

博士論文

骨の恒常性維持に於けるヘッジホグーGli1 シグナルの 役割に関する研究

北浦 義昭

骨の恒常性維持に於けるヘッジホグーGli1 シグナルの役割に関する研究

所属 東京大学大学院医学系研究科博士課程外科学専攻

指導教員名 高戸 毅

申請者 北浦義昭

要旨

胎生期の器官形成に重要な役割を果たすことで知られるヘッジホグ（Hh）シグナルは、胎生期の骨形成に関する多くの研究に対して、成体に於ける役割については解明が不十分である。特に Hh シグナルの転写因子の 1 つである Gli1 の役割については未知な部分が多い。そこで、本研究では、Gli1 に注目し、成体の骨恒常性維持に於ける Hh-Gli1 シグナルの役割を明確にすることを目的とした。その結果、生理的及び病的状態下共に Hh-Gli1 は骨の恒常性維持に大きな役割を果たしていることを確認した。さらに、Hh-Gli1 は骨芽細胞の初期分化を促進し、骨細胞への分化を抑制する作用があり、骨芽細胞と破骨細胞のカップリング反応にも関与していることを明らかにした。本研究で得られた知見は、成人の骨関連疾患の治療や予防戦略の分子基盤となるものである。

目次

序文	p5~
第1章 生理的条件下に於けるマウスの骨の恒常性維持に対する Gli1 欠損の影響に関する検討	p12~
1-1 材料と方法	
1-1-1 動物	
1-1-2 遺伝子型判定	
1-1-3 放射線学的解析	
1-1-4 組織学的解析	
1-1-5 統計学的解析	
1-2 結果	
1-2-1 Gli1 欠損マウスの作製	
1-2-2 骨の表現型の放射線学的評価	
1-2-3 骨の表現型の組織学的評価	
1-3 小括	
第2章 病的条件下（骨折モデル）に於けるマウスの骨の恒常性維持に対する Gli1 欠損の影響に関する検討	p24~
2-1 材料と方法	
2-1-1 マウス脛骨骨折モデルの作製	
2-1-2 放射線学的解析	
2-1-2-1 軟X線システム	
2-1-2-2 マイクロ CT システム	
2-1-3 組織学的解析	
2-2 結果	
2-2-1 骨折の回復過程の放射線学的評価	
2-2-2 骨折部の回復過程の組織学的評価	
2-3 小括	
第3章 骨芽細胞の分化・成熟に対する Gli1 欠損の影響に関する検討	p37~
3-1 材料と方法	
3-1-1 細胞培養	
3-1-2 Real time RT-PCR	
3-1-3 染色	
3-1-4 アデノウイルスベクターの作製	

3-1-5	レポーターアッセイ	
3-1-6	Western blotting	
3-2	結果	
3-2-1	骨芽細胞の分化能に対する Gli1 欠損の影響	
3-2-2	骨芽細胞の分化、成熟に対する Gli1 強制発現効果	
3-3	小括	
第 4 章	破骨細胞の分化・成熟に対する Gli1 欠損の影響に関する検討	p52~
4-1	材料と方法	
4-1-1	細胞培養	
4-1-2	Real time RT-PCR	
4-1-3	染色	
4-2	結果	
4-2-1	破骨細胞の分化に対するヘッジホッグシグナルの影響	
4-2-2	破骨細胞の分化、成熟に対する Gli1 欠損の影響	
4-2-3	共培養下に於ける破骨細胞分化に対する Gli1 欠損の影響	
4-2-4	骨芽細胞の破骨細胞分化支持能に対する Gli1 欠損の影響	
4-3	小括	
第 5 章	アデノウイルスベクターを用いた Gli1 の強制発現による骨折モデルの回復過程に対する効果に関する検討	p65~
5-1	材料と方法	
5-1-1	骨折モデルに於けるアデノウイルスベクター投与法	
5-1-2	放射線学的解析	
5-1-3	組織学的解析	
5-2	結果	
5-2-1	骨折モデルの回復過程に対する Gli1 強制発現効果の放射線学的評価	
5-2-2	骨折モデルの回復過程に対する Gli1 強制発現効果の組織学的評価	
5-3	小括	
第 6 章	考察	p73~
謝辞		p80~
参考文献		p81~

序文

ヘッジホッグシグナル (Hedgehog, Hh) は、ショウジョウバエの体節極性遺伝子 (segment-polarity gene) として発見されたが[1]、昆虫だけでなく、線虫、ウニから脊椎動物に至るまで、動物種を越えて高度に保存されており、細胞の運命決定や器官形成に重要な役割を果たす胎生期に不可欠のパラクライン因子である。

この特殊な名前の由来は、Hh に変異を生じたショウジョウバエの幼虫の形態が図 1 に示すようにハリネズミを連想させることに由来する。ショウジョウバエのヘッジホッグは 1 種類しか存在しないが、哺乳類では、デザートヘッジホッグ (Dhh)、ソニックヘッジホッグ (Shh)、インディアンヘッジホッグ (Ihh) の 3 種のリガンドが存在する[2]。Dhh は精子形成や神経鞘の発生に関与し、Shh は体節、四肢のパターンニング、毛髪、歯、肺、腸などの多岐に亘る形態形成に関与する。Ihh は内軟骨性骨化に重要な役割を示すことが知られている[3]。Ihh は前肥大軟骨細胞に発現し、軟骨膜や骨髄に存在する骨芽細胞の前駆細胞に直接作用し、骨芽細胞への分化を誘導する[4-8]。Ihh の欠損や、Hh シグナルの伝達に関わる膜タンパク smoothend (Smo) の欠損による骨殻や一次海綿骨の形成不全が報告されている[5,7]。

また本年度 (2014 年 7 月) にトルコで発見されて話題となった単眼のヒツジ (図 2) も Hh の作用に起因する。眼の形成は、前神経ヒダ上に帯状に発現した Pax6

が眼形成領域を示し、その中央部に向かって、脊索前板から発現した Shh によって Pax2 が発現し、眼形成領域を左右に二分することによって二つの眼球が形成される[9]。単眼のヒツジは、妊娠初期に Hh シグナルを阻害する成分、シクロパミンというアルカロイドを含むバンケイソウという植物を母ヒツジが食したため、胎生期に Hh シグナルが阻害され、先天異常として発生したと考えられる。他の動物では、Hh が阻害された場合、その影響が大きく出生前後で死亡するが、ヤギやヒツジの場合、重篤な発達異常を持ちながらも生存することがあるため大きな話題となったと考えられる。前述のトルコで発見された単眼のヒツジの異常は、当然の如く眼だけに留まらず、四肢の発育異常や、頭蓋形態異常、脳神経異常など多岐に亘る。

以上のようにヘッジホッグファミリーは発生の各段階で発達、成長に必須の中心的役割を担っているが、その Hh シグナル伝達は、Hh リガンドが 12 回膜貫通型の膜タンパク受容体、Patched (Ptch) に結合することにより開始する。脊椎動物に於いては、定常状態では、Ptch が細胞の 7 回膜貫通タンパクである G タンパク共役受容体に属する Smo の作用を抑制しているため、Hh シグナルの転写因子である Gli は PKA (protein kinase A) GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β)、及び CK1 (casein kinase 1) によってリン酸化される。この結果、 β -TrCP

(beta-transducin repeat containing protein) と結合し、SCF ユビキチン複合体によってプロセシングを受けて C 末端側が欠落した抑制型となり、核内移行後、標

的遺伝子の転写を抑制する。このような Gli のプロセッシングによる作用機序は Gli3 において明らかになっている。一方、Hh リガンドが Ptch に結合すると、Smo は C 末端がリン酸化されて細胞膜上に移行し、この結果、SuFu (Supressor of Fused) と複合体を形成して微小管に結合していた Gli は、リン酸化された SuFu から遊離してプロセッシングを受けずに全長型のまま活性型として核内に移行し、標的遺伝子の転写を促進させる (図 3)。ここで、Hh シグナルの転写因子 Gli ファミリーには Gli1、Gli2、Gli3 の 3 種があり、Gli1 は Hh シグナルの標的遺伝子の一つであり、プロセッシングは受けず、活性型としてのみ作用すると考えられている。一方、Gli2 と Gli3 は活性型と抑制型があると考えられている[2]。

さらに、Gli ファミリーの中でも、Gli2 の活性型としての作用や Gli3 の抑制型としての作用が骨格の形成に不可欠であることが Long 等によって示されている [10,11]。一方、Gli1 については 2000 年に発生、発達、成長に不可欠ではないという報告[12]があったことから、Gli ファミリーの中でも検討が遅れていた。しかし、北條等により、Gli1 も Gli2 および Gli3 と共同で骨芽細胞の分化に寄与していることが示された[13,14]。

さらに、大庭等による Ptch のヘテロ KO マウスの研究[15]により、骨の恒常性維持にも Hh シグナルが大きく関与し、成体での骨の表現型に差を生じるだけでなく、ヒトにおける病因になることが明らかになっている。しかし、依然として Hh

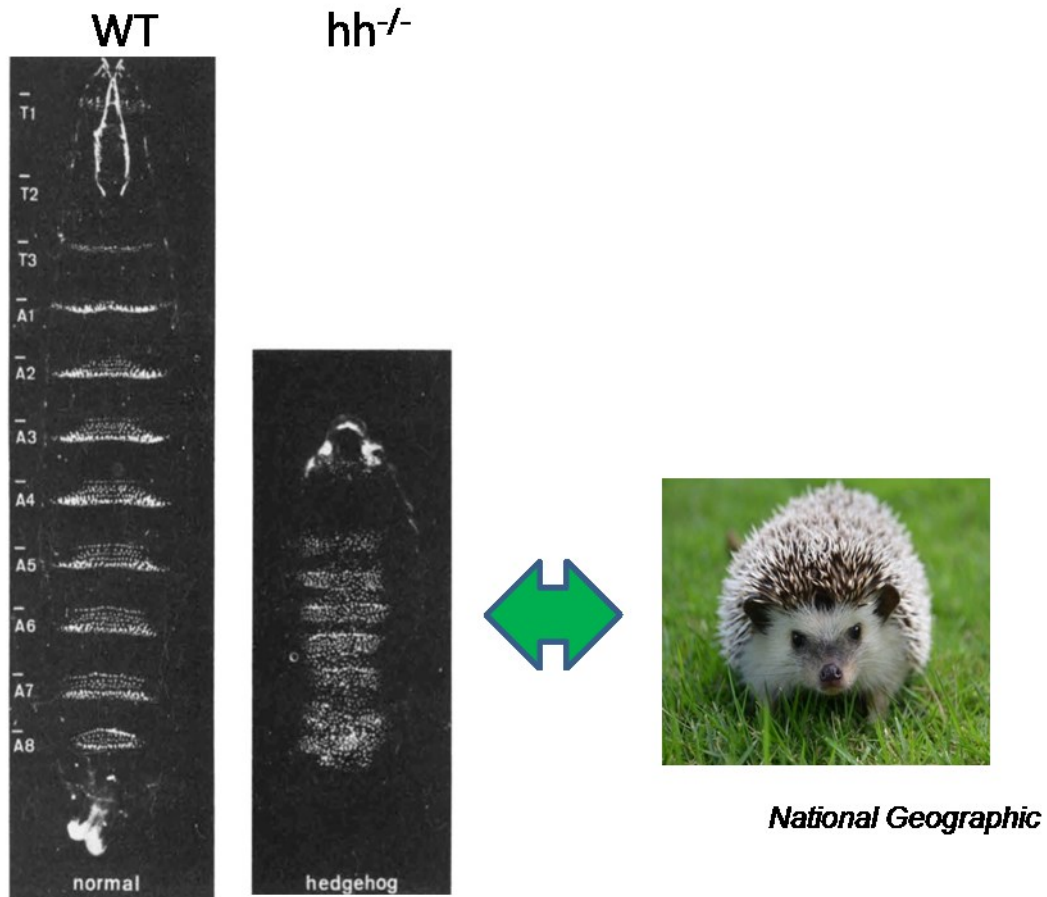
シグナルの役割については、胎生期の骨形成に関してはよく調べられているのに対して、成体に於ける役割については未だ解明が不十分である。特に成体の骨恒常性維持に於ける Gli1 の役割については未知な部分が多い。

そこで、本研究では、Gli1 に注目し、成体の骨恒常性維持に於ける Hh-Gli1 シグナルの役割を明確にすることを目的に検討することとした。

第 1 章では、Gli1 遺伝子欠損マウスを作製して生理的条件での成体マウスの骨の表現型を検討した。さらに、第 2 章では、マウス骨折モデルを用いてその治癒過程を評価することによって、病的条件下に於ける、Hh-Gli1 シグナルの影響を検討した。第 3 章以降では、第 1 章、及び第 2 章で得られた *in vivo* での観察結果の原因解析を目的として検討した。第 3 章では、骨の恒常性維持の中で、骨形成能の重要な要素である骨芽細胞の分化、成熟について検討し、第 4 章では、骨吸収能の重要な要素である破骨細胞の分化、成熟について検討した。第 5 章では、第 1 章～第 4 章の検討結果を基に、アデノウイルスベクターを用いた Gli1 の強制発現による骨表現型への効果を、マウス骨折モデルを用いて検証した。

図1

ショウジョウバエの幼虫
(腹側表皮の形態)



Nüsslein-Volhard C and Wieschaus E
Nature 287:795, 1980

図1 ヘッジホッグの語源となったショウジョウバエの幼虫の形態

ショウジョウバエの孵化1日目の幼虫の形態を示している。ある体節遺伝子が完全欠損したショウジョウバエでは、WTと比べて成長不全により体長が短く、このため腹側表皮の体節が詰まった形態となっている。この形態がハリネズミのハリの形態に似ていることから、本遺伝子をヘッジホッグと命名された。

図2

(A)



Seeing really is believing with this jaw-dropping video showing the shock arrival of a cyclops sheep.

