

博士論文

ヘッジホッグ作動薬による骨折治癒促進効果の検討

柏木 美樹

## 目次

要旨	p4
序文	p5-9
第1章 SAGの仮骨全体に与える骨折治癒効果の検証	p10-21
背景と目的	
1-1 材料と方法	
1-1-1 マウス左側脛骨骨折モデルの作製	
1-1-2 マイクロCTによる放射線学的解析	
1-1-3 統計学的解析	
1-2 結果	
1-2-1 SAG投与による仮骨サイズおよび体積の増加	
1-2-2 SAG投与による体積および骨量の増加（骨密度別の評価）	
1-3 小括	
図	

背景と目的

2-1 材料と方法

2-1-1 Hematoxylin Eosin and Alcian blue double-staining (H&E and

Alcian blue 染色)

2-1-2 軟性仮骨における細胞密度の計測

2-1-3 軟性仮骨における免疫染色

2-1-4 統計学的解析

2-2 結果

2-2-1 SAG投与による軟性仮骨の細胞構成への影響

2-2-2 SAG投与による軟性仮骨での細胞増殖

2-2-3 軟性仮骨における軟骨細胞の増加

2-3 小括

図

背景と目的

3-1 材料と方法

- 3-1-1 Masson's trichrome 染色
- 3-1-2 抗 SP7 抗体を用いた免疫染色
- 3-1-3 統計学的解析
- 3-2 結果
  - 3-2-1 硬性仮骨における骨量の増加
  - 3-2-2 硬性仮骨での SAG 投与による骨芽細胞分化誘導
- 3-3 小括

図

考察	p39-47
謝辞	p48
参考文献	p49-52

## 要旨

骨折の早期治癒は、患者の QOL の向上に繋がる。ヘッジホッグ (Hh) は、骨発生に関与することが知られており、骨折治癒においても重要な役割を果たすと報告されている。そこで本研究では、Hh 作動薬である低分子化合物 SAG を局所的に単回投与し、骨折に対する治療効果を検証した。骨折治癒早期の SAG 局所投与により、術後 14 日目の軟性仮骨および硬性仮骨のサイズが増加した。また、SAG 投与群において、軟性仮骨では軟骨細胞増殖が促進され、硬性仮骨でも骨芽細胞の増加が認められた。本研究結果は、骨形成性低分子化合物を用いて、簡便かつ低侵襲に骨折治癒を促進させる方法の開発につながると考えられる。

## 序文

骨組織は、我々の体を支持する組織として重要な臓器のひとつであり、骨折は、我々の QOL（生活の質）を低下させる疾患のひとつである。骨折治療に関する研究においては、これまで様々な方法が検討されてきた。しかしながら、多数の細胞種やシグナル因子が関わる骨折治癒は、非常に複雑であり、未だ明らかとされていない点が多い<sup>1</sup>。

骨折治癒の過程は、胎生期の骨発生の過程と類似する点が多く<sup>2</sup>、骨発生の知見を参考にして骨折治癒のメカニズムを検証していくことは、有用な方法と考えられる。胎生期における骨発生と同様に、骨折の治癒過程では、膜性骨化と軟骨内骨化の2つの骨化様式がみられる。これらの骨化様式のうち、軟骨内骨化は、間葉系前駆細胞が凝集することにより開始され、続いて軟骨細胞へと分化して軟骨を形成する。この軟骨が、骨形成の鋳型として働き、二次的に骨に置き換えられ、骨化が進行していく。骨折治癒過程においても同様の経過を辿る。骨折の治癒過程は、3つのステージに分類される<sup>3</sup>。1) 血腫の形成や炎症反応がみられる炎症期、2) 間葉系幹細胞が出現し、軟骨内骨化が起こると同時に、膜性骨化も生じ、骨折部に線維性仮骨が形成される仮骨形成期、3) 形成された線維性仮骨が層板骨に置き換わるリモデリング期の3期である (図 1)。この骨折治癒過程は、骨発生の過程と同様に、多数の因子によって制御されている。例えば、

bone morphogenetic proteins (BMPs)<sup>4</sup>、fibroblast growth factors (FGFs)<sup>5</sup>、parathyroid hormone (PTH)<sup>6</sup>、PTH-related peptides (PTHrP)<sup>7</sup>、Notch<sup>8</sup>、Wnt/ $\beta$ -catenin<sup>9</sup>、ヘッジホッグ(Hedgehog, Hh)<sup>10,11</sup>などが挙げられる。これらの因子のうち、Hhは骨発生において、軟骨内骨化のマスターレギュレーターとしてはたらく、形態形成に必要な不可欠な重要因子のひとつである<sup>12</sup>。骨折治癒においても、軟骨内骨化で同様の機能があるのではないかと考えられている。

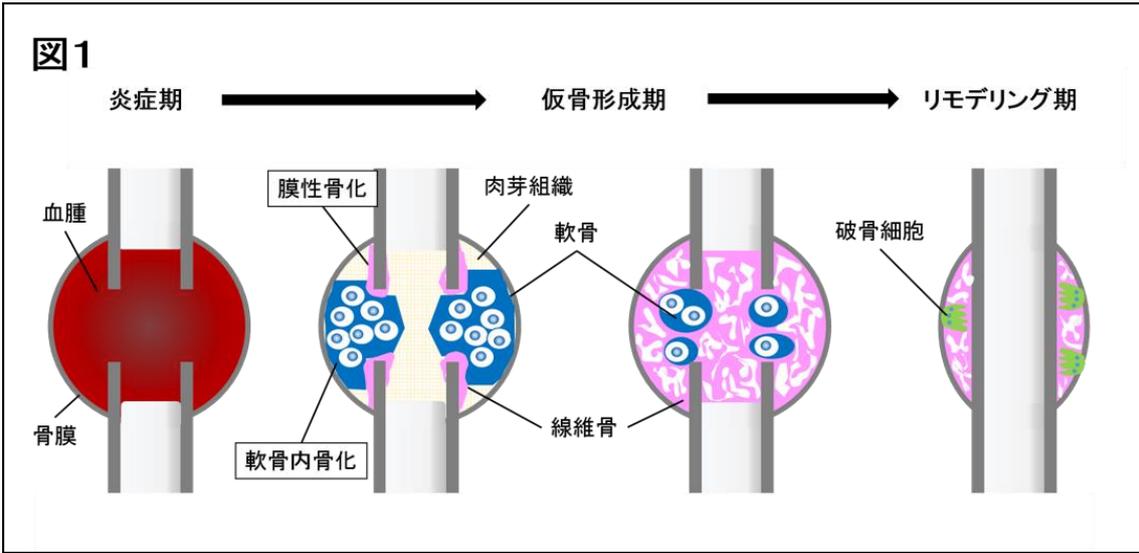
本研究において着目するHhは、1980年にC. Nüsslein-VolhardとE. Wieschausによって、キイロショウジョウバエの体節の極性を決めるsegment-polarity geneのひとつとして最初に同定された分子であり、そのシグナル経路は種を越えて高度に保存されている<sup>13</sup>。モルフォゲンとして濃度勾配依存的に細胞の運命を決定するほか、mitogenとして細胞の増殖やsurvivalを、または誘導因子として器官の形態を制御し個体発生において非常に重要なシグナル分子である。哺乳類では、インディアンヘッジホッグ(Ihh)、ソニックヘッジホッグ(Shh)、デザートヘッジホッグ(Dhh)の3つのホモログが存在し、その中で、骨格系組織で強い発現が認められるのはIhhである。Ihhは、胎生期の軟骨内骨化において、前肥大軟骨細胞および肥大軟骨細胞に強い発現が認められ、間葉系前駆細胞から骨芽細胞への分化決定にはたらく<sup>14,15,16</sup>。Ihhが細胞膜上の受容体Patchedに結合することで、Smoothened(Smo)の抑制が解除されてシグナルが伝達され、転写因子で

ある Gli を介して標的遺伝子の転写が調節される<sup>17</sup>。骨芽細胞は、間葉系前駆細胞から Runx2 陽性骨芽細胞前駆細胞、さらに Runx2 陽性 Osterix/Sp7 陽性骨芽細胞前駆細胞、成熟骨芽細胞の順に分化が進んでいく<sup>18</sup>。Ihh ノックアウトマウスでは、軟骨内骨化において、軟骨細胞の増殖・成熟、および骨芽細胞への分化が進まず、骨形成が認められない。また、Long らは、Smo ノックアウトマウスで骨形成が認められず<sup>19</sup>、また骨芽細胞のマスターレギュレーターRunx2 遺伝子発現が認められないことから、Hh は Runx2 陽性骨芽細胞前駆細胞の分化に必要不可欠であることを報告した。一方、Rodda らは、Osterix/Sp7 陽性細胞において、Hh シグナルは骨形成に寄与しないことを報告した<sup>18</sup>。つまり、Ihh は骨芽細胞分化過程の初期に重要な役割を果たすことが考えられた。このことはまた、骨折治癒においても受傷後早期に Ihh が必要であることを示唆している。

骨発生における Hh の機能に加え、成人モデルにおける骨の恒常性や骨治癒についてもいくつか報告がある<sup>20, 21, 22, 23</sup>。その中で Maeda らは、ラット大腿骨骨欠損モデルを用いて、ヘッジホッグ作動薬である Smoothened agonist (SAG) 搭載型人工骨の移植を行い、その治療効果について報告している<sup>24</sup>。SAG 搭載型人工骨は、骨欠損に対して治癒促進効果が認められた。

