨分化を形成、吸収の両面から調節している可能性が示唆された。



成長板軟骨におけるヘッジホッグシグナルの作用