The one-eyed lamb left a Turkish farmer completely dumb-founded when he realised the amazing animal's face had mutated into one giant eye.

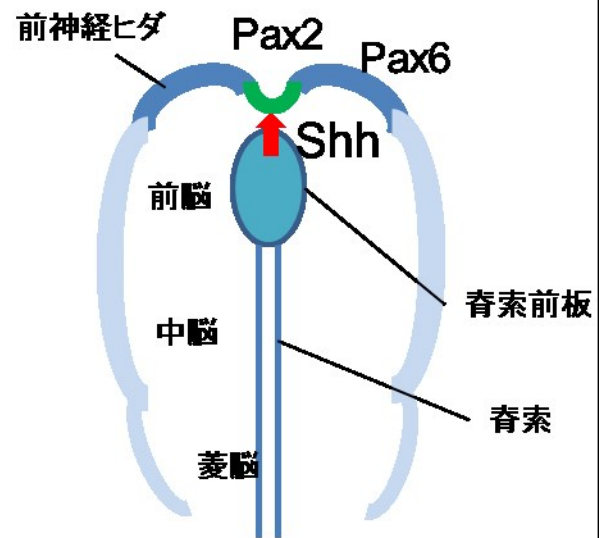
In the incredible clip, the fluffy newborn bleats and baas as the farmer presents its unbelievable facial features to the camera.

He then encourages the tiny lamb to walk - a tricky balancing act for any mythical creature.

But it's a step too far for the shaky newborn as it falls to the ground.

The Daily Mirror(UK) 26-07-2014

(B)



NATURE · VOL 383 · 3 OCTOBER 1996

Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function

Langman 人体発生学(メディカルサイエンス)

図2 ヘッジホッグ欠損による表現型への影響の例(単眼症)

(A) は 2014 年 7 月にトルコで発見された単眼のヒツジを紹介した記事。母親ヒツジが妊娠初期にシクロパミンというアルカロイドを含むユリ化の植物バンケイソウを食した結果、先天異常となって誕生したと考えられる。

(B) はソニックヘッジホッグの作用による正常な両眼形成状態を示す。ヘッジホッグが障害されると、脊索前板から前神経ヒダに対して Shh が作用せず、この結果、Pax6 の中央部に Pax2 が発現できない。Pax6 は眼房の形成を制御しているため、Pax2 によって 2 分されない場合、(A) のような中央部全面に亘る大きな単眼が形成される。

図3

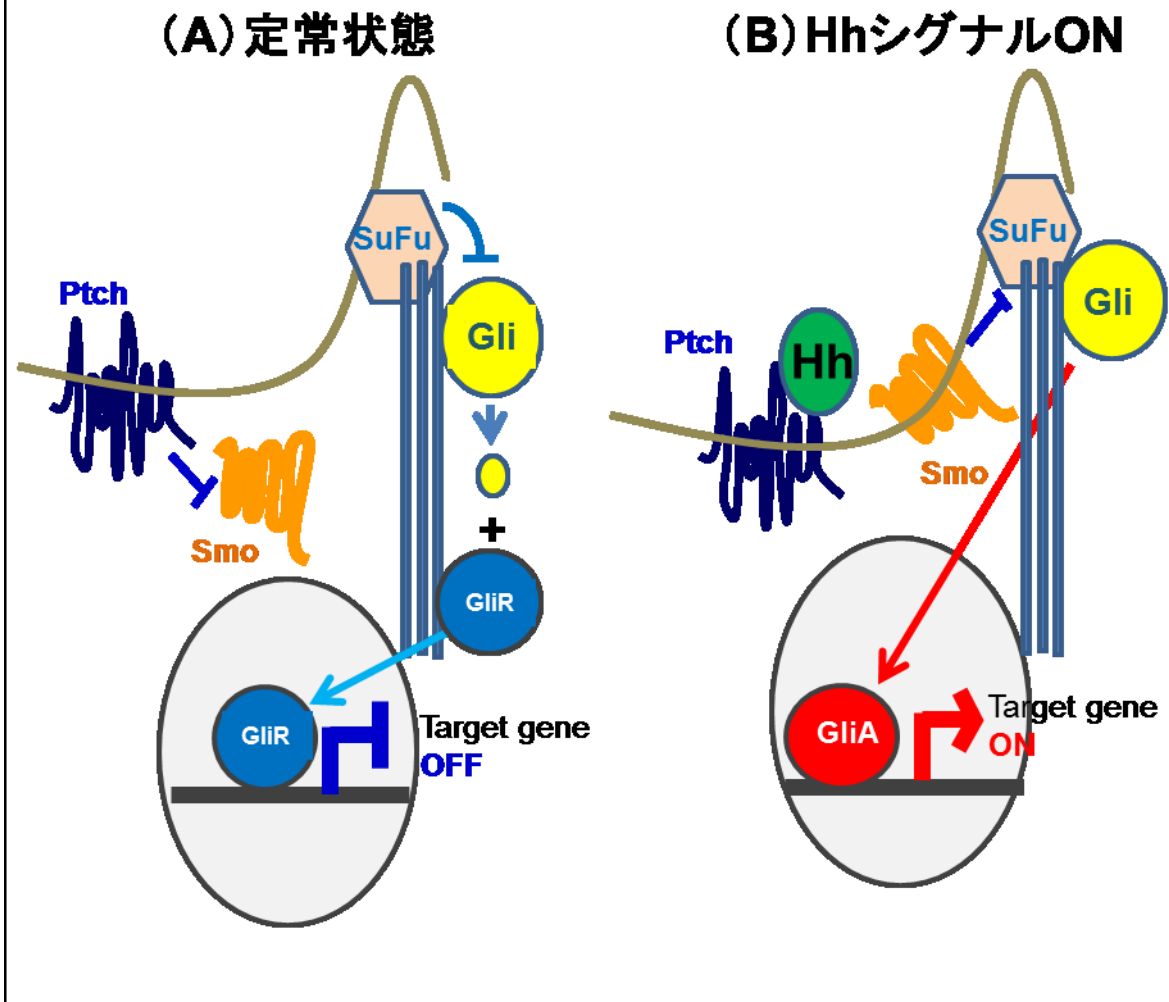


図3 Hh シグナル伝達のモデル図

(A) 定常状態では、細胞膜上の受容体 Ptch は Smo の活性を抑制している。この為、SuFu が Gli を抑制し、ユビチキン複合体の標的となる。この結果、プロセッシングを受けて不活性型となった Gli は核内に移行し、標的遺伝子の転写を抑制する。

(B) Hh リガンドが Ptch に結合し、Hh シグナルが ON になると、Smo はリン酸化されて細胞膜上に移動し、SuFu をリン酸化する。リン酸化された SuFu は Gli との相互作用が減弱し、Gli は完全長（活性型）のまま核内に移行し、標的遺伝子の転写を促進する。

第 1 章

生理的条件下に於けるマウスの骨の恒常性維持に対する Gli1 欠損の影響に関する検討

1 - 1 材料と方法

1 - 1 - 1 動物

すべての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（総理府告示）」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って作成したプロトコールを東京大学動物実験委員会の承認（承認番号 医-H14-060）を得て行った。C57BL/6 マウスは日本チャールズリバーより購入した。*Gli1*^{+/-}マウスは熊本大学の山田源先生より頂いた。

1 - 1 - 2 遺伝子改変マウスの遺伝子型判定（ジェノタイピング）

ジェノタイピングの為に、マウスの後肢の指の一部を採取し、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、2.5 mM MgCl₂、0.45% NP-40、0.45% Tween-20、200 µg/mL Proteinase K (Wako) を含むバッファー中で採取した組織を 56°C で 16 時間消化した。その後 85°C で 10 分間の熱処理により酵素を失活させた。次に、15,000 rpm、20 分間遠心分離し、上清からフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿

を行いゲノムを抽出した。得られた DNA を用いて PCR で増幅した後、電気泳動により遺伝子型を判別した。解析に用いたプライマーの配列を表 1 に示す。

1-1-3 放射線学的分析

卓上型マイクロ CT システム (SMX-90CT (島津製作所)) を用いて手術した脛骨のマイクロ CT 撮影を行った。撮影条件は、管電圧 90 kV、管電流 110 μ A、ビュー数 1200、アベレージ数 4、スキャン回数 1、画素サイズ 512 \times 512 pixels、スケールリング係数 50、スライス厚 1 μ m。撮影したマイクロ CT データを 3 次元画像解析ソフト TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング) を用いて解析した。

解析領域は、骨形態計測と一致させるため、8 週齢オスマウスの大腿骨の遠位成長板軟骨から 0.6 mm の一次海綿骨領域を除外した位置を基準に、近位方向に 1.5 mm までの二次海綿骨領域とした。

本解析領域に於いて、骨密度 bone mineral density (BMD)、単位骨量 bone volume/tissue volume (BV/TV)、骨梁幅 trabecular thickness (Tb.Th)、骨梁数 trabecular number (Tb.N) を定量的に計測評価した。

骨密度に関しては、マイクロ CT による撮影日に、7 種の濃度の異なるハイドロキシアパタイト混合ファントム及びアルミ棒の測定 (BMD 値 200~1550 相当) を行い、得られた CT 値から最小二乗法で作成した検量線に基づいて算出した。単位

骨量や、骨梁幅や、骨梁数も、本検量線に基づいて皮質骨と海綿骨部を分離抽出し、その上で、上記解析領域に於ける平均値として算出した。評価したサンプル数は、体重による骨量への影響を避けるため、8 週齢で且つ体重が 27g~28g のマウスを選抜し、WT マウス、Gli1 ヘテロマウス共に 8 である。

1 - 1 - 4 組織学的解析

WT と *Gli1*^{+/-} の 8 週齢のオスマウスの各 5 匹 (計 10 匹) を安楽死させる 4 日前と前日の 2 回、カルセイン (Sigma) を 0.16 mg/10 g 体重の割合で腹腔内投与した。安楽死はペントバルビタールの腹腔内過剰投与により実施し、大腿骨を採取し評価した。採取した大腿骨を 4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液中で一晩固定した。

A. von Kossa 染色

5%硝酸銀 (和光純薬) 水溶液で 1 時間、間接光を反応、染色した。還元・定着は 5%チオ硫酸ナトリウム (和光純薬) を用いて 5 分間処理した後、水洗した。