これらの背景を踏まえて、本研究では、マウス骨折モデルを用いて、SAG 局所投与を行い、骨折治癒における SAG の治癒効果を検証した。定量的・定性的

評価に加え、組織学的解析を行い、骨折治癒過程における Hh シグナルの作動メカニズムについての洞察を得た。



**図1：骨折治癒過程の模式図**

炎症期では、骨折による血管の損傷により出血が起こり、骨折部に血腫が形成される。血腫には、炎症性細胞やサイトカイン等が含まれる。続く仮骨形成期では、膜性骨化および軟骨内骨化により、軟性仮骨や硬性仮骨の形成が起こる。最後にリモデリングが起こり、皮質骨の連続性が回復されていく。

## 第1章 SAGの仮骨全体に与える骨折治癒効果の検証

### 背景と目的

骨折治癒は、仮骨形成の後、骨リモデリングを介して治癒していく。前述した骨発生における知見から、受傷後早期に Hh シグナルを活性化することで、仮骨形成を促進できるのではないかという仮説を立てた。そこで、本章では、骨形成を定量的に評価できる three-dimensional micro-computed tomography (3D- $\mu$ CT) を用いて、SAG の局所投与の仮骨形成に与える影響について検証した。

### 1-1 材料と方法

#### 1-1-1 マウス脛骨骨折モデルの作製

8週齢オス C57BL/6J マウスを Charles River Japan より入手した。Vehicle 投与群、SAG 投与群ともに、各群 7 匹のマウスを用いて検証を行った。動物実験に関しては国の「動物の保護及び管理に関する法律」及び東京大学の動物実験実施マニュアルに従い、動物愛護の観点に十分留意して行った (#KA13-5)。

前述の 8 週齢オス C57BL/6J マウスを用いて、3%イソフルラン吸入麻酔下にて左側脛骨に骨折を作製した。まず、皮膚、皮下組織、筋膜を切開し、左側脛骨を露出させた。続いて、骨幹部中央にて、ダイヤモンドディスクを用いて脛骨を切断した。その後、骨髄腔内に滅菌済みの 23G spinal needle (Terumo Clinical Supply)

を挿入し固定を行った。最後に、4-0 黒ナイロン糸を用いて創部を縫合した。本研究の実験スケジュールの概略を図2に示す。術後1日目に、SAG (Calbiochem) を局所投与した。SAG を精製水に溶解し、100  $\mu$ M の SAG 溶液を作製した。SAG 溶液を 30G シリンジ (BD Biosciences) に準備し、骨折部に 10  $\mu$ l 傍骨膜注射を施行した。比較対象のため、Vehicle 投与群では、SAG 溶液と同量の精製水を投与した。術後 14 日目に、3%イソフルラン吸入麻酔下で、リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行い、骨折モデルを作製した左側脛骨を採取した。採取したマウス左側脛骨は、さらにリン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒドで 4°C、1 時間固定した。固定後の左側脛骨は、解析実験を行うまで phosphate-buffered saline (PBS) 中で 4°C 保存した。

#### 1-1-2 マイクロ CT による放射線学的解析

骨折後の固定に使用していた髄内針を除去し、3D- $\mu$ CT を用いた解析を行った。microfocus X-ray CT system (Shimadzu) を用いて撮影し、放射線学的解析を行った。3D- $\mu$ CT の撮影条件は、以下のとおりである。電圧 90 kV、電流 110  $\mu$ A、field of view (XY)13.5 mm、画像サイズ 512  $\times$  512 pixels と設定した。骨形態計測には、TRI/3D-BON (Ratoc System Engineering) を使用して三次元的解析を行った。また、仮骨部分を解析するため、仮骨全体を含め、骨折線を中心に、5  $\times$  5  $\times$  4 mm

の立方体でトリミングを行った (図 3a)。また、仮骨のみを評価するために、左側脛骨の皮質骨および海綿骨領域は取り除いて計測した。骨領域と仮骨は、骨密度 (bone mineral density, BMD) を用いて、以下のとおり定義した (図 3b) <sup>25</sup> :

BMD value > 700 = 骨領域 (左側脛骨の皮質骨領域)、700 > BMD value > 350 = 高度に石灰化した仮骨、350 > BMD value > 200 = 未成熟の仮骨。また、仮骨領域の評価の指標を以下のとおり定義した : 仮骨全体の体積 (total callus volume)、仮骨中の骨の体積 (total bone volume, BV<sub>T</sub>)、骨密度の高い領域の体積 (high-density bone volume, BV<sub>H</sub>)、骨密度の低い領域の体積 (low-density bone volume, BV<sub>L</sub>)、仮骨全体の骨密度 (total bone mineral density, BMD<sub>T</sub>)、高度に石灰化した領域の骨密度 (highly mineralized bone density, BMD<sub>H</sub>)、仮骨全体の骨塩量 (total mineral contents, BMC<sub>T</sub>)、骨密度の高い領域の骨塩量 (high-density bone mineral contents, BMC<sub>H</sub>)、骨密度の低い領域の骨塩量 (low-density bone mineral contents, BMC<sub>L</sub>)。

### 1 - 1 - 3 統計学的解析

実験結果は、平均±標準偏差として表記した。また、t 検定を用いて、2 群間の平均値の差を検証した。

## 1 - 2 結果

### 1 - 2 - 1 SAG 投与による仮骨サイズおよび体積の増加

骨折の治癒過程における、骨折部への SAG の局所投与の効果を、マウス脛骨骨折モデルを用いて検証した (図 2)。はじめに、SAG の投与濃度と投与回数の検討を行った。先行研究<sup>24</sup>を参考に、1  $\mu$ M、100  $\mu$ M、1 mM の SAG を術後 1 日目に局所投与した結果、100  $\mu$ M SAG を投与した群で術後 14 日目の仮骨サイズが最大値を示した (data not shown)。また、術後 1 日目に単回投与した群と、術後 1 日目および術後 5 日目に投与した群を比較したところ、両群間に有意な差は認められなかった (data not shown)。以上より、本研究では、より低侵襲な方法を選択し、100  $\mu$ M SAG 単回投与とした。

左側脛骨骨折を作製し、術後 14 日目に骨折部位の全体像を把握するため、3D- $\mu$ CT により 3D 画像を構築した結果、SAG 投与群での仮骨サイズの増加傾向が認められた (図 4)。さらに、骨折線を中心とした仮骨形成の詳細な評価を行うため、5  $\times$  5  $\times$  4 mm にトリミングした 3D 画像を作成し、仮骨の骨密度を可視化した。SAG 投与群で仮骨サイズが大きく、骨密度が高い領域 (図 5 黄～水色部分)、骨密度が低い領域 (図 5 水色～青色部分) の増加傾向が認められた。

3D 画像による仮骨増大傾向が認められたため、仮骨サイズの定量的評価を施行した。まず、骨折線上で仮骨の直径を計測した結果、SAG 投与群で有意な増

大が認められた ( $p < 0.01$ 、図 6)。また、仮骨全体の体積を計測したところ、体積も SAG 投与群において有意に増大した (図 6)。SAG 投与群において、仮骨の直径は約 15%、体積は約 26%の増大が認められた。以上より、SAG の骨折部への局所投与により、骨折線周囲での仮骨サイズが増大が生じることが示された。

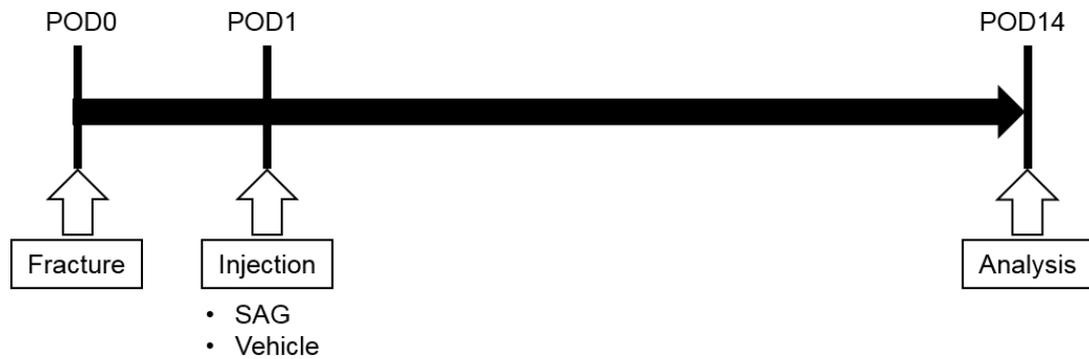
#### 1-2-2 SAG 投与による仮骨の体積および骨量の増加 (骨密度別の評価)

仮骨は、結合組織、軟骨組織、新生骨梁組織など複数の組織により形成される。そのため、SAG 投与により認められた仮骨の増大が、どの組織形成に起因しているか明らかにするため、骨密度別にパラメーターを設定し、骨量、骨塩量、骨密度を計測した。その結果、仮骨中の骨の体積 ( $BV_T$ )、骨密度の高い領域の体積 ( $BV_H$ )、骨密度の低い領域の体積 ( $BV_L$ )、仮骨全体の骨密度 ( $BMD_T$ )、高度に石灰化した領域の骨密度 ( $BMD_H$ )、仮骨全体の骨塩量 ( $BMC_T$ )、骨密度の高い領域の骨塩量 ( $BMC_H$ )、骨密度の低い領域の骨塩量 ( $BMC_L$ )のすべての項目において、SAG 投与群で有意な増加が認められた (図 7)。以上より、術後 1 日目の SAG 局所投与による外因性の Hh シグナルの活性化は、骨折治癒過程の初期段階にはたらき、仮骨形成を促進させることが示唆された。

### 1-3 小括

骨折治癒の初期段階（術後 1 日目）での SAG の局所投与により、その後の仮骨形成が促進することが明らかとなった。また、詳細な骨密度定量により、骨密度の高い領域、低い領域ともに、仮骨サイズが増大が認められたことから、仮骨形成全体が、SAG 投与、すなわち外因性 Hh 活性化により促進されることが示唆された。

**図2**

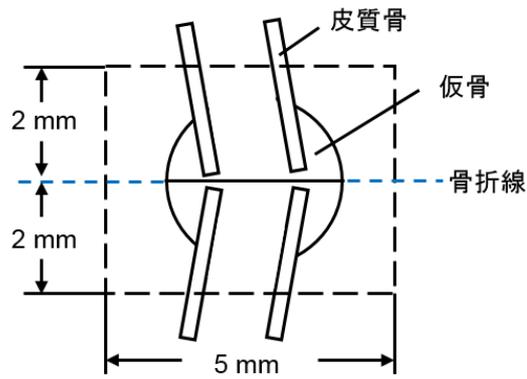


**図2：本研究の実験スケジュールの概略図**

8週齢マウスの左側脛骨に骨折を作製した。術後1日目に、左側脛骨骨折部に100  $\mu$ M SAG溶液または精製水を10  $\mu$ l局所投与した。術後14日目に左側脛骨を採取して解析を行った。

図3

a



b

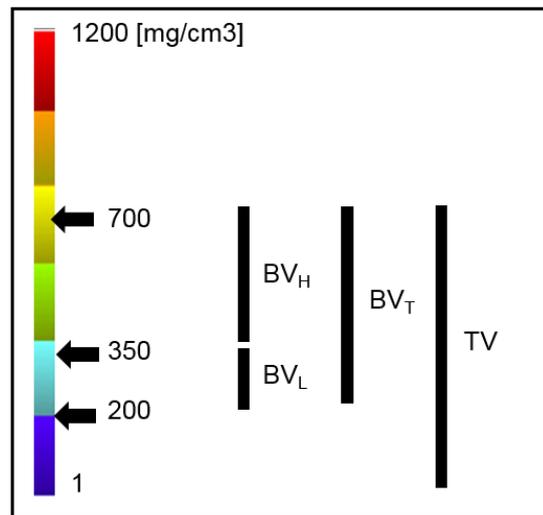


図3：仮骨の放射線学的解析の手法および定義

(a) 骨折線を中心に、 $5 \times 5 \times 4$  mm にトリミングし 3D 画像を作成

(b) 骨密度の値に基づき、各評価項目を定義した。BV<sub>H</sub>：骨密度の高い領域の体積、BV<sub>L</sub>：骨密度の低い領域の体積、BV<sub>T</sub>：仮骨中の骨の体積、TV：仮骨全体の体積

図4

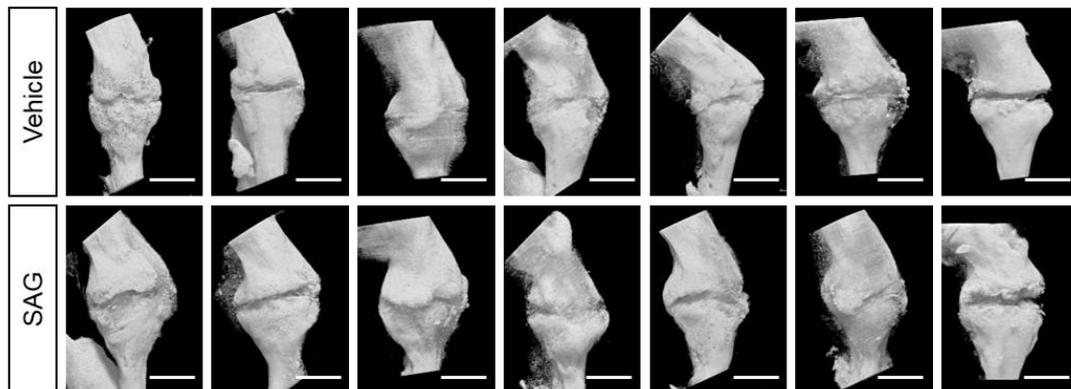


図4：術後14日目の左側脛骨骨折部の全体像

Vehicle 投与群と SAG 投与群の左側脛骨を術後14日目に採取し、3D- $\mu$ CTで撮影した。Bar, 2 mm



図6

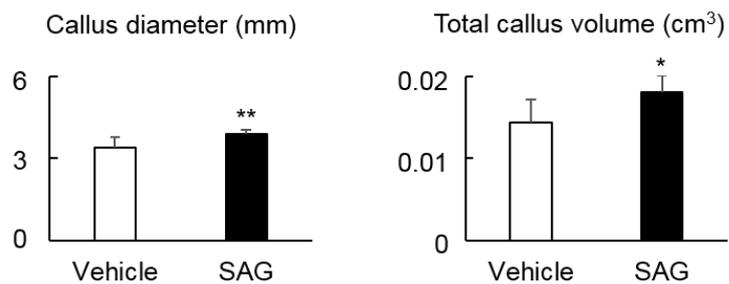
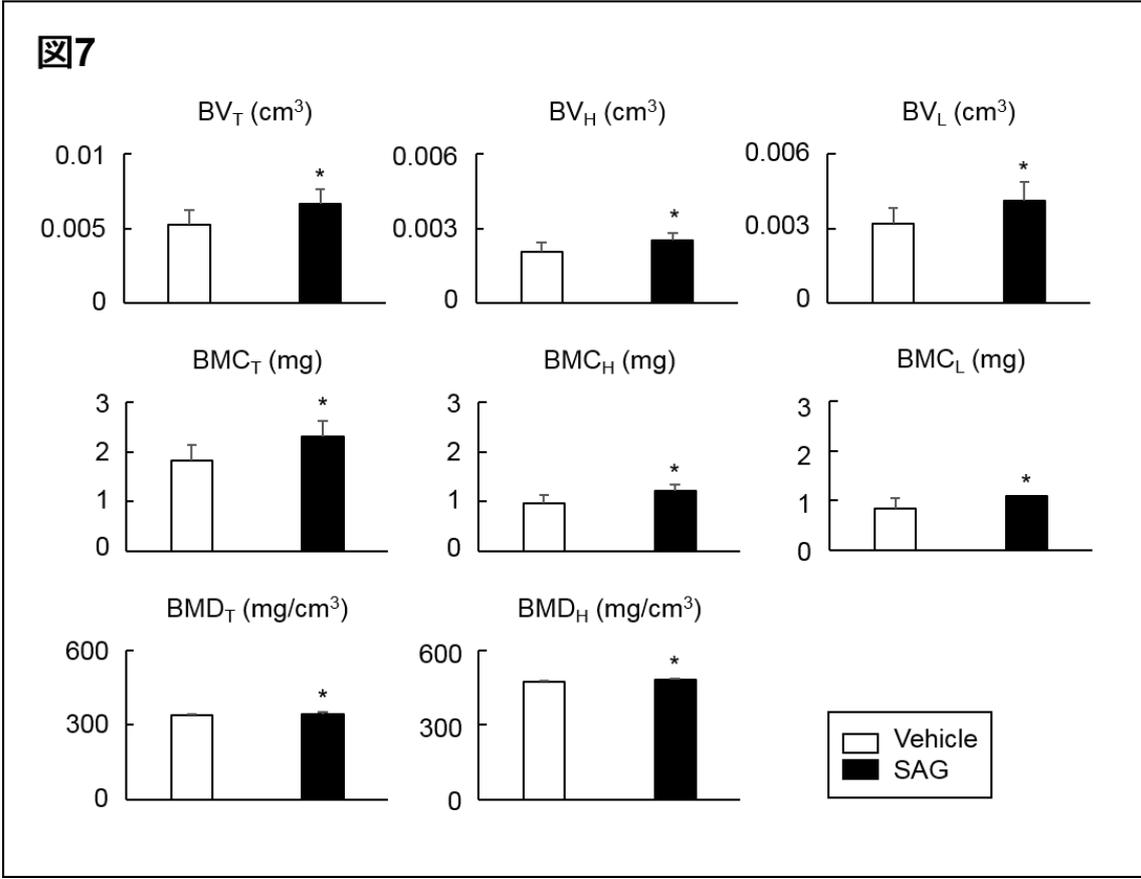