B. toluidine blue 染色

0.05%トルイジンブルー溶液 (pH 4.1) (和光純薬) で 30 分間染色した。

C. TRAP 染色

N, N-dimethyl formamide (和光純薬) 中の naphtol AS-MX phosphate (Sigma) を基質として用いて、酒石酸存在下 (pH5) で行った。

撮影は Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Jena) で観察後、Axio Vision (Carl Zeiss) で画像を取得した。骨形態計測は HistometryRT CAMERA (システムサプライ) を用いて実施した。

1 - 1 - 5 統計学的解析

実験結果は平均値±標準偏差として表記した。Factorial analysis of variance (ANOVA) で比較し、有意差検定に Tukey 法を用いた post-hoc テストにて行った。

1 - 2 結果

1 - 2 - 1 Gli1 欠損マウスの作製

まず $Gli1^{-/-}$ マウス作製を目的に $Gli1^{+/+}$ オスマウスと $Gli1^{+/+}$ メスマウスを交配させた結果を表 2 に示す。生後 1 日のマウスの遺伝子型の割合は、ほぼメンデルの法則に従っているが、 $Gli1^{-/-}$ マウスは生後 1 週間～10 日の間の生存率が低く、生後 10 日の時点で生存しているマウスの遺伝子型の割合は $Gli1^{-/-}$ マウスが大きく低下して 10%以下となった。

図 4A に 8 週齢に達した wild-type (WT) と $Gli1^{+/+}$ と $Gli1^{-/-}$ の外観を示す。 $Gli1^{+/+}$ マウスは WT と同等の体長、外観を持っているが、 $Gli1^{-/-}$ マウスは両者に

比べてかなり小さいことが分かる。さらに、図 4B に各遺伝子型マウスの成長曲線を示すが、 $Gli1^{+/-}$ が WT と同等の成長を示すのに対して、 $Gli1^{-/-}$ では体重が約 20% 小さいことが分かった。

以上の結果は、 $Gli1^{-/-}$ では $Gli1$ の完全欠損による全身的影響が大きいことを示唆していることから、骨の恒常性維持に対する $Gli1$ 欠損の影響評価は、外観や体重が WT とほぼ同等の $Gli1^{+/-}$ マウスを使用することにした。従って、以下のデータは全て $Gli1^{+/-}$ マウスと WT マウスとの比較によるものである。

1 - 2 - 2 骨の表現型の放射線学的評価

図 5A にマイクロ CT 観察による 8 週齢の WT と $Gli1^{+/-}$ のオスマウスの大腿骨の縦断面、横断面、海綿骨の 3 次元画像の典型例を示す。WT に比べて、 $Gli1^{+/-}$ マウスは明らかに海綿骨量が減少していることが分かる。

この傾向はマイクロ CT データを用いた定量的評価で、より明確に確認された。

(図 5B)。WT 及び $Gli1^{+/-}$ マウス各 8 匹の定量的解析結果によれば、BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N という骨量を示す全ての主要な評価項目において、 $Gli1^{+/-}$ マウスは WT と比べて統計的有意差のある低下を示した。

1 - 2 - 3 骨の表現型の組織学的評価

図 6A に 8 週齢のマウスの大腿骨遠位端の組織学的分析結果を示すが、von Kossa 染色の結果から、*Gli1*^{+/-} マウスでは WT と比べて明らかに海綿骨量が低下していることが分かる。しかし、図 6A 右図の toluidine blue 染色の結果から、成長板自体には特に異常は認められない。

また、形態計測から得られた骨量に関する評価結果もマイクロ CT による評価結果と同様、BV/TV、Tb.Th、Tb.N 全てで *Gli1*^{+/-} マウスは低下傾向を示し、BV/TV、Tb.Th に於いては統計的有意差が得られた。

さらに、骨形成能を示すパラメータである osteoid surface/bone surface (OS/BS)、bone formation rate /bone surface (BFR)、double-labeled surface/bone surface (dLS/BS)、single-labeled surface/bone surface (sLS/BS) の全てに於いて *Gli1*^{+/-} マウスは WT に比べて低下傾向を示し、OS/BS 及び sLS/BS に於いては統計的有意差を示した。

一方、骨吸収能に関しては、図 6C に示すように TRAP 染色陽性細胞は *Gli1*^{+/-} マウスの方が高い傾向が観察され、定量的評価に於いても、骨吸収能を示すパラメータである eroded surface/bone surface (ES/BS)、number of osteoclasts/100 mm of bone perimeter (N.Oc/B.Pm)、osteoclast surface/bone surface (Oc.S/BS) の全ての項目で *Gli1* ヘテロの方が高い傾向を示し、N.Oc/B.Pm では統計的有意差が得られた。

1 - 3 小括

生理的条件下に於けるマウスの骨の恒常性維持に対する *Gli1* 欠損の影響を評価するために、WT 及び *Gli1*^{+/-} の 8 週齢のオスマウスをそれぞれ 8 匹ずつ、各左側大腿骨遠位側をマイクロ CT で評価、断面観察、3 次元画像構築及び骨量に関する定量的解析を行った。この結果、成体マウスの生理的条件下で、*Gli1*^{+/-} マウスでは明確な骨量低下を生じることが分かった。

さらに、骨の組織学的評価を行った結果、*Gli1*^{+/-} 成体マウスに於ける骨量の低下は、骨形成能の低下と骨吸収能の亢進という双方の効果によることが分かった。通常の骨では、骨形成能と骨吸収能は互いに連携したカップリング反応でバランスされているが、*Gli1*^{+/-} マウスでは、アンカップリングな骨のターンオーバーが生じて骨量が低下していることが示唆された。

図表

表 1 本研究で使したプライマー配列（遺伝子型判定用）

種	遺伝子名	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')	size(bp)
mouse	Gli1 WT	AGCTGGATATGATGGTTGGC	TGCACTTGTGTGGCTTCTCG	800
	Gli1 Mutant	ACGACGGGCGTTCCTTGC GCAGCTGTG	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATA	582

表 2 生後 10 日間に於ける Gli1KO マウスの生存率

	Actual number (%)		Expected (%)
	P1	P10	
WT	11(30.6)	37 (28.5)	25
Gli1 ^{+/-}	16 (44.4)	81 (62.3)	50
Gli1 ^{-/-}	9 (25.0)	12 (9.2)	25
Total number	36	130	100

図4

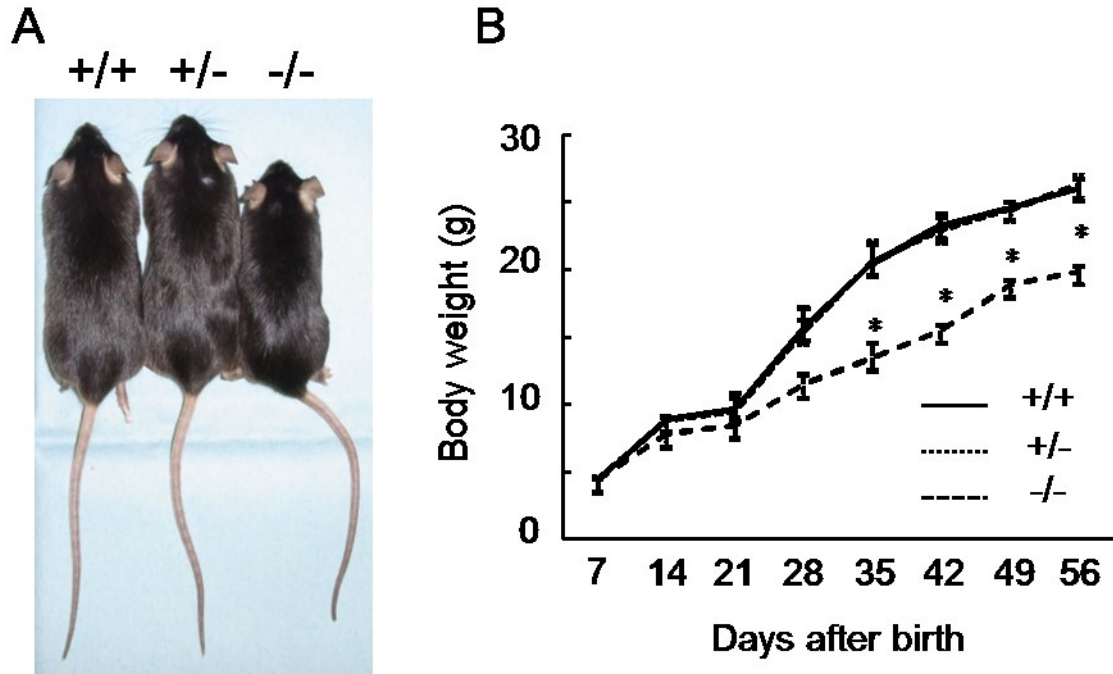


図 4 Gli1 欠損マウスの成長と外観

A 8週齢の Gli1 ホモ (-/-)、Gli1 ヘテロ (+/-) と WT (+/+) との外観の比較
形態的には大きな差異はないが、*Gli1*^{-/-} マウスは明らかに低成長で体長が約 20%短い。*Gli1*^{+/-} は WT とほぼ同等の体長、外観を有する。

B 各遺伝子型マウスの成長曲線の比較

Gli1^{-/-} マウスは生後 10 日の生存率が低い、その後の成長速度も低く、特に離乳期以降の差が顕著となり、体重は WT と比べて約 20%少なく、統計的有意差を示す。対して、*Gli1*^{+/-} マウスの成長速度は WT とほぼ同等である。