図6：仮骨の直径および仮骨全体の体積

矢状断像を用いて計測した骨折線上での仮骨の直径および仮骨全体の体積。

n=7、mean±S.D.、\*p<0.05 vs. vehicle、\*\*p<0.01 vs. vehicle



**図7 : 3D- $\mu$ CT 画像の組織形態計測**  
 BV: 骨量、BMC: 骨塩量、BMD: 骨密度。n=7、mean $\pm$ S.D.、\*p<0.05 vs. vehicle

## 第2章 SAGの軟性仮骨に対する骨折治癒効果の検証

### 背景と目的

仮骨形成には、軟性仮骨の形成と硬性仮骨の形成の2種類が存在する。前章でSAG投与が仮骨形成を促進することが明らかになったため、本章では、軟性仮骨の形成に、次章では、硬性仮骨の形成に焦点を当て、詳細な解析を行った。本章では、軟性仮骨の形態および構成細胞に着目して、SAG投与による仮骨形成促進のメカニズムについて組織学的解析を行った。

### 2-1 材料と方法

#### 2-1-1 Hematoxylin Eosin and Alcian blue double-staining (H&E and Alcian blue 染色)

リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒドを用いた灌流固定後にPBS中で保存していた検体を、放射線学的解析後に0.5M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)にて21日間浸漬し脱灰処理を行った。十分に脱灰されたことを確認後、30%ショ糖/PBSに置換して、ティシュー・テック O.C.T. コンパウンド (サクラファイブ テックジャパン) を使用して包埋した。その後、CryoJane tape-transfer system (Leica Biosystems)を用いて、矢状断で厚さ10  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。水洗後、0.3% Alcian blue 溶液に5分浸漬し、流水にて水洗を行った。マイヤーのヘ

マトキシリン液に 5 分浸漬し、流水水洗後、1%エオジンアルコールに 1 分浸漬した。その後、エタノール脱水・Hemo-De (ファルマ) 透徹・マリノール封入を行った。BZ-X710 オールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス) を用いて観察し、組織学的解析を行った。

#### 2-1-2 軟性仮骨における細胞密度の計測

細胞密度の計測には、ImageJ software (U.S. National Institutes of Health, <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) を用いて解析した。200 倍で観察した画像を用いて、 $200 \times 200 \mu\text{m}$  の範囲で軟性軟骨部分中央の画像を抽出し、細胞数を計測して細胞密度を算出した。

#### 2-1-3 軟性仮骨における免疫染色

リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒドを用いた灌流固定後に PBS 中で保存していた検体を、放射線学的解析後に 0.5M EDTA にて 21 日間浸漬し脱灰処理を行った。十分に脱灰されたことを確認後、30%ショ糖/PBS に置換して、ティシュー・テック O.C.T. コンパウンドで包埋し、矢状断で厚さ  $10 \mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。続いて、抗 PCNA 抗体または抗 SOX9 抗体を用いて免疫染色を行った。PCNA 免疫染色は、CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System (Dako)

を用いて増感を行った。なお、すべての反応は室温にて実施した。まず、内因性ペルオキシダーゼを除去するため、PEROXIDASE BLOCK に 5 分浸漬した。PROTEIN BLOCK に 5 分浸漬した後、一次抗体としてマウス抗 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) モノクローナル抗体 (1:1000、Cell Signaling Technology) を 20 分間反応させた。ANTI-MOUSE IMMUNOGLOBULINS-HRP を 15 分間反応させた後、遮光下にて AMPLIFICATION REAGENT を用いて 15 分間増感を行った。続いて、ANTI-FLUORESCHEIN-HRP を 15 分間反応させた。その後、Diaminobenzodine (DAB) (Dako) を添加し、4 分間発色反応させた。これにより、PCNA 陽性細胞は、茶色に染色された。対比染色は、メチルグリーン (Dako) を用いて、4 分間染色した。これにより、核が緑色に染色された。一方、SOX9 については、以下の方法で免疫染色を行った。内因性ペルオキシダーゼを不活性化するため、3%過酸化水素水/メタノールに室温で 30 分間浸漬した。非特異的結合を防ぐため、3%ウシ血漿アルブミン (Sigma) + 1%ヒツジ血清 (Sigma) /PBST により室温で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体としてウサギ抗 SOX9 ポリクローナル抗体 (1:500、Millipore) を 4 °C で一晩反応させた。抗 SOX9 抗体に対して、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:1000、Promega) を二次抗体として、室温で 1 時間反応させた。その後、DAB を添加し、4 分間発色反応させ、検鏡した。これにより、SOX9 陽性細胞は、茶色に染色された。対比染色は、メチル

グリーンを用いて、4分間染色した。これにより、核が緑色に染色された。染色された切片は、BZ-X710 オールインワン蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。PCNA 陽性細胞の計測には、ImageJ software を使用して解析した。200倍で観察した画像を用いて、 $200 \times 200 \mu\text{m}$  の範囲で軟性軟骨部分中央の画像を抽出し、PCNA または SOX9 陽性細胞および PCNA または SOX9 陰性細胞の数を計測して、PCNA 陽性細胞の割合（ $\text{PCNA 陽性細胞数} / \text{全細胞数} \times 100 (\%)$ ）、SOX9 陽性細胞の割合（ $\text{SOX9 陽性細胞数} / \text{全細胞数} \times 100 (\%)$ ）を計算した。

#### 2-1-5 統計学的解析

実験結果は、平均 $\pm$ 標準偏差として表記した。また、t検定を用いて、2群間の平均値の差を検証した。

## 2-2 結果

### 2-2-1 SAG 投与による軟性仮骨の細胞構成への影響

軟性仮骨形成に対する Vehicle 投与と SAG 投与の効果を検証する目的で、組織学的解析を行った。H&E and Alcian blue 染色により、軟性仮骨の形態学的解析を行った。軟性仮骨は、線維組織、軟骨組織などにより構成されているが、術後 14 日目における軟性仮骨はその大部分が軟骨組織により構成されていた。SAG 投与群において、軟骨組織（青色部分）の増大が認められたが、軟骨組織を形成する細胞構成については、明らかな差が認められなかった（図 8a）。次に、軟性仮骨における細胞密度について計測を行った。Vehicle 投与群および SAG 投与群間において、細胞密度に大きな差は認められず、顕微鏡画像の知見と同様の結果が得られた（図 8b）。以上より、骨折治癒過程での仮骨形成における SAG 投与は、細胞密度・細胞構成には影響を与えないことが示唆された。

### 2-2-2 SAG 投与による軟性仮骨での細胞増殖

細胞密度に関する検証より、軟性仮骨サイズは増大するものの、細胞密度には有意な差は認められなかったため、細胞密度を保ったまま細胞数が増加することが軟性仮骨サイズを増大させているのではないかと考えた。そこで、抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織学的解析により、軟性仮骨における細胞増殖について検

証した。その結果、SAG 投与群において、PCNA 陽性細胞の割合の有意な増加が認められた (図 9a、b)。以上より、SAG 投与は、細胞数の増加を伴って、軟性仮骨の形成を促進することが示唆された。

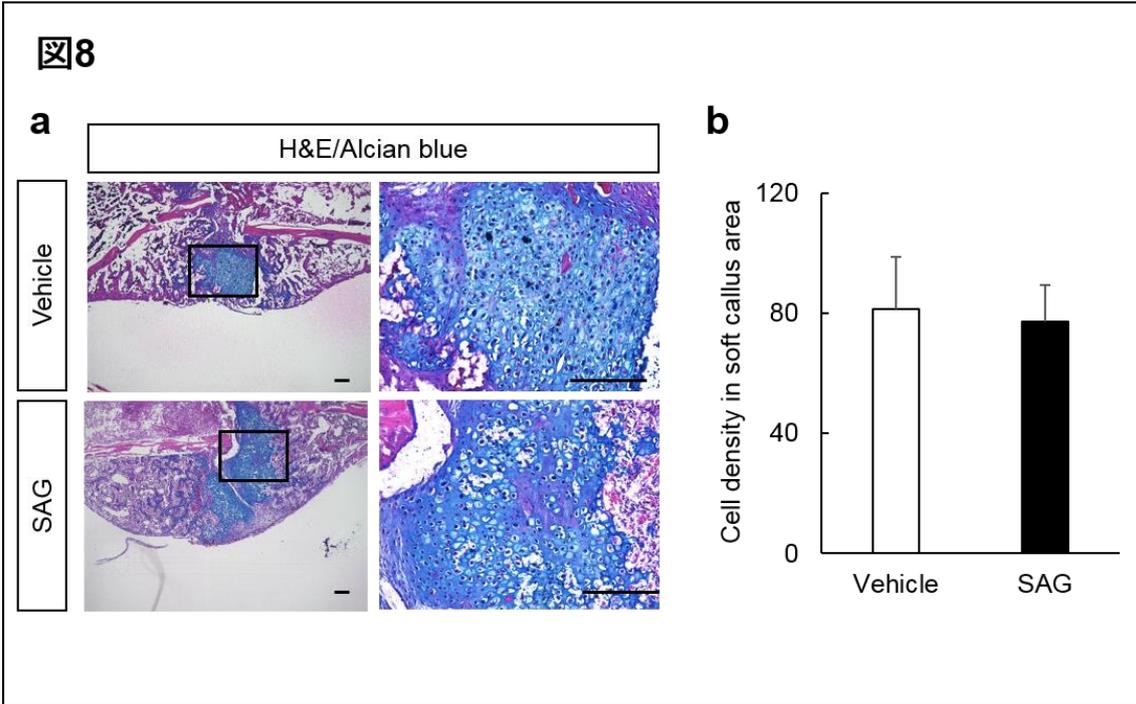
### 2-2-3 軟性仮骨における軟骨細胞の増加

次に、軟性仮骨を構成するどの細胞が軟性仮骨における細胞数増大に寄与しているかを検証するため、抗 SOX9 抗体を用いて免疫組織学的解析を行った。

SOX9 は、軟骨細胞で発現するタンパク質の一種であり、本研究において軟骨細胞を標識するマーカーとして用いた。その結果、SAG 投与群において、軟性仮骨の SOX9 陽性細胞の割合の有意な増加が認められた (図 10a、b)。以上より、SAG は、軟性仮骨を構成する細胞のうち、少なくとも SOX9 陽性の軟骨細胞の増殖を促進することが示唆された。

## 2-3 小括

骨折治癒過程における初期段階での SAG 局所単回投与により、軟性仮骨のサイズが増大することが明らかとなった。SAG 投与は、軟性仮骨中での SOX9 陽性軟骨細胞数を増大させるのに対し、軟性仮骨中の細胞密度には影響を与えないことが明らかとなった。



**図8：術後14日目の仮骨の軟性仮骨と細胞密度の比較**

(a) H&E/Alcian blue 染色像。右は軟性仮骨部の拡大像。Bar, 200  $\mu$ m

(b) 軟性仮骨における細胞密度。n=3、mean $\pm$ S.D.