* $P < 0.05$ vs. WT and *Gli1*^{+/-}

図5

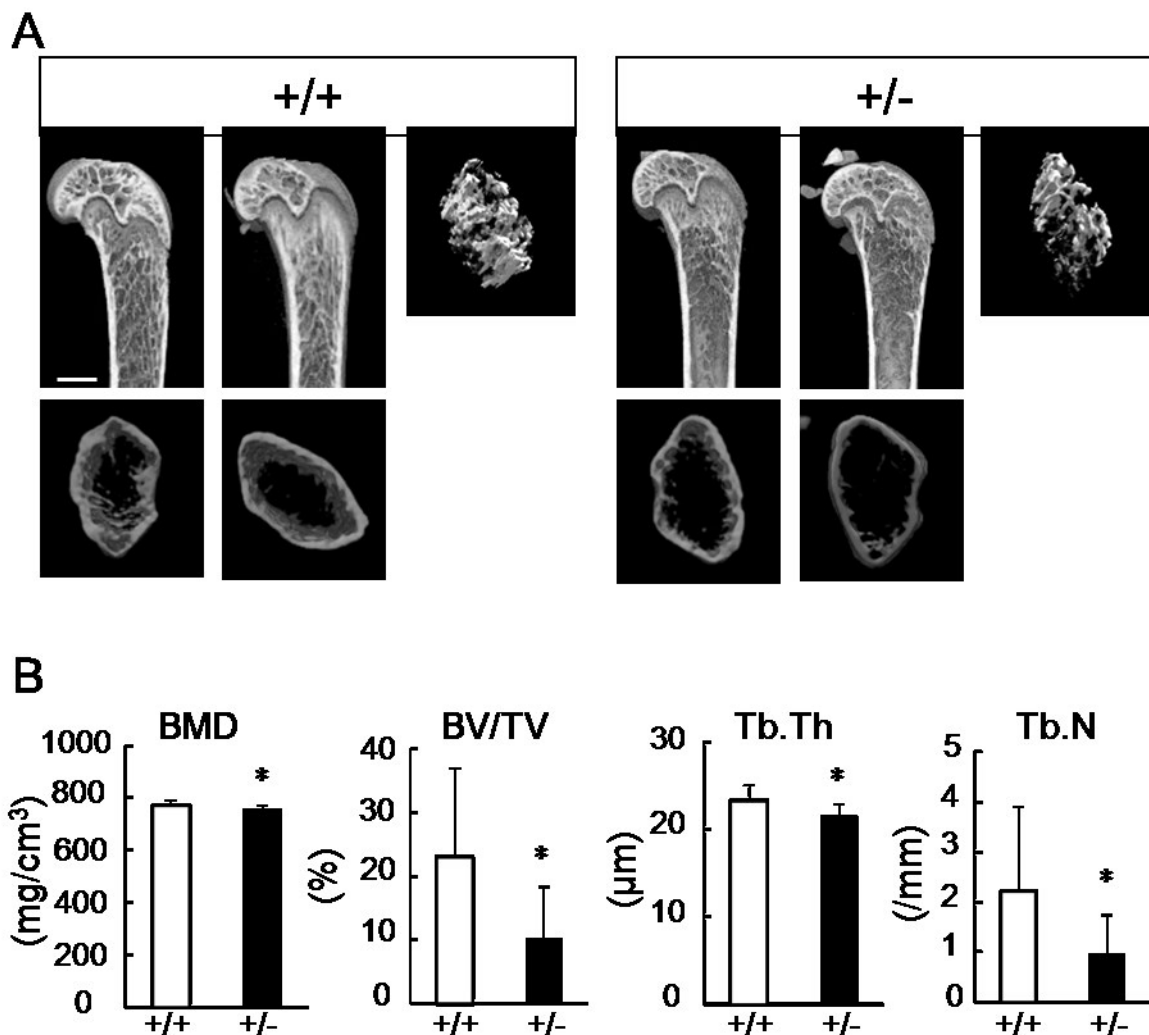


図5 WT と *Glil*^{+/-} マウスの大腿骨のマイクロ CT 観察

A 8 週齢のオスマウスの大腿骨遠位端の断面図と海綿骨の 3 次元構築画像

Bar : 1 mm

B マイクロ CT データによる骨量の定量的比較

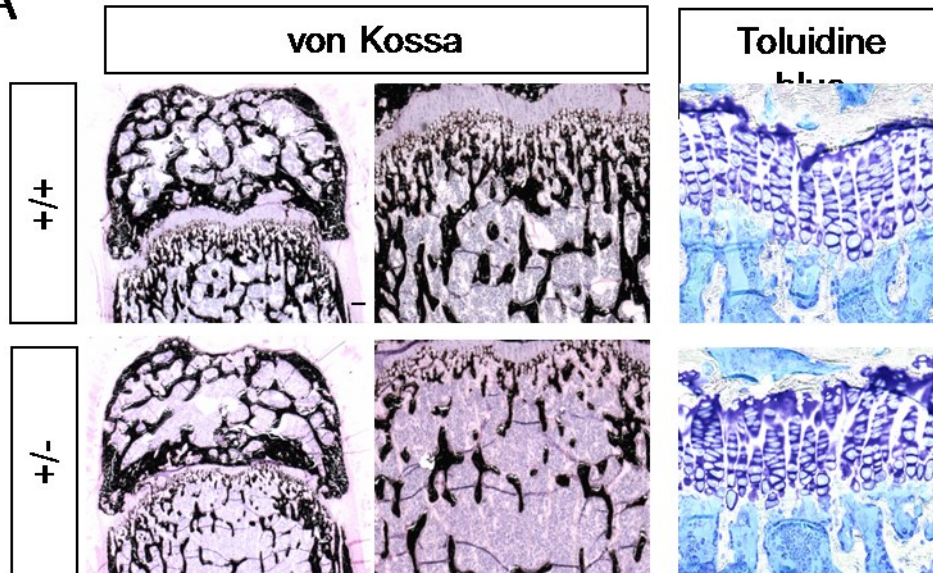
BMD : bone mineral density、BV/TV : bone volume/tissue volume、

Tb.Th : trabecular thickness、Tb.N : trabecular number parameters

* P < 0.05 vs. WT

图6

A



B

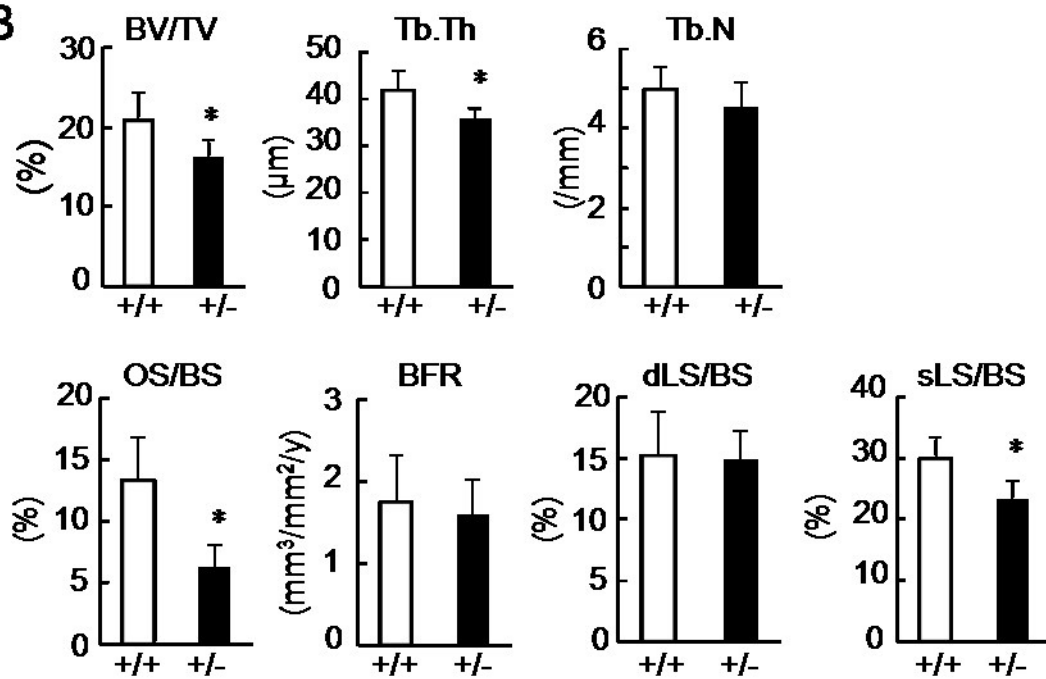
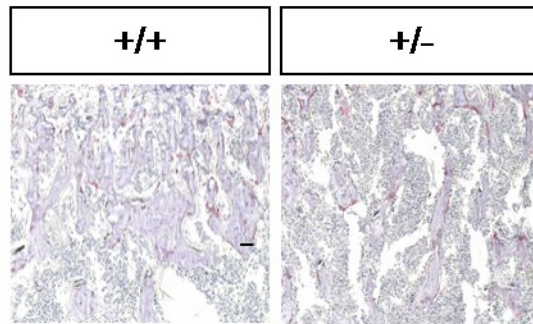


図6

C



D

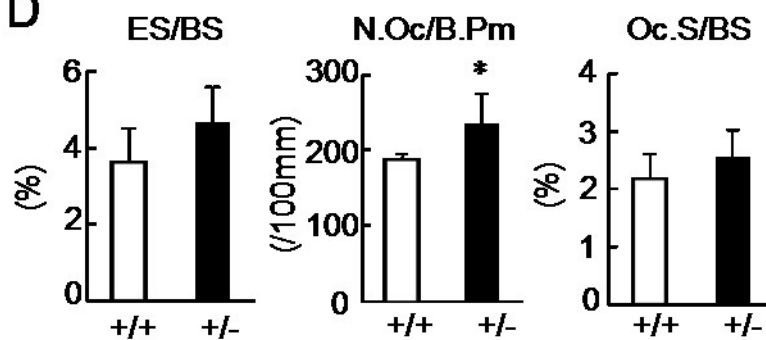


図6 WT と *Gli1*^{+/-} マウスの大腿骨の組織観察

A 8 週齢のオスマウスの大腿骨遠位端の von Kossa 染色と toluidine blue 染色
Bar : 100μm

B 骨形態計測による骨量と骨形成能の定量解析 * P<0.05 vs. WT

C 8 週齢のオスマウスの大腿骨遠位端の TRAP 染色 Bar : 100 μm

D 骨形態計測による骨吸収能の定量解析 * P<0.05 vs. WT

定量解析のサンプル数は WT、Gli1 ヘテロ共に n=5、組織観察像は各遺伝子型の典型的例を示している。

第 2 章

病的条件下（骨折モデル）に於けるマウスの骨の恒常性維持 に対する Gli1 欠損の影響に関する検討

2 - 1 材料と方法

2 - 1 - 1 マウス脛骨骨折モデルの作製

過去の骨折モデルに関する文献[16]を参考に、より安定性の高いマウス脛骨骨折モデルを新規に構築した。

イソフルレン吸入麻酔下において術野周囲を剃毛、脛骨前面に縦に約 15 mm の皮膚切開を入れ、脛骨全体を展開する。脛骨後面の筋膜を小切開し、鋭匙の先端で脛骨後面から筋膜を剥離、その後、鋭匙を脛骨後面と筋の間に挿入して展開を確保する。（この際、骨、骨膜を傷つけないように注意する）

次に膝蓋腱の脛骨付着部から 23 G 針を骨軸に平行に髓内に刺入し、髓内釘挿入領域を形成する。髓内釘挿入領域が形成できたら 23 G 針を抜去し、同領域に髓内釘として 23 G スパイナル針の内芯を挿入する。脛骨骨幹部中央（C57BL/6 の 8 週齢、オスの場合、膝蓋腱脛骨付着部から遠位 7 mm が目安）を骨切りするため、髓内釘として挿入している 23 G スパイナル針の内芯は、それより近位に維持しておく。

骨切りは歯科用エンジンで駆動した電着ダイヤモンドディスク（Φ16×0.3、粒度 130、NAKANISHI）で行った。骨切り時に軟組織を傷害しないように、先に脛骨背面と筋の間に挿入した鋭匙はダイヤモンドディスクのストッパーとして使用する。

骨切り完了後、脛骨近位骨片に位置する髓内釘を切断された遠位骨片まで挿入し、骨折部を固定する。骨折部の固定が良好であることを確認し、近位の刺入部で髓内釘の余分な部分をカットする。

最後に 4-0 ナイロン糸で皮膚縫合して創を閉鎖した。

図 7A に骨折モデル施術全景を、図 7B に所要道具一覧を、図 7C に一連の手術フローを示す。

術後、4 日、7 日、10 日、14 日、21 日、28 日目にペントバルビタールの腹腔内過剰投与により安楽死させ、脛骨を採取し評価した。

2-1-2 放射線学的分析

2-1-2-1 軟X線システム

軟X線システム（M-60、（株）ソフテックス）を用いて手術した左後肢を撮影した。撮影条件は二次電圧 10 kVp、二次電流 1 mA、撮影時間 2 秒で行った。本撮影によって、骨折モデルのばらつきを評価し、サンプル数の妥当性を確認した。

2-1-2-2 マイクロ CT システム

1-1-3に記載した卓上型マイクロ CT システム (SMX-90CT (島津製作所)) を用いて手術した脛骨のマイクロ CT 撮影を行った。撮影条件は、1-1-3に記載した通りである。解析も1-1-3記載の3次元画像解析ソフト TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング) を用いて実施したが、解析条件は図 8B, C に示したように、骨折線を中心に両側各 1.5 mm (トータル 3.0 mm) を解析領域として、一定以上の CT 値 (BMD 相当で約 400) の硬組織を形成された仮骨として評価した。さらに、形成された仮骨量の評価の正確を期すために、測定された評価領域の全体積から、該当領域の元の脛骨の体積を差し引いた値を仮骨体積として算出した。また、骨折線に於ける断面積も同様の方法により、骨折線に於ける全面積から脛骨面積を引いた値を仮骨断面積として算出した。

2-1-3 組織学的解析

術後 14 日の骨折治癒状態を評価するために、1-1-4 記載と同様に、安楽死はペントバルビタールの腹腔内過剰投与により実施し、脛骨を採取し評価した。採取した大腿骨を 4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液中で一晩固定した。軟 X 線システム及びマイクロ CT システムによる放射線学的分析の後、EDTA-4Na 20% (pH7.4) 溶液に 5 日間浸漬し脱灰した。エタノール脱水後パラフィン包埋を行い、矢状断で

6 μm の切片を作製した。

パラフィン切片を脱パラフィンした後、0.3%アルシアンブルー溶液に 5 分間浸漬し、水洗後マイヤーのヘマトキシリン液に 2 分間浸漬、さらに水洗後 1%エオジンアルコールに 1 分間浸漬した。エタノール脱水後、封入した。撮影、及び画像取得は 1-1-4 と同様に行った。