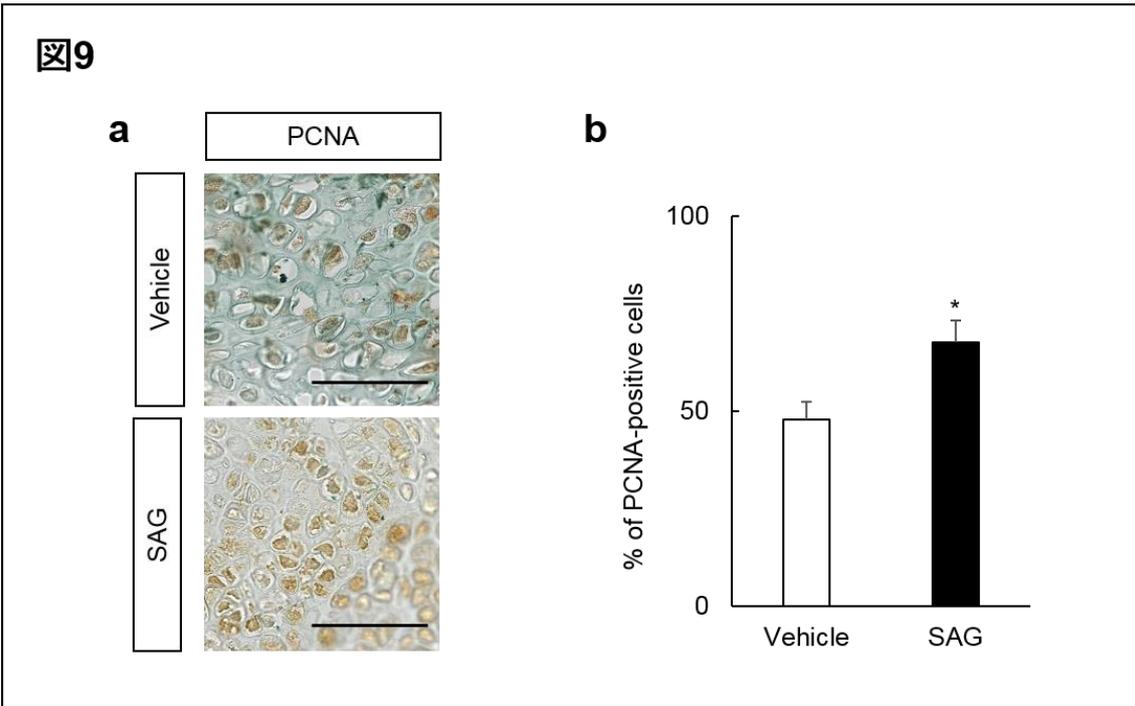


図9：軟性仮骨における細胞増殖の比較

(a) 抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色像。Bar, 100  $\mu$ m

(b) 軟性仮骨領域での PCNA 陽性細胞の割合。n=3、mean $\pm$ S.D.、\*p<0.05 vs. vehicle

図10

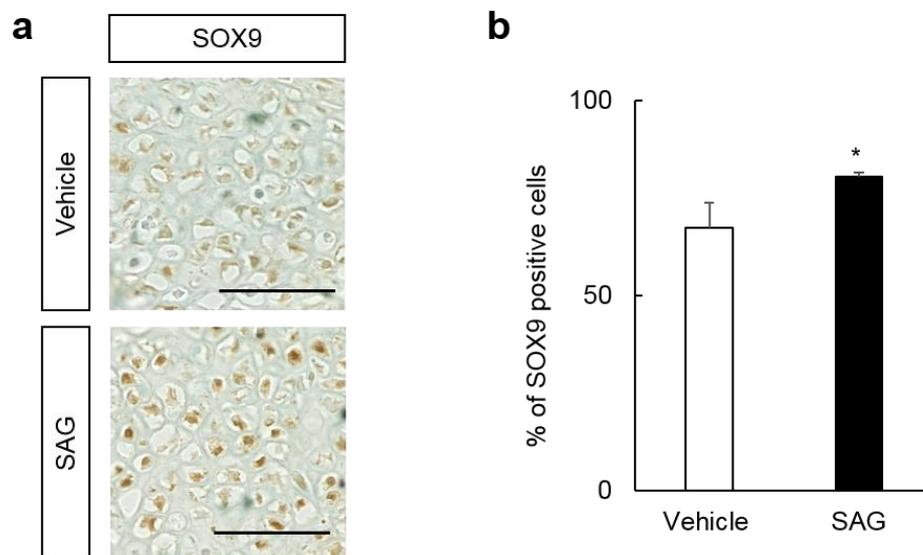


図10：軟性仮骨におけるSOX9陽性軟骨細胞数の比較

(a) 抗SOX9抗体を用いた免疫染色像。Bar, 100  $\mu$ m

(b) 軟性仮骨領域でのSOX9陽性細胞の割合。n=3、mean $\pm$ S.D.、\*p<0.05 vs. vehicle

### 第3章 SAGの硬性仮骨に対する骨折治癒効果の検証

#### 背景と目的

仮骨形成では、軟骨組織を形成した（軟性仮骨形成）後、骨組織に置き換わり（硬性仮骨形成）ながら治癒が進行していく。本章では、硬性仮骨の形成に着目して、仮骨中の新生骨の造成および骨芽細胞数に対する SAG 投与の効果について組織学的解析を行った。

#### 3-1 材料と方法

##### 3-1-1 Masson's trichrome 染色

リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒドを用いた灌流固定後に PBS 中で保存していた検体を、放射線学的解析後に 0.5M EDTA にて 21 日間浸漬し脱灰処理を行った。十分に脱灰されたことを確認後、エタノール脱水し、パラフィン包埋を行い、矢状断で厚さ 8  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、Masson's trichrome 染色を行った<sup>26</sup>。パラフィン切片を脱パラフィンした後、第1媒染剤（武藤化学）に 30 分間浸漬した。流水水洗後、ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン（武藤化学）に 20 分間浸漬し、続けて色だし水洗を 10 分間行った。第2媒染剤（武藤化学）に 30 秒浸漬し、その後 0.75%オレンジ G 液（武藤化学）に 1 分間浸漬した。マッソン染色液 B（武藤化学）に 30 分間浸漬し、続いて 2.5%リントングステン酸液に 20 分

間浸漬した。最後に、アニリン青（武藤化学）に 25 分間浸漬し、検鏡後、エタノール脱水・Hemo-De 透徹・封入作業を行った。染色後の切片は、BZ-X710 オールインワン蛍光顕微鏡を用いて観察を行い、硬性仮骨の組織学的解析を行った。単位面積あたりの新生骨量の計測には、ImageJ software を使用して解析した。200 倍で観察した画像を用いて、 $200 \times 200 \mu\text{m}$  の範囲で硬性仮骨領域の画像を抽出し、単位面積あたりの新生骨領域の面積の割合（%）を計算した。

### 3-1-2 抗 SP7 抗体を用いた免疫染色

リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒドを用いた灌流固定後に PBS 中で保存していた検体を、放射線学的解析後に 0.5M EDTA にて 21 日間浸漬し脱灰処理を行った。十分に脱灰されたことを確認後、30%ショ糖/PBS に置換して、ティッシュ・テック O.C.T. コンパウンドで包埋し、矢状断で厚さ  $10 \mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。続いて、内因性ペルオキシダーゼを不活性化するため、3%過酸化水素水/メタノールに室温で 30 分浸漬した。3%ウシ血漿アルブミン+1%ヒツジ血清/PBST により室温で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体としてウサギ抗 SP7 ポリクローナル抗体（1:2000、Abcam）を  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。抗 SP7 抗体に対して、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（1:2000、Promega）を二次抗体として、室温で 1 時間反応させた。その後、DAB を添加し、4 分間発色反応させ、