2-2 結果

2-2-1 骨折の回復過程の放射線学的評価

図 8A に 8 週齢の WT マウスの骨折モデルの術後、4 日、7 日、10 日、14 日、21 日、28 日目の骨折部のマイクロ CT 観察結果を示す。一般に骨折の治癒過程においては、炎症、造血、免疫、造骨等に関連する間葉系細胞分化が密接に関連しながら進行し、大きく分けて 4 つの修復過程、Ⅰ炎症期、Ⅱ細胞増殖期、Ⅲ仮骨形成期、Ⅳリモデリング期、が時間的、空間的に重なり合いながら進行していく [17]。仮骨形成量も正に、この骨折回復過程を反映しており、術後 14 日で最大量となり、その後、リモデリングにより徐々に減少している。マイクロ CT 画像による仮骨表面状態も術後 14 日は非常に安定しており、境界が明確であることから、遺伝子型による骨折モデルの回復過程の比較は術後 14 日の仮骨量を観察することとした。

図 9A に WT 及び *Gli*^{+/-} マウス各 8 匹の骨折モデルの術後 14 日の軟 X 線観察結

果を示す。骨折モデルとしての術式が不十分な場合、骨折モデル自体のバラツキが大きく、偽関節の形成や仮骨形成領域の拡がりを生じ、遺伝子型による仮骨形成量の差が判別し難くなる。しかし、図 9A の軟X線観察結果から、骨髓内釘の状態、骨折部の回復状態は、ほぼ一様であり、骨折モデル自体の安定性は十分であると判断した。

図 9B は図 9A の結果に基づき、骨折部の回復状態をさらに詳細に評価するため、マイクロ CT 観察を行ったによる骨折部の典型例を示す。WT に比べて *Gli1*^{+/-} マウスの仮骨形成量は小さい傾向が見られる。この仮骨形成量を 2 - 1 - 2 - 2 に示した評価方法によって、骨折線部の仮骨の断面積及び仮骨体積を定量評価した結果を図 9C に示す。マイクロ CT 解析による定量評価の結果、*Gli1*^{+/-} の仮骨は、断面積も体積も WT に比べて統計的有意差のある低下を生じていることが明確となった。

2 - 2 - 2 骨折部の回復過程の組織学的評価

2 - 2 - 1 の放射線学的評価に続いて、同サンプルを脱灰処理し、骨折部の組織観察を行った結果を図 9D に示す。組織染色は 2 - 1 - 3 に記載したヘマトキシリン・エオジンとアルシアンブルーのダブル染色である。ヘマトキシリン・エオジン染色によって、皮質骨と同様の骨が骨折部を大きく囲む架橋仮骨（ハード仮骨）として形成され、アルシアンブルー染色によって、癒合部には結合仮骨（ソフト仮骨）

が形成されていることが観察された。マイクロ CT 観察結果と同様、WT マウスではハード仮骨に囲まれた大きなソフト仮骨領域が見られるのに対して、*Gli1*^{+/-}マウスの骨折部では、ハード仮骨、ソフト仮骨共に形成量が低下していることが明らかとなった。

2-3 小括

病的条件下に於ける骨の恒常性維持に対する *Gli1* 欠損の影響を評価するために、安定性の高いマウス脛骨骨折モデルを開発し、その回復過程の差を骨折部の仮骨形成量で評価した。仮骨形成量は、マイクロ CT データの解析による骨折線部仮骨の断面積及び骨折線両側各 1.5 mm（合計 3.0 mm）領域の体積の 2 種の評価法によって解析した。その結果、断面積も体積も統計的有意差を持って、*Gli1*^{+/-} マウスの仮骨形成量は小さいことが明らかとなった。

さらに、組織観察の結果、*Gli1*^{+/-} マウスでは、ハード仮骨、ソフト仮骨共に形成量が低下していることが明らかとなった。

以上の結果は、骨折という病的状態下に於いても *Gli1* の関与は大きく、*Gli1* 欠損により、その回復過程における軟骨内骨化、及び膜性骨化双方の形成能が低下することが示唆された。

図7

A 骨折モデル施術場全景



General anesthesia equipment

Clipper for hair shaving

B 所要道具一覧



Engine for osteotomy disk

N0.11 scalpel

4-0 nylon thread

23G spinal needle

23G needle

Diamond cutting disc

Needle holder

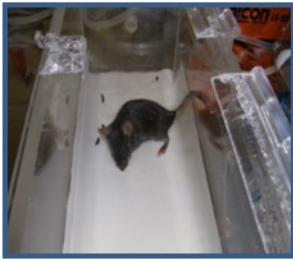
Spatula

Tweezers

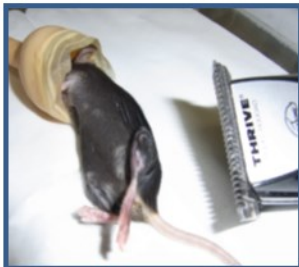
Scissors

C

① General anesthesia



② Hair shaving



③ Longitudinal incision at the front of tibia



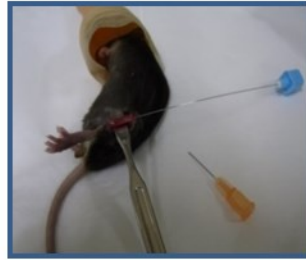
④ Expose the tibia and insert the spatula between the tibia and muscle



⑤ Puncture the intramedullary nail



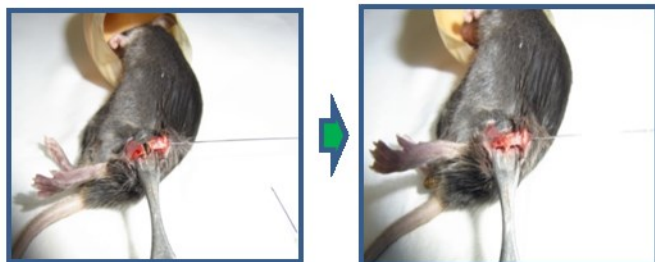
⑥ Insert the inner pin of the spinal needle



⑦ Osteotomy



⑧ Fixation of bone



⑨ Cut the extra pin



⑩ Suture



図7 マウス骨折モデル説明図

A マウス骨折モデル施術場の全景

全ての器材は縦 70 cm、横 100 cm の事務用机一台分に整理配置されている。
電源は 100 V コンセントが 4 口必要。

B 所要道具の一覧

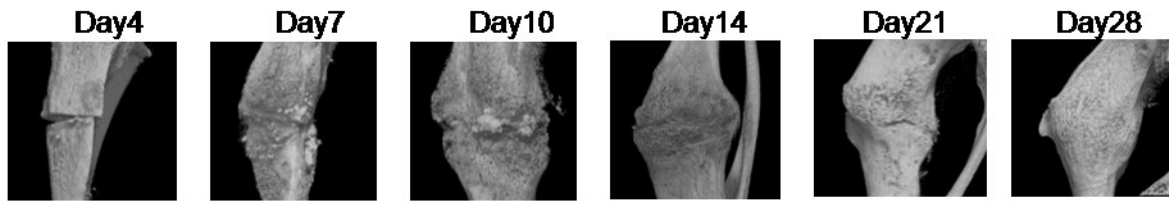
生物学系の実験室に存在する道具が主であるが、本骨折モデル用の特殊な道具としては歯科用エンジン、電着ダイヤモンドディスク、23G スパイナル針、先端が小さく湾曲した鋭匙がある。

C 骨折モデルの施術フロー

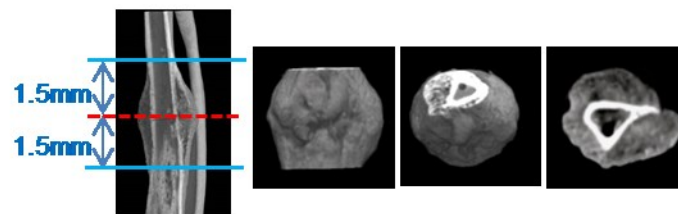
- ①イソフルレン吸入麻酔予備室
- ②吸入麻酔下での術野周囲のエタノール消毒と剃毛
- ③脛骨前面の皮膚切開（15 mm）
- ④脛骨の展開と軟組織保護のための鋭匙の挿入
- ⑤23G 針による骨髓内釘挿入路の形成
- ⑥骨髓内釘としての 23G スパイナル針内芯の挿入
- ⑦歯科用エンジン、カッティングディスクによる骨切り
- ⑧骨髓内釘の遠位挿入による骨折骨の固定
- ⑨余剰骨髓内釘の切断
- ⑩縫合

图8

A



B



C

Cross-sectional area of the callus



The total area in the fracture line

Area of the tibia in the fracture line

Volume of the callus



The whole volume in the $\pm 1.5\text{mm}$ region from the fracture line

Volume of the tibia in the same area

D

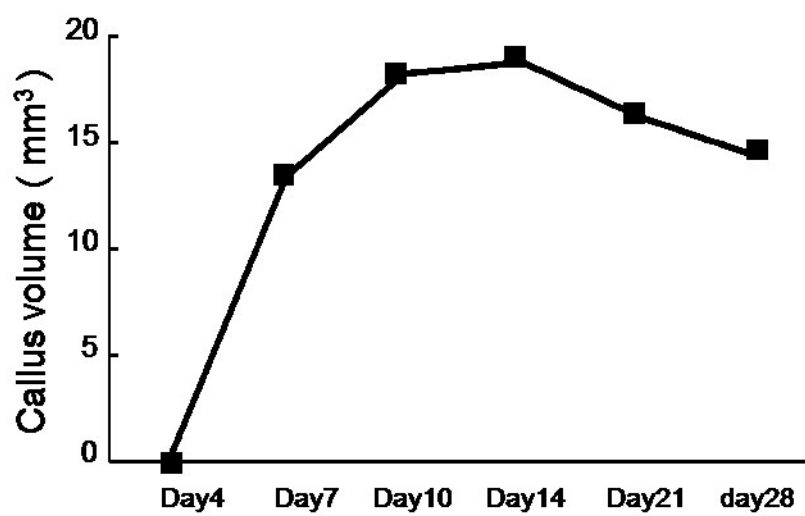
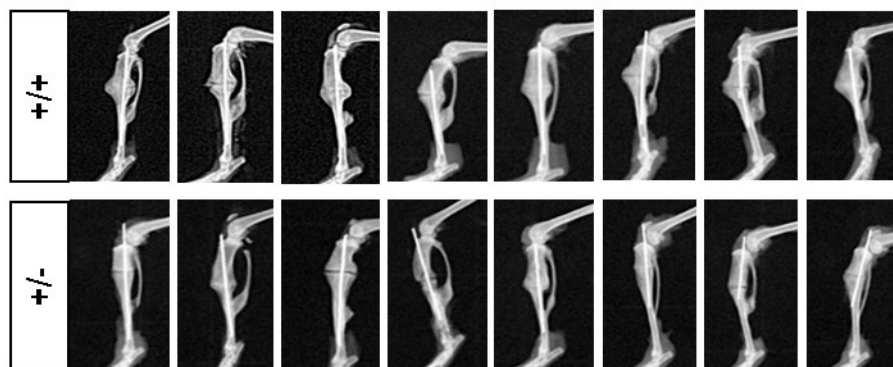


図 8 骨折モデルにおける回復過程の仮骨形成量による評価法

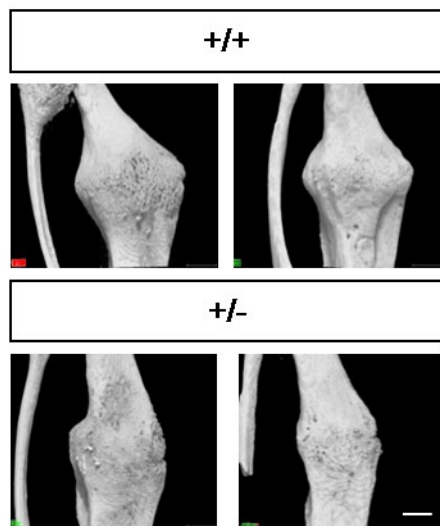
- A 8 週齢の WT マウスの脛骨骨折モデルの術後 4 日、7 日、10 日、14 日、21 日、28 日の骨折部のマイクロ CT 観察結果
- B 術後 14 日の脛骨のマイクロ CT 画像
 - 最左側：縦断面（赤破線：骨折線、青実線：マイクロ CT 解析領域）
 - 左：解析領域横画像
 - 中：解析領域 3 次元画像
 - 右：骨折線部断面画像
- C マイクロ CT データからの骨折部仮骨量の算出法
 - 左：骨折線部仮骨断面積算出法
 - 右：骨折部仮骨体積算出法
- D 8 週齢 WT マウスの骨折モデルによる骨折部仮骨体積の術後 28 日までの変化

图9

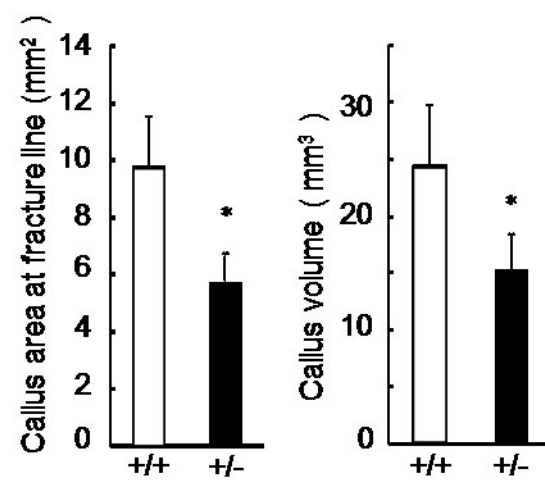
A



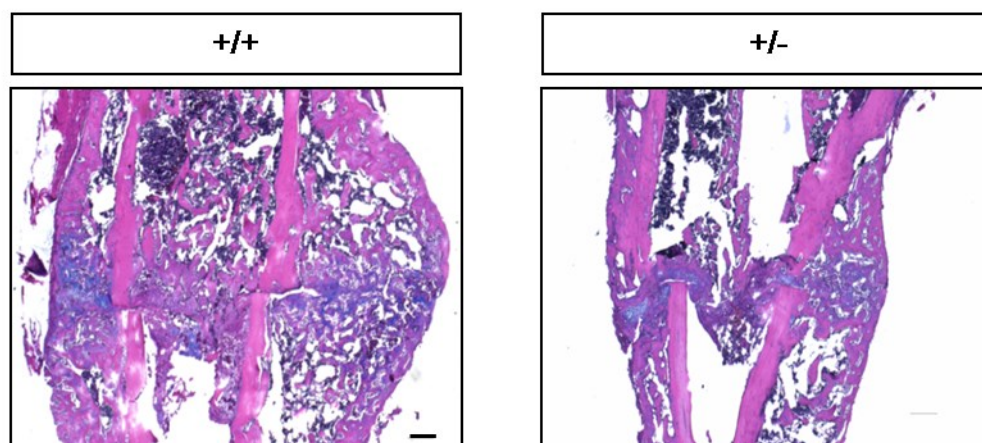
B



C



D



**図 9 8 週齢の WT と *Gli1*^{+/-} マウスの骨折モデルの術後 14 日の回復状態比較
評価結果**

- A 軟 X 線による WT、*Gli1*^{+/-} 各 8 匹の脛骨観察図
- B マイクロ CT による骨折部画像の典型例 Bar : 1 mm
- C マイクロ CT データの解析による骨折部仮骨の断面積と体積の比較
* P<0.05 vs. WT
- D 骨折部の組織観察図 (ヘマトキシリン・エオジンとアルシアンブルーの
ダブル染色) Bar : 200 μm

第3章

骨芽細胞の分化・成熟に対する Gli1 欠損の影響 に関する検討

3-1 材料と方法

3-1-1 細胞培養

C3H10T1/2 細胞株は理研細胞バンクより購入した。10%ウシ胎仔血清（FBS、Sigma-Aldrich）と抗生剤（50 unit/mL ペニシリン+50 mg/mL ストレプトマイシン、Sigma-Aldrich）を含む High glucose Dulbecco's Modified Eagle's medium（DMEM、Sigma-Aldrich）培地を用いて 37°C 5%CO₂ 環境下で継代培養した。マウス頭蓋骨初代細胞（OP）は生後 1 日の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスから Ogata らの方法によって採取した[18]。マウス初代骨髄間質系細胞（bone marrow stromal cells-BMSC）は 8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）を回収後、PBS にて骨髓腔より抽出し、セルストレーナーを用いて得た細胞を単離して使用した。上記培地で 50%コンフルエントまで培養後、Smoothened Agonist（SAG、CALBIOCHEM）を 1 μM 添加した骨芽細胞分化培地（Minimum Essential Medium、α-MEM（GIBCO））を使用した[18,19,20]。

3-1-2 Real time RT-PCR

ISOGEN（和光純薬）及び RNeasy Mini Kit（QIAGEN）を用いて、培養細胞より RNA を回収し、DnaseI（QIAGEN）処理を行った。Takara RNA PCR Kit（Takara）を用いて、回収した RNA の 500 ng を逆転写反応させ一本鎖 cDNA を合成した。反応条件は 55 °C 30 分、99 °C 5 分とした。Real time PCR は、ABI Prism 7000 Sequence Detection System（Applied Biosystems）を用いた。反応液は 1 用 QuantiTect STBR Green Master Mix（QIAGEN）、0.3 μM プライマー及び 1 μL cDNA 溶液からなり、反応条件は 94 °C 15 秒、60 °C 60 秒の 40 サイクルとした。mRNA のコピー数は、PCR 増幅産物を含むプラスミドの段階希釈系列の測定によって得た標準曲線から算出した[21]。さらに、内在性コントロールとして、ハウスキープング遺伝子であるマウス actin を用いて mRNA の発現量を補正した。標準として用いた PCR 増幅産物を含むプラスミドは TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、PCR 増幅産物を pCR4-TOPO ベクターに組み込んで作製した。各 PCR 反応は 3 回試行し、平均±標準偏差として記載した。解析に用いたプライマーの配列を表 3 に示す。

3-1-3 染色

A. ALP 染色

培地を除去した後、培養細胞を Phosphate buffered saline (PBS(-)) で 2 回洗浄し、70%エタノール水溶液で 15 分間固定後、乾燥させた。染色液は 5 mg のナフトール AS-MX リン酸二ナトリウム塩 (Sigma-Aldrich) を 0.5 mL の N,N-ジメチルホルムアミド (和光純薬) に溶解させたものを 30 mg のファストブルーBB 塩ヘミ (亜鉛クロリド) 塩 (Sigma-Aldrich) を含む 50 mL の 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) に加えて混合した。混合液をポリテトラフルオロエチレン製メンブレンフィルター (Millex-GV フィルター、0.22 μ m、PVDF、33 mm) で濾過して使用した。作製した染色液で 37 $^{\circ}$ C 10 分間染色し、水洗した。

B. von Kossa 染色

ALP 染色と同様、培地を除去した後、PBS(-)で 2 回洗浄し、70%エタノール水溶液で固定した。5%硝酸銀 (和光純薬) 水溶液で 1 時間、間接光を反応、染色した。還元・定着は 5%チオ硫酸ナトリウム (和光純薬) を用いて 5 分間処理した後、水洗した。

3-1-4 アデノウイルスベクターの作製

ヒト *GLI1* を発現するアデノウイルスベクターは、ViraPower Adenoviral Expression System (Life Technologies) のメーカー推奨プロトコールに従って作製した。具体的には、ヒト *GLI1* cDNA に Biotin-3 \times FLAG[22]タグを連結して

pCID[23]ベクターにクローニングし、さらにバイシストロニック発現用の IRES とモニター用に dsRed を連結した。この *GLI1-Biotin-3×FLAG-IRES-deRed* 構造を CAGGS プロモーターと共に pENTRA1A ベクターに移したのち、GATEWAY システムを用いて pAd/PL-DEST ベクターにクローニングし、アデノウイルスベクターを作製した (pAd/PL-DEST-CAGGS-*GLI1-Biotin-3×FLAG-IRES-deRed*)。このベクターは、CAGGS プロモーターによって *GLI1-Biotin-3×FLAG-IRES-deRed* の発現を誘導する。pAd/PL-DEST-CAGGS-*GLI1-Biotin-3×FLAG-IRES-deRed* を制限酵素 Pac1 で直線化して 293A 細胞に導入し、*GLI1-Biotin-3×FLAG-IRES-deRed* を発現するアデノウイルス粒子を作製した。得られたアデノウイルスを AdenoX Virus Purification Kit (Clontech) で精製した。感染時の重複感染度 (multiplicity of infection-MOI) は、細胞変性終末点法により測定したウイルス力価に基づいて算出した。

3-1-5 レポーターアッセイ

C3H10T1/2 細胞を 24-well プレートに 1×10^4 cells/well の密度で播き、24 時間後に luciferase レポータープラスミド (8×3'-Gli BS-luc) [24]、エフェクター、及び Renilla プラスミドを総量 0.4 $\mu\text{g/well}$ となるよう導入した。遺伝子導入試薬には FuGENE6 (Roche) を用いた。DNA 量の調整には GFP を発現するプラスミド (pEGFP

expression vector) を使用した。遺伝子導入 48 時間後に細胞を回収して評価した。

Luciferase 活性 (Luciferase Assay Buffer II (Promega)、Luciferase Assay Substrate (Promega)) は、Renilla luciferase 活性 (Stop & Glo Buffer (Promega)、Stop & Glo substrate (Promega)) で標準化した。

3 - 1 - 6 Western blotting

培養細胞を PBS で 2 回洗浄後、1 mM PMSF、1 μ g/mL aprotinin、100 μ M NaF、20 μ M Na₃VO₄、1 \times protease Inhibitor Cocktail (Roche) を含む RIPA buffer (TNE buffer + 0.1% SDS + 1% Deoxycholic Acid Sodium Salt) を用いて 4 $^{\circ}$ C、60 分でゆっくり攪拌しながら細胞内タンパク質全画分を可溶化した。次に、この細胞溶液を 15,000 rpm、20 分遠心し、上清をタンパク質抽出液とした。得られたタンパク質抽出液の濃度は Protein Assay Kit II (BIO-RAD) を用いて測定した。SDS-サンプルバッファーを加えたタンパク質抽出液のタンパク質重量 10 μ g 相当量を 4-20% Tris-Glycine gradient gel を用いて泳動 (SDS-PAGE) させ、さらに 100 V、1 時間通電によりニトロセルロース膜 (BIO-RAD) に転写した。ニトロセルロース膜を 6% スキムミルク/Tris buffered saline + 0.1% tween (TBS-T) を用いてブロッキング処理後、各一次抗体及び horseradish peroxidase (HRP) で標識した各二次抗体を反応させ、ECL Plus Kit (Amersham Life Sciences Inc) を用いて蛍光発色させ可視化した。Western Blotting

に使用した抗体の情報を表 4 に示す。

3-2 結果

3-2-1 アデノウイルスベクターによる Gli1 発現効果の確認

図 10A に今回作製したアデノウイルスベクターの構造を示す。図 10B は、C3H10T1/2 細胞に本アデノウイルスベクターを感染させた時の、Gli 応答性配列誘導性のルシフェラーゼ活性を示したものである。ネガティブコントロールの dsRed では活性は見られず、今回作製したベクター (Gli1-IRES-Red) では、ポジティブコントロール (Myc-Gli1) と同等のルシフェラーゼ活性が得られた。C3H10T1/2 細胞に本アデノウイルスベクターを感染させた時のタンパク発現を Western blotting で確認したのが、図 10C である。やはり、ネガティブコントロールの dsRed では Gli1 タンパクの発現は見られず、今回作製したベクター (Gli1-IRES-Red) は、ポジティブコントロール (Myc-Gli1) と同等の Gli1 タンパクの発現を確認した。次に、C3H10T1/2 細胞において、Gli1 の過剰発現が骨芽細胞分化マーカーである *Alp* 及び *Ibsp* の発現を誘導することが報告されていることから[13]、本アデノウイルスベクターも同様の効果を示すかを確認した。図 10D に示すように、C3H10T1/2 細胞において、本アデノウイルスベクターによる Gli1 の過剰発現は *Alp* 及び *Ibsp* 遺伝子の発現を誘導した。以上より、本アデノウイルスベクターは、細胞内において機能

的な Gli1 蛋白の発現を誘導できることが示された。

3-2-2 骨芽細胞の分化能に対する Gli1 欠損の影響

8 週齢の WT と *Gli1*^{+/-} マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）から採取した初代骨髄間質系細胞（BMSCs）を 14 日間、SAG を添加した骨芽細胞分化誘導培地で培養した時の骨芽細胞分化マーカーの発現を図 11A に示す。各分化マーカーである mRNA の発現量は Real time RT-PCR で評価した。全ての分化マーカーで、*Gli1*^{+/-} BMSCs の mRNA 発現量は WT と比べて低下傾向にあり、*Alp* と *Ibsp* に関しては統計的有意差が得られた。さらに、これらの細胞を ALP 及び von Kossa 染色した結果を図 11B に示す。*Gli1*^{+/-} BMSCs は、骨芽細胞分化マーカーの発現量の低下を反映して、WT に比べて ALP 活性も石灰化度も低下していることを確認した。

図 11C は、生後 1 日齢の WT 及び *Gli1*^{+/-} マウスの頭蓋冠から採取した頭蓋骨初代細胞（OPs）を 7 日間、SAG を添加した骨芽細胞分化誘導培地で培養した時の骨芽細胞分化マーカーの発現を調べたものである。各分化マーカーである mRNA の発現量は Real time RT-PCR で評価した。全ての分化マーカーに於いて、*Gli1*^{+/-} OPs の mRNA 発現量は WT と比べて統計的有意差のある低下を示すことが確認された。この傾向は、図 11D に示すように ALP 染色、von Kossa 染色の結果でも明らかであった。

3-2-3 骨芽細胞の分化、成熟に対する Gli1 強制発現効果

生後 1 日齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスの頭蓋冠から採取した頭蓋骨初代細胞 (OPs) に対して、3-1-4、3-2-1 で示したアデノウイルスベクターを感染させて Gli1 を強制発現させることによって、骨芽細胞分化マーカーの発現がどう変化するかを調べた結果が図 12 である。Gli1 を強制発現させていない WT 及び *Gli1*^{+/-}Ops に対しては、同様の負荷を細胞に付与するため、同じ MOI (=10) で GFP 発現アデノウイルスベクターを感染させた。*Gli1*^{+/-}Ops に対する Gli1 の強制発現効果により、*Gli1* の発現量は WT を上回り、*Alp* や *Bglap* の発現量も WT に近いレベルまで回復することが確認できた。

3-3 小括

生後 1 日齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスの頭蓋冠から採取した頭蓋骨初代細胞 (OPs)、及び 8 週齢の WT と *Gli1*^{+/-} マウスの長管骨 (大腿骨、脛骨) から採取した初代骨髄間質系細胞 (BMSCs) の骨芽細胞分化誘導実験により、*Gli1*^{+/-} マウスは骨芽細胞への分化、成熟能が大きく低下していることが明らかとなった。

さらに、Gli1 強制発現用のアデノウイルスベクターを作製し、*Gli1*^{+/-} Ops に感染させて骨芽細胞分化誘導を行った結果、骨芽細胞分化マーカーの発現回復が確認できた。

以上の結果により、Gli1 欠損により骨芽細胞の分化、成熟が障害されるが、この障害は Gli1 の回復によって改善されることから、Gli1 は細胞自律的に骨芽細胞の分化、成熟に影響を与えることが明らかとなった。

図表

表 3 本研究で使したプライマー配列 (Real time RT-PCR 用)

種	遺伝子名	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')	size(bp)
mouse	β -actin	AGATGTGGATCAGCAAGCAG	GCGCAAGTTAGGTTTGTCA	125
	alkaline phosphatase (<i>Alp</i>)	GCTGATCATTCCCACGTTTT	CTGGGCCTGGTAGTTGTTGT	203
	bone sialoprotein (<i>Ibsp</i>)	CAGAGGAGGCAAGCGTCACT	CTGTCTGGGTGCCAACACTG	81
	osteocalcin (<i>Bglap</i>)	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	TTGTAGGCGGTCTTCAAGC	156
	Runx2	CCCAGCCACCTTTACCTACA	TATGGAGTGCTGCTGGTCTG	150
	osterix (<i>Sp7</i>)	ACTCATCCCTATGGCTCGTG	GGTAGGGAGCTGGGTTAAGG	238
	Gli1	GCACCACATCACAGTGAGC	GCGTCTTGAGGTTTCAAGG	203

表 4 Western Blotting で使した抗体と使濃度

	抗体名	メーカー	使濃度
1次抗体	anti-Actin rabbit polyclonal antibody	Sigma-Aldrich	1 : 1000
	anti-Gli1 rabbit polyclonal antibody	Abcam	1 : 1000
2次抗体	HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody	Promega	1 : 10000

图10

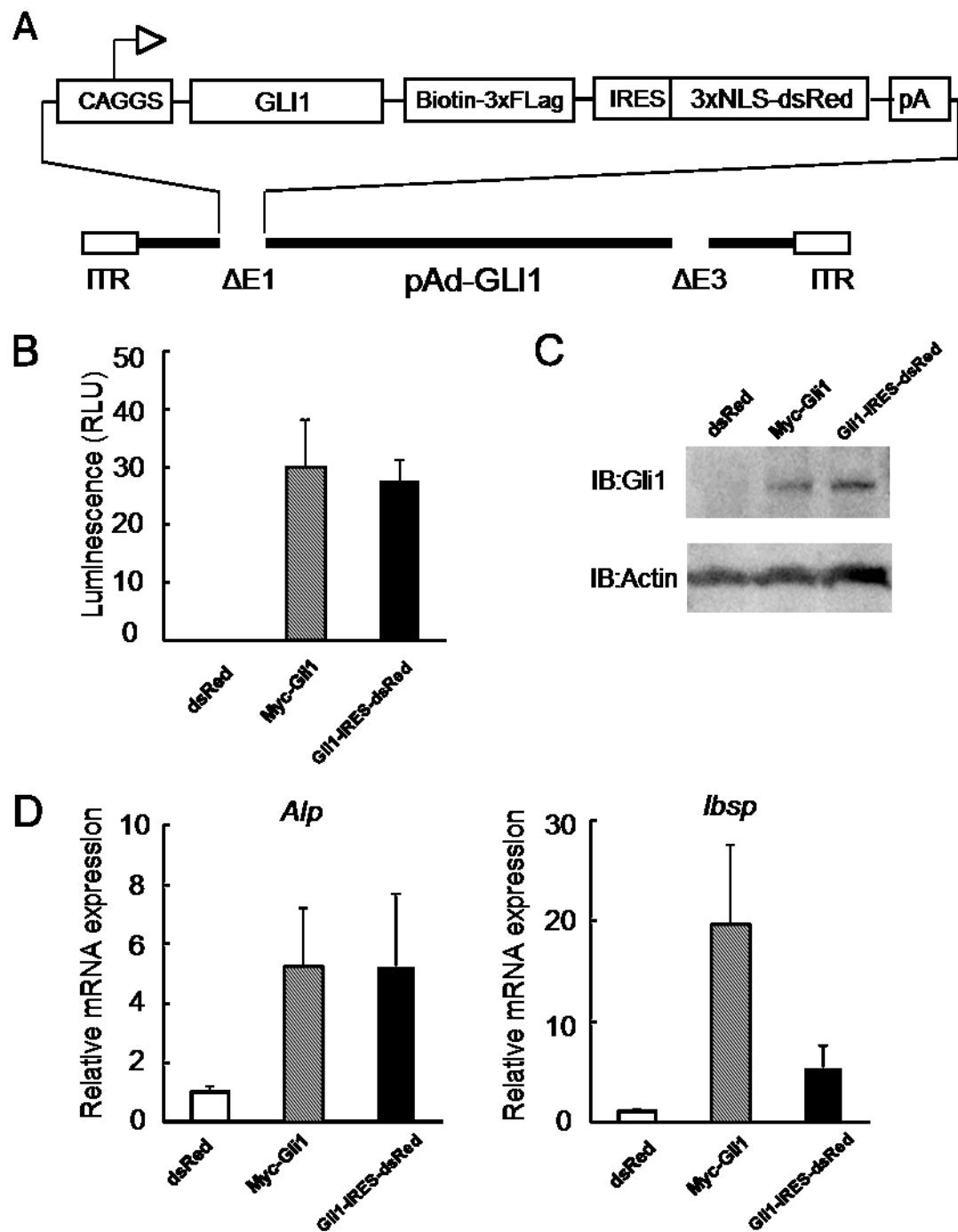


図 10 Gli1 強制発現用アデノウイルスベクター

A Gli1 強制発現アデノウイルスベクターの構成図

CAGGS プロモーター、ヒト GLI1、Biotin-3×FLAG tag、IRES、3×NLS-dsRed、ポリ A が pAd ベクターの Δ E1 領域に挿入された構造となっている。

B ルシフェラーゼ解析

C3H10T1/2 細胞に A の構造のアデノウイルスベクターを感染させ、48 時間培養した。ルシフェラーゼ活性は同時に導入した Renilla の値で補正した。

N=3、mean \pm S.D.

C Western blotting 解析

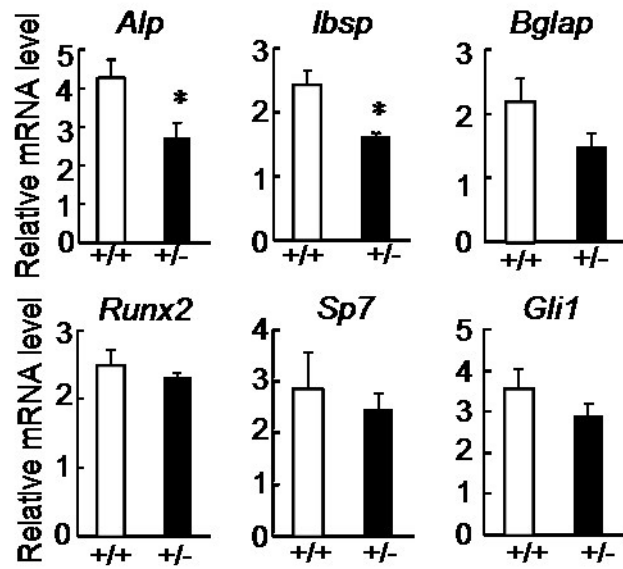
C3H10T1/2 細胞に A の構造のアデノウイルスベクターを感染させ、48 時間培養した後、タンパクを回収、評価した。

D 骨芽細胞分化マーカーの発現

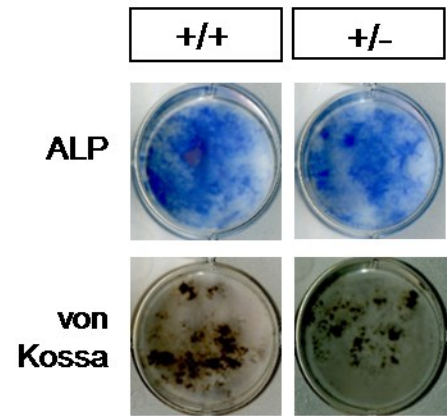
C3H10T1/2 細胞に A の構造のアデノウイルスベクターを感染させ、7 日間、骨芽細胞分化培地で骨芽細胞分化誘導を行った。
mRNA の発現量は Real time RT-PCR で解析した。

图11

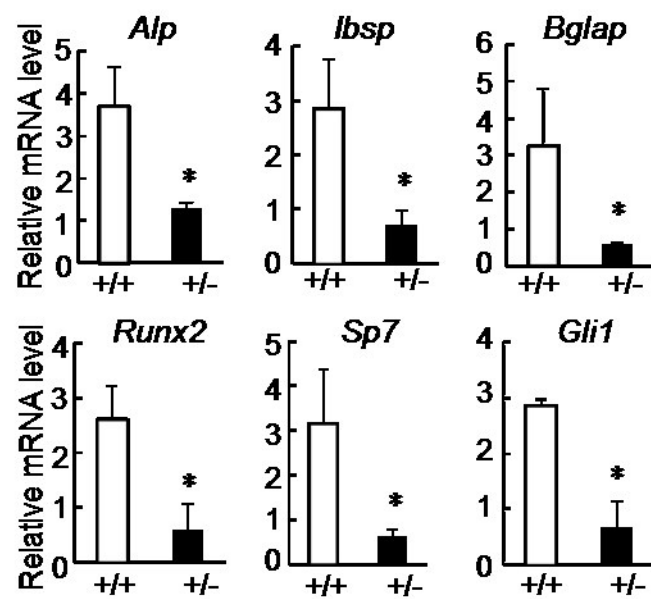
A



B



C



D

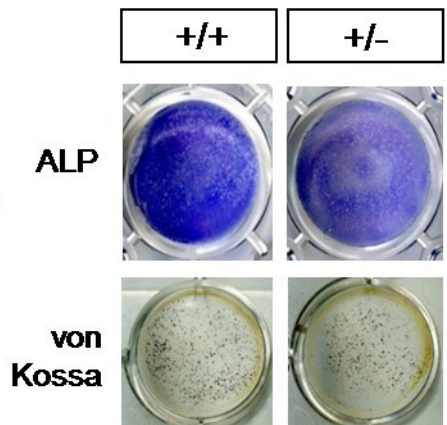


図 11 WT (+/+) 及び *Gli1*^{+/-} マウスから採取した初代細胞の骨芽細胞分化能

A 8 週齢の WT と *Gli1*^{+/-} マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）から採取した初代骨髄間質系細胞（BMSCs）の骨芽細胞分化マーカーの発現量比較。

Smoothened agonist（SAG）を添加した骨芽細胞誘導培地で 14 日間培養。

B A と同条件での培養細胞の ALP 染色、von Kossa 染色結果

C 生後 1 日の WT 及び *Gli1*^{+/-} マウスの頭蓋冠から採取した頭蓋骨初代細胞（OPs）の骨芽細胞分化マーカーの発現量比較

Smoothened agonist（SAG）を添加した骨芽細胞誘導培地で 7 日間培養。

D C と同条件での培養細胞の ALP 染色、von Kossa 染色結果

* $P < 0.05$ vs. WT

図12

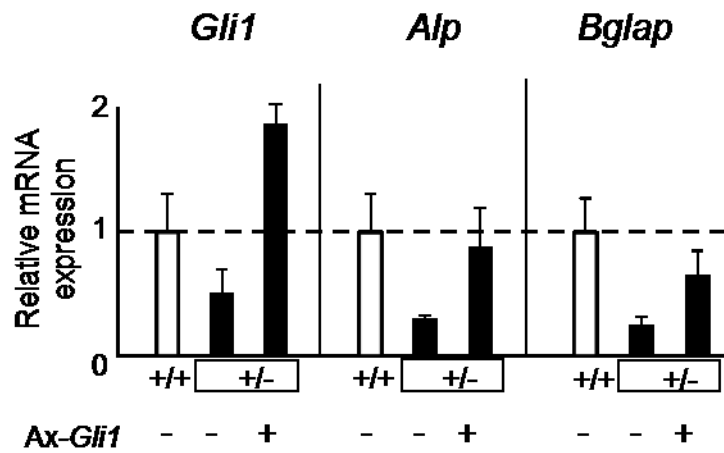


図 12 生後 1 日齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスの頭蓋冠から採取した頭蓋骨初代細胞 (OPs) に対する *Gli1* 強制発現効果

Gli1 の強制発現は 3-1-4 及び 3-2-1 記載のアデノウイルスベクター (Ax-*Gli1*) による。本アデノウイルスベクター感染 (MOI=10) 後 Smoothed agonist (SAG) を添加した骨芽細胞誘導培地で 7 日間培養。

Ax-*Gli1*(-)は同 MOI の Ax-GFP を感染。

第 4 章

破骨細胞の分化・成熟に対する Gli1 欠損の影響に関する検討

4-1 材料と方法

4-1-1 細胞培養

*in vitro*破骨細胞分化実験に用いたマウスマクロファージ様細胞株(RAW264.7)は、理研細胞バンクより購入し、小笠原らの方法[25]に従って、破骨細胞に分化誘導した。*ex vivo* 破骨細胞分化実験、及び共培養実験においては、8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）の骨髓腔より、セルストレーナーを用いて得たマウス初代骨髓マクロファージ（BMMΦ）及びマウス初代骨髓間質系細胞（BMSC）を単離して使用した。10%ウシ胎仔血清（FBS、Sigma-Aldrich）と抗生剤（50 unit/mL ペニシリン+50 mg/mL ストレプトマイシン、Sigma-Aldrich）を含む High glucose Dulbecco's Modified Eagle's medium（DMEM、Sigma-Aldrich）培地を用いて 37°C 5%CO₂ 環境下で培養した。

4-1-2 Real time RT-PCR

Real time RT-PCR は、3-1-2 記載の方法で実施した。解析に用いたプライ

マーの配列を表 5 に示す。

4-1-3 染色

培地を除去した後、培養細胞を Phosphate buffered saline (PBS(-)) で 2 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (PFA (和光純薬)) で 15 分間固定した。染色液は 50 mM 酢酸ナトリウム (和光純薬)、40 mM 酒石酸カリウムナトリウム (和光純薬) の混合液を酢酸で pH4.8 に調整した TRAP buffer 水溶液に、Fast Red Violet (SIGMA) を 0.6 mg/mL、ナフトール ASBI リン酸ナトリウム (和光純薬) を 0.1 mg/mL 加えて混合し作製した。混合液をポリテトラフルオロエチレン製メンブレンフィルター (Millex-GV フィルター、0.45 μ m、PVDF、33 mm) で濾過して使用した。4% PFA を吸引、水洗後、上記染色液を加え、室温で 30 分間染色し、水洗した。

4-2 結果

4-2-1 破骨細胞の分化に対するヘッジホッグシグナルの影響

1-2-3 で示したように、*Gli1*^{+/-}マウスでは、破骨細胞の増加が観察されたことから、破骨細胞分化に対する Hh シグナルの直接的影響を調べるため、図 13A に RAW264.7 細胞をソニックヘッジホッグ (rhShh (R & D system))、及びヘッジホッグの阻害剤であるサイクロパミン (Cyclopamine (Enzo Life Science)) 有無

の培地で Receptor activator of NF-kappa-B ligand (RANKL (Pepro Tech)) による破骨細胞分化誘導下で 5 日間培養し、TRAP 染色した結果を図 13A に示す。

RANKL 誘導がない場合は、TRAP 陽性細胞はほとんど存在しないが、RANKL 誘導下では、rhShh または cyclopamine の有無に関わらず、ほぼ同等の TRAP 陽性反応を示した。さらに、TRAP 陽性の多核細胞（破骨細胞）数を計測した結果を図 13B に示す。RAW264.7 細胞から破骨細胞への分化は、rhShh や cyclopamine の有無に依存しないことが確認された。

さらに、rhShh あるいは cyclopamine で処理した RAW264.7 細胞において、ヘッジホッグシグナルが活性化あるいは抑制されていることを確認するために、ヘッジホッグシグナルの標的遺伝子である受容体 *Ptch1* 遺伝子の発現を Real time RT-PCR で評価した結果を、図 13C に示す。Shh 存在下で培養した RAW264.7 細胞からは、*Ptch1* 遺伝子の発現が上昇し、さらに cyclopamine との共存在下では発現が低下していることを確認した。したがって、前駆細胞におけるヘッジホッグシグナル活性の変化は、破骨細胞分化へほとんど影響を与えないことが示唆された。

4-2-2 破骨細胞の分化、成熟に対する Gli1 欠損の影響

4-2-1 より RAW264.7 細胞を用いた検討では、Hh シグナルは破骨細胞への分化に影響しないことが示唆されたので、さらに Hh シグナルの下流に位置する転

写因子 Gli1 も影響を与えないのか検討した。図 14 は、8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）から回収したマウス初代骨髄マクロファージ（BMMΦ）を用いて、5 日間破骨細胞分化誘導培養した時の破骨細胞分化マーカー、カタプシン K（Ctsk）及び NFATc1 の発現を比較したものである。各分化マーカーである mRNA の発現量は Real time RT-PCR で評価した。WT と *Gli1*^{+/-}の間で、破骨細胞分化マーカーの発現に有意差は観察されなかった。以上より、前駆細胞における Gli1 の喪失は、破骨細胞分化へほとんど影響を与えないことが示唆された。

4-2-3 共培養下に於ける破骨細胞分化に対する Gli1 欠損の影響

前述（4-2-1、4-2-2）の通り、これまでの検討で Hh シグナルは破骨細胞分化には直接関与していないことが示唆されている。しかし、実際の *Gli1*^{+/-}マウスの生体内では、破骨細胞数が上昇している。さらに、生体内の破骨細胞分化は、骨芽細胞が支持していることが分かっている。そこで、より生体内の環境に近い、骨芽細胞前駆細胞と破骨細胞前駆細胞の共培養下で破骨細胞分化を誘導することによって、*Gli1*^{+/-}マウスで破骨細胞分化異常を惹起した責任細胞の同定を試みた。

図 15 は、8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）から採取したマウス初代骨髄間質系細胞（BMSC）と BMMΦを共培養することによって破骨細胞分化を誘導し、TRAP 染色によってその分化度を比較評価した結果である。図 14A

は TRAP 染色の典型例、図 15B は TRAP 陽性多核細胞数の計測結果を示す。

まず、各遺伝子型の BMSC を培養し、同じ細胞数になった時点で骨芽細胞分化誘導培地で 7 日間培養する。そこに、8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）から採取した BMMΦ を蒔いて、破骨細胞分化誘導条件下で 7 日間培養した後、TRAP 染色を行った。

この結果、TRAP 陽性細胞は、BMMΦ の遺伝子型には依存しないが、BMSC の遺伝子型の影響を受け、*Gli1*^{+/-}BMSC との共培養で破骨細胞分化が促進することが分かった。以上より、*Gli1*^{+/-}マウスにおける骨吸収促進は、骨芽細胞系の破骨細胞支持能の亢進によるものであることが示唆された。

4-2-4 骨芽細胞の破骨細胞分化支持能に対する *Gli1* 欠損の影響

図 16A は、8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）から採取した BMSC の破骨細胞分化支持マーカーの発現を比較した結果である。図 16B は、生後 1 日齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスの頭蓋骨から採取した Ops の破骨細胞分化支持マーカーの発現を比較した結果である。それぞれ、骨芽細胞分化誘導培地で 14 日間培養した。各分化支持マーカーである mRNA の発現量は Real time RT-PCR で評価した。

*Rankl*は破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を促進し、osteoprotegrin (*OPG*)

は分化を抑制する方向に作用する[26,27]。Dentin matrix acidic phosphoprotein (*Dmp1*)、及び sclerostin (*SOST*) は、骨芽細胞が成熟し骨細胞様細胞まで分化したことを示すマーカーである。骨細胞は *Rankl* の主要な産生源であることが近年示唆されている[28]。BMSC も *Ops* も *Gli1*^{+/-}の方が破骨細胞分化支持能が高い傾向が見られ、*Rankl* の発現は共に統計的有意差が得られた。さらに、骨細胞様マーカーである *Dmp1* 及び *SOST* は、*Gli1*^{+/-}の方が高い傾向が見られ、BMSC の *Dmp1* では統計的有意差が得られた。

さらに、*Gli1*^{+/-}は *Rankl* の発現が有意に上昇していたことから、*Gli1* は *Rankl* 発現を負に制御すると考えられる。そこで、*Gli1*^{+/-} マウスの BMSC を用いて、*Gli1* 発現用アデノウイルスベクターを作用させて *Rankl* の発現量の変化を調べたのが図 17 である。図 17A は本実験のタイムスケジュール、図 17B は Real time RT-PCR で評価した *Rankl* の発現量の変化を示す。BMSC を SAG を添加した α -MEM 培地で培養し、*Rankl* の発現が観察された培養開始 4 日後に Ax-Gli1 を感染させた。比較対象には Ax-GFP を感染させた。