検鏡した。これにより、SP7 陽性細胞は、茶色に染色された。対比染色は、メチルグリーンを用いて、4 分間染色した。これにより、核が緑色に染色された。染色された切片は、BZ-X710 オールインワン蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。SP7 陽性細胞の計測には、ImageJ software を用いて解析した。200 倍で観察した画像を用いて、 $200 \times 200 \mu\text{m}$  の範囲で軟性軟骨に近い硬性軟骨部分の画像を抽出し、SP7 陽性細胞および SP7 陰性細胞の数を計測して SP7 陽性細胞の割合（SP7 陽性細胞数/全細胞数 $\times 100$ （%））を計算した。

### 3-1-3 統計学的解析

実験結果は、平均 $\pm$ 標準偏差として表記した。また、t 検定を用いて、2 群間の平均値の差を検証した。

## 3-2 結果

### 3-2-1 硬性仮骨における骨量の増加

放射線学的解析において、骨密度の高い領域でも SAG 投与による仮骨サイズおよび骨量の増加が認められたため、組織学的解析を用いて硬性仮骨における SAG 局所投与の効果を検証した。Masson's trichrome 染色を行い、硬性仮骨の占める領域を明示し、顕微鏡にて観察を行ったところ、SAG 投与群では、新生骨梁組織の増加傾向が認められた (図 11a)。また、単位面積あたりの新生骨量の割合を計測した結果、SAG 投与群において有意な増加が認められた (図 11b)。以上より、SAG の局所投与によって、硬性仮骨において新生骨量が増加することが組織学的にも支持された。

### 3-2-2 硬性仮骨での SAG 投与による骨芽細胞分化誘導

次に、骨の新生に関わる骨芽細胞に焦点を絞り、細胞の関与を検証することとした。骨芽細胞の分化マーカーとして、SP7 を用い、硬性仮骨における骨芽細胞数について検討した。抗 SP7 抗体を用いた免疫組織学的解析において、SAG 投与群で SP7 陽性細胞の割合が有意に増加した (図 12a、b)。以上より、SAG 投与によって仮骨内で骨芽細胞分化が促進され、骨芽細胞数が増加し、骨量の増加へとつながった可能性が示唆された。

### 3-3 小括

硬性仮骨における骨芽細胞の増加と、それに伴う骨量の増加が確認された。硬性仮骨サイズの増加は、外因性 Hh の働きにより、骨芽細胞の分化誘導が促進されることにより引き起こされる可能性が示された。

図11

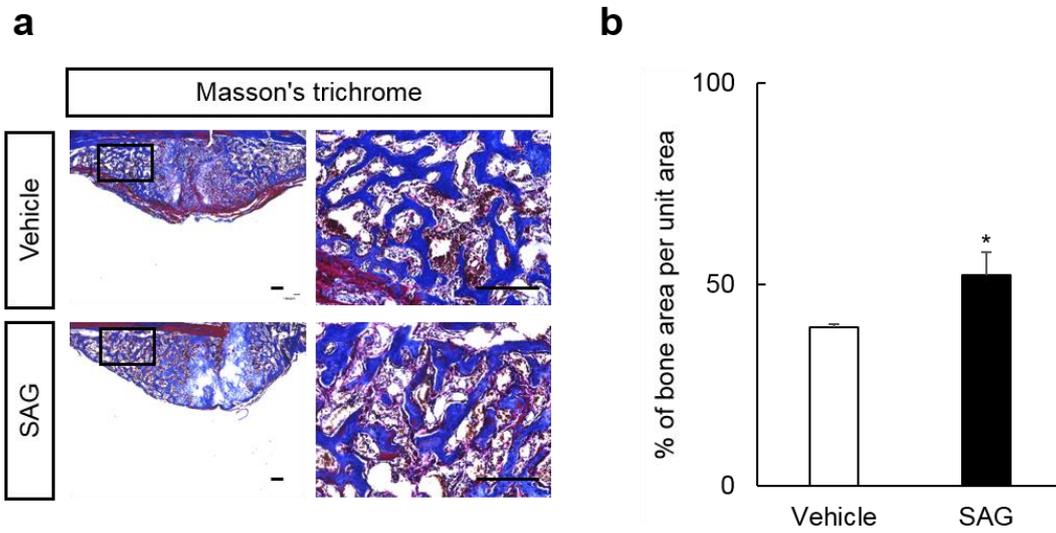


図 1 1 : 術後 14 日目の硬性仮骨

(a) Masson's trichrome 染色像。右は硬性仮骨領域の拡大像。濃い青色：骨、薄い青色：軟骨。Bar, 200  $\mu$ m

(b) 単位面積あたりの新生骨量の割合。n=3、mean $\pm$ S.D.、\*p<0.05 vs. vehicle

図12

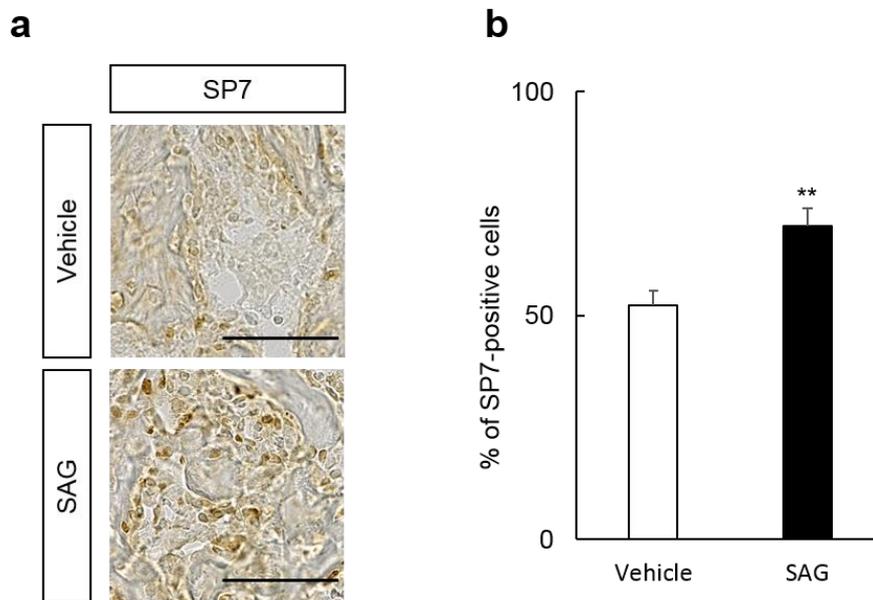


図 1 2 : 硬性仮骨における骨芽細胞の比較

(a) 抗 SP7 抗体を用いた免疫染色像。Bar, 100  $\mu$ m

(b) 硬性仮骨領域での SP7 陽性細胞の割合。n=3、mean $\pm$ S.D.、\*\*p<0.01 vs. vehicle

## 考察

本研究では、マウス骨折モデルにおいて SAG 局所投与により仮骨形成が促進されることが明らかとなり、この効果は軟性仮骨における軟骨細胞の増殖および硬性仮骨における骨芽細胞の分化促進・骨形成の促進を介していることが示唆された。

骨折治癒の過程は、炎症期、仮骨形成期、リモデリング期の3つのステージが存在し、これらの過程が時間的・空間的に重なり合って治癒へと向かう。このうち、仮骨形成期には2つの異なる治癒様式が存在する。一つは、直接骨形成が生じる膜性骨化、もう一つは、軟骨形成を生じ、それらが骨へと置換される軟骨内骨化である。骨発生における軟骨内骨化では、Ihh が前肥大軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層に発現することが報告されており<sup>27,28</sup>、同様に、骨折モデルにおける研究でも仮骨内の前肥大軟骨細胞、肥大軟骨細胞に Ihh の発現が認められると報告されている<sup>7,29</sup>。これまでのマウス骨折モデルを用いた研究で、Hh シグナルが骨折治癒過程を促進することが報告されている。Hh の標的遺伝子である Gli1 のハプロ不全マウスを用いた骨折モデルの研究では、野生型マウスと比較して Gli1 ハプロ不全マウスの仮骨サイズが減少することが報告されている<sup>22</sup>。また、Smo を欠損させることにより Hh シグナルを不活化したマウスを用いた骨欠損モデルでは、肥大軟骨細胞周囲の細胞増殖の減少、骨芽細胞分化の減少、仮骨形

成の減少が認められた<sup>11</sup>。さらに、骨欠損モデルに対して、Hh シグナルの活性を調整する低分子化合物を投与し、その効果を検証した研究もいくつか報告されている。Hh の阻害剤である GDC-0449 をラット骨折モデルに用いると、骨折の治癒過程において骨量と骨密度は減少し、SP7 の発現も減少する<sup>30</sup>。一方、Hh の促進剤である Oxy133 をラット脊椎固定モデルに用いると、細胞培養において骨分化誘導が起こり、骨形成も影響を受ける<sup>31</sup>。本研究では、Hh 作動薬である SAG 局所投与が軟性仮骨、硬性仮骨とも有意に増大させ、仮骨形成を促進するということを示した。今回得られた結果は、前述の過去の知見を支持するものであり、さらに詳細な仮骨の領域ごとの作用について明らかにすることができた。

マウスの骨折治癒過程では、術後 14 日過ぎごろまで軟骨内骨化の軟骨形成が行われ、軟骨形成の開始から少し遅れて、新生骨形成が術後 21 日過ぎごろまで続く<sup>32</sup>。本研究では、術後 14 日目に SAG 投与群において、軟性仮骨および硬性仮骨の増加が認められた。したがって、術後 14 日目で軟性仮骨および硬性仮骨が増加したことは、仮骨形成期における骨治癒促進の可能性が考えられる。

本研究では、SAG 局所投与の骨折に対する治癒効果の詳細を解明するため、様々な角度からの解析を行った。骨発生において、Hh は軟骨細胞の増殖に寄与する働きが報告されている<sup>7</sup>。成人骨折モデルを想定した本研究においても、SAG 投与群で軟性仮骨における SOX9 陽性軟骨細胞の増加が認められ、骨折治

癒においても **Hh** が軟骨細胞増殖促進効果を有することが示唆された。

また本研究では、骨折モデルに対して **SAG** 局所投与を行うことで、骨形成が促進されることも見出した。**Smo** 遺伝子の変異により、**Hh** シグナルが恒常的に活性化されたマウスを用いた骨折モデル実験では、骨折治癒が促進することが報告されている<sup>33</sup>。さらに、骨折治癒過程における骨芽細胞において、**SHH** が骨芽細胞の増殖・分化を制御するという報告もある<sup>34</sup>。骨発生において、**Hh** シグナルは骨芽細胞の分化に重要な役割を果たすため、硬性仮骨の形成促進においても同様の機能を持つ可能性がある。そのため、**SAG** による硬性仮骨の形成促進のメカニズムは、仮骨内で **SP7** 陽性細胞の増加が認められたように、**SAG** が直接骨芽細胞前駆細胞を骨芽細胞へと分化させる効果を持つ可能性が考えられる (図 13)。また、別の可能性としては、軟骨細胞の増加が硬性仮骨の形成を軟骨内骨化の過程を介して間接的に促進したという可能性である (図 13)。近年の報告<sup>35</sup> では、軟骨細胞が骨芽細胞へと分化転換するという研究があり、軟性仮骨と硬性仮骨の境界において本現象が生じた可能性も考えられる。本現象の検証には、**Col2a1-CreERT2; 2.3-kb Col1a1-GFP; ROSA-TdTomato** マウスを作出し、**cell tracking** を行う方法が考えられる。軟性仮骨形成期にタモキシフェンを投与し、この時期に形成された軟骨細胞とそれに由来する細胞を **tdTomato** で標識した上で、その後の **GFP** を発現する骨芽細胞との一致関係を検証する。仮骨形成

初期からの軟骨細胞の運命を追うことで、SAG 投与により増加した骨芽細胞の由来を明らかにすることができると考えられる。

本研究で得られた結果は、Hh シグナルの骨折治癒初期における重要性も支持している。Ihh は、骨折後数時間で発現の上昇がみられることが報告されている<sup>10</sup>。半月板損傷の研究においても、損傷後 1 日目に Ihh のピークが認められている<sup>36</sup>。これらの先行研究と本研究から、受傷後早期の Hh シグナルの活性が骨折治癒の促進を左右すると考えられた。

以上、本研究では、術後 14 日目に着目し、仮骨形成を中心に検証を行った。しかし、術後 14 日目での評価のみにとどまったため、最終的に骨折治癒が促進されるという明らかな証拠は得られていない。今後、骨癒合の過程も含め、より長い観察期間での研究も行い、この点を明らかとする必要があると考えている。

#### 本法のさらなる改善に向けて

本研究では、骨折部において SAG に直接反応している細胞を特定するには至っていない。Hh の骨折治癒への働きを現象として検証するのみではなく、その詳細なメカニズムを解明するためには、骨折モデルにおいて、Hh 応答細胞を可視化する必要があると考えられる。具体的には、Ihh の標的遺伝子である Gli1 遺伝子座に creERT2 をノックインした、Gli1-creERT2 マウス<sup>37</sup> を使用して、本法

のプロトコールを実施する。骨折治癒過程で Hh に反応した細胞を、Cre 抗体を用いた免疫染色等で可視化することで受傷後の細胞の局在等を知ることができると考えられる。また、別の手法としては、Gli1-creERT2 と tdTomato などの Cre 依存性レポーター遺伝子をともに持つマウスにおいて、時期特異的・空間特異的なタモキシフェンの投与により、Hh 応答性の細胞を標識して、Hh 応答細胞の骨折治癒における寄与を検討する lineage tracing が考えられる。

また、本研究において、SAG 投与後の薬剤の分布範囲および効果の持続時間の検討も必要である。前述の Gli1-creERT2 マウスを用いて、SAG 投与後の Hh 応答細胞の局在を追うことにより、分布範囲および持続時間について検証することができると考えられる。さらに、仮骨形成が異常に増大するような傾向が認められれば、cyclopamine<sup>38</sup> 等の Hh 阻害剤による調整も必要となるかもしれない。

骨折の治癒過程を考える場合、血管新生も重要な因子の一つである。これまでの報告で、Hh シグナルが血管新生を促進し、その結果骨形成が促進されるという報告がある<sup>39</sup>。今回の研究では、SAG 投与によって、仮骨形成が促進することを示したが、血管新生を介して、骨折の治癒を促進している可能性も考えられる。血管マーカー等を用いた組織学的解析も SAG 投与の骨折治癒効果を検証する手段の一つとして有効であると考えられる。

また、本法では、**SAG** の単回投与による骨折治癒効果の検証を行った。**Ihh** は骨形成初期において重要な役割を果たすため、骨形成後期においても治癒効果を促進する低分子化合物等を併用投与することで、より治癒効果を高めることができるかもしれないと考えられる。**Ohba** らは、**BMP** や **Runx2** 依存性に骨芽細胞の成熟期に作用するヘリオキサンチン誘導体 (**TH**) という低分子化合物を報告している<sup>40</sup>。**Maeda** らの報告によると、ラット大腿骨骨欠損モデルに対し、**SAG** と **TH** を併用投与することで、**SAG** 単独投与より高い骨治癒効果が得られている<sup>24</sup>。**Kanke** らは、**SAG** と **TH** を併用することで、マウス **ES** 細胞や **iPS** 細胞を効率的に骨芽細胞へ分化させる手法を報告している<sup>41</sup>。**TH** は、**SAG** との併用投与で骨芽細胞の成熟を誘導し、骨折治癒効果を促進する可能性がある有用な物質の一つであると考えられる。

投与方法に関して、今回は、**Hh** シグナルが骨折後早期に活性化されているという先行研究から<sup>10</sup>、担体を用いずに早期に適正濃度で患部に作用するよう、**SAG** の注射による投与方法を用いた。しかし、**SAG** を人工骨に搭載して大腿骨骨欠損に移植した先行研究では、**SAG** の持続的な徐放による骨形成の促進を明らかにしている<sup>24</sup>。本研究の投与方法では、継続的な **SAG** の効果は得られにくいと考えられるため、担体を用いた **SAG** 徐放による骨折治癒への応用で、より高い治癒促進効果が得られる可能性も考えられる。適切な担体で、局所に効果的な作

用を及ぼす工夫が必要である。

一方、実際にヒトへの応用を考えると、**SAG** の副作用についても考慮しなければならない。ヒトにおいて、**Hh** シグナルの異常は、**Gorlin** 症候群などの先天異常、基底細胞癌<sup>42</sup>、髄芽腫<sup>43</sup>、消化管腫瘍<sup>44</sup>などを引き起こす。髄芽腫などの腫瘍細胞では、**GLI** や **PTCH** の発現の亢進が認められ<sup>43</sup>、乳癌においても、**SHH**、**GLI**、**PTCH** の発現の亢進が認められている<sup>45</sup>。したがって、**SAG** の効果を骨折部に限局的に作用させ、全身に影響を及ぼさないよう、投与方法などの工夫が必要である。また、**Hh** シグナルの異常により発癌の可能性が考えられる部位への本法の適用は難しいと考えられる。

### 本法の今後の応用について

本研究では、1回のみ**SAG**局所投与で骨折治癒過程の仮骨形成が促進された。本研究で用いた低分子化合物による骨折治癒促進は、簡便かつ低侵襲であり、今後骨折治癒の有効な治療法となる可能性があると考えられる。例えば、難治性骨折などの遷延治癒に対し、本法を応用することで仮骨形成の促進を行うことで、骨折治癒を促進できるかもしれない。また、骨折の合併症の一つとして、静脈血栓塞栓症があげられるが、日本整形外科学会のガイドライン<sup>46</sup>によると、長期臥床は静脈血栓塞栓症の中等度危険因子の一つであり、早期歩行は有効な

予防法である。先進国各国では高齢化社会を迎えており、高齢者の骨折の増加は著しい。骨折治癒を促進し、早期離床を行うことは、患者の QOL の向上および医療費の削減にも有効であり、本法はこれらの社会問題の解決にも貢献しうるかもしれない。

図13

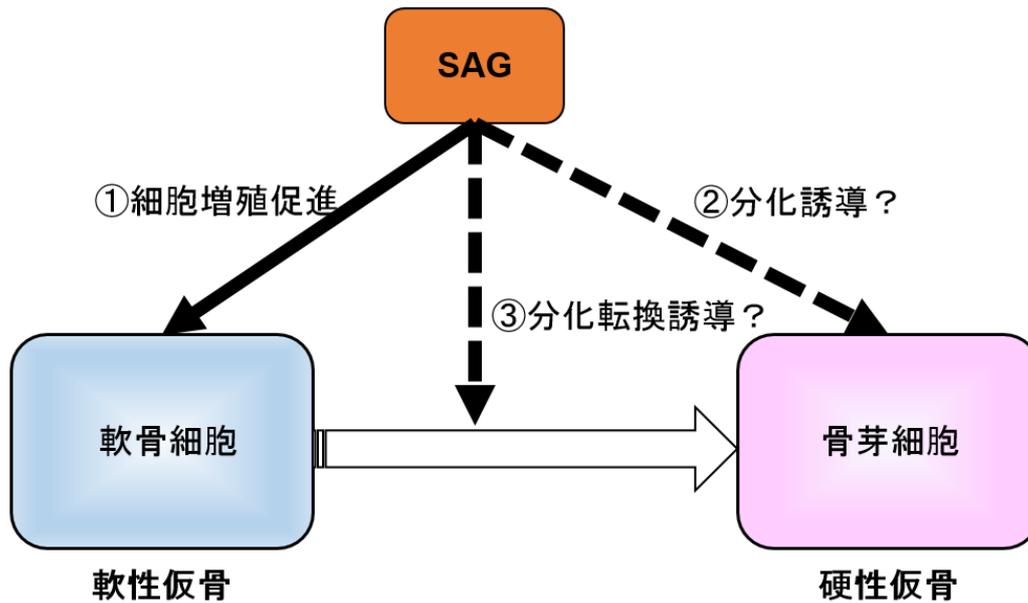


図13 : SAG が仮骨形成に及ぼす影響の概略図

SAG は軟性仮骨および硬性仮骨の両方に作用する。軟性仮骨に対しては、軟骨細胞の増殖を促進し、軟骨形成に寄与する。硬性仮骨に対しては、直接骨芽細胞前駆細胞に作用して骨芽細胞の分化を促進する、もしくは増殖した軟骨細胞を分化転換誘導した結果、骨芽細胞が増加すると考えられる

## 謝辞

本研究は、東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門にて行いました。本研究を行う機会を与えて下さり、4年間にわたり御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科 感覚・運動機能医学講座 口腔外科分野 高戸毅教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行において、その立案から実験方法および論文作成にわたって終始、直接親身に御指導並びに御鞭撻を賜りました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 鄭雄一教授、大庭伸介特任准教授に心より感謝申し上げます。また、御懇篤な御指導と貴重な御助言を賜りました東京大学工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 北條宏徳博士、北浦義昭博士、Hailati Aini 博士、東京大学医療イノベーションイニシアティブ 前田祐二郎特任助教に謹んで感謝申し上げます。

最後に医学系研究科臨床医工学部門において共に研究し、実験の技術指導と貴重な御助言を賜りました諸先生方、研究室の皆様に深謝致します。

## 参考文献

- 1 須田立雄、小澤英浩、高橋榮明、新 骨の科学 第2版、医歯薬出版株式会社、279-285 (2016).
- 2 Ferguson, C., Alpern, E., Miclau, T. & Helms, J. A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mechanisms of development* **87**, 57-66 (1999).
- 3 松本歯科大学大学院 硬組織研究グループ、Hard Tissue 硬組織研究ハンドブック、松本歯科大学出版会、46-47 (2008).
- 4 Kugimiya, F. *et al.* Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 35704-35712 (2005).
- 5 Kawaguchi, H. *et al.* A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Bone and Mineral Research* **25**, 2735-2743 (2010).
- 6 Holzer, G., Majeska, R. J., Lundy, M. W., Hartke, J. R. & Einhorn, T. A. Parathyroid hormone enhances fracture healing. A preliminary report. *Clinical orthopaedics and related research*, 258-263 (1999).
- 7 Vortkamp, A. *et al.* Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mechanisms of development* **71**, 65-76 (1998).
- 8 Dishowitz, M. I. *et al.* Systemic inhibition of canonical Notch signaling results in sustained callus inflammation and alters multiple phases of fracture healing. *PLoS One* **8**, e68726 (2013).
- 9 Chen, Y. *et al.* Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS medicine* **4**, e249 (2007).
- 10 Ito, H. *et al.* Hedgehog signaling molecules in bone marrow cells at the initial stage of fracture repair. *Biochemical and biophysical research communications* **262**, 443-451 (1999).
- 11 Wang, Q., Huang, C., Zeng, F., Xue, M. & Zhang, X. Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair. *American Journal of Pathology* **177**, 3100-3111 (2010).
- 12 Ohba, S. Hedgehog Signaling in Endochondral Ossification. *Journal of Developmental Biology* **4**, 20 (2016).
- 13 Nusslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and

- polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801 (1980).
- 14 Long, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 27-38 (2012).
- 15 Ohba, S. & Chung, U. I. PTHrP Action on Skeletal Development: A Key for the Controlled Growth of Endochondral Bones. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* **12**, 130-141 (2014).
- 16 St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. & McMahon, A. P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Development* **13**, 2072-2086 (1999).
- 17 Ingham, P. W. & McMahon, A. P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development* **15**, 3059-3087 (2001).
- 18 Rodda, S. J. & McMahon, A. P. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* **133**, 3231-3244 (2006).
- 19 Long, F. *et al.* Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* **131**, 1309-1318 (2004).
- 20 Ohba, S. *et al.* Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Developmental cell* **14**, 689-699 (2008).
- 21 Mak, K. K. *et al.* Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression. *Developmental cell* **14**, 674-688 (2008).
- 22 Kitaura, Y. *et al.* Gli1 haploinsufficiency leads to decreased bone mass with an uncoupling of bone metabolism in adult mice. *PLoS One* **9**, e109597 (2014).
- 23 Joeng, K. S. & Long, F. Constitutive activation of Gli2 impairs bone formation in postnatal growing mice. *PLoS One* **8**, e55134 (2013).
- 24 Maeda, Y. *et al.* Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials* **34**, 5530-5537 (2013).
- 25 Suen, P. K. *et al.* Sclerostin monoclonal antibody enhanced bone fracture healing in an open osteotomy model in rats. *Journal of Orthopaedic Research* **32**, 997-1005 (2014).
- 26 Ogi, H. *et al.* Ventral abdominal wall dysmorphogenesis of Msx1/Msx2 double-mutant mice. *Anatomical Record Part A Discoveries Molecular Cell Evolutionary Biology* **284**, 424-430 (2005).
- 27 Vortkamp, A. *et al.* Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science (New York, N.Y.)* **273**, 613-622 (1996).
- 28 Chung, U. I., Schipani, E., McMahon, A. P. & Kronenberg, H. M. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone

- development. *Journal of Clinical Investigation* **107**, 295-304 (2001).
- 29 Murakami, S. & Noda, M. Expression of Indian hedgehog during fracture healing in adult rat femora. *Calcified tissue international* **66**, 272-276 (2000).
- 30 Kazmers, N. H., McKenzie, J. A., Shen, T. S., Long, F. & Silva, M. J. Hedgehog signaling mediates woven bone formation and vascularization during stress fracture healing. *Bone* **81**, 524-532 (2015).
- 31 Montgomery, S. R. *et al.* A novel osteogenic oxysterol compound for therapeutic development to promote bone growth: activation of hedgehog signaling and osteogenesis through smoothed binding. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **29**, 1872-1885 (2014).
- 32 Cassandra A. Strohbach, Donna D. Strong and Charles H. Rundle. Gene Therapy Applications for Fracture Repair, Gene Therapy Applications, InTech (2011) Available from: <http://www.intechopen.com/books/gene-therapy-applications/gene-therapy-applications-for-fracture-repair>.
- 33 Baht, G. S., Silkstone, D., Nadesan, P., Whetstone, H. & Alman, B. A. Activation of hedgehog signaling during fracture repair enhances osteoblastic-dependent matrix formation. *Journal of Orthopaedic Research* **32**, 581-586 (2014).
- 34 Horikiri, Y. *et al.* Sonic hedgehog regulates osteoblast function by focal adhesion kinase signaling in the process of fracture healing. *PLoS One* **8**, e76785 (2013).
- 35 Zhou, X. *et al.* Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS genetics* **10**, e1004820 (2014).
- 36 Horie, M. *et al.* Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **20**, 1197-1207 (2012).
- 37 Ahn, S. & Joyner, A. L. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* **118**, 505-516 (2004).
- 38 Hojo, H. *et al.* Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 9924-9932 (2013).
- 39 Rivron, N. C. *et al.* Sonic Hedgehog-activated engineered blood vessels enhance bone tissue formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 4413-4418 (2012).
- 40 Ohba, S. *et al.* A novel osteogenic helioxanthin-derivative acts in a BMP-dependent manner. *Biochemical and biophysical research communications* **357**,

- 854-860 (2007).
- 41 Kanke, K. *et al.* Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem cell reports* **2**, 751-760 (2014).
- 42 Hahn, H. *et al.* Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* **85**, 841-851 (1996).
- 43 Dahmane, N. *et al.* The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* **128**, 5201-5212 (2001).
- 44 Berman, D. M. *et al.* Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* **425**, 846-851 (2003).
- 45 Kubo, M. *et al.* Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer research* **64**, 6071-6074 (2004).
- 46 日本整形外科学会肺血栓栓症／深部静脈血栓症（静脈血栓栓症）予防ガイドライン改訂委員会、日本整形外科学会、静脈血栓栓症ガイドライン、南江堂 (2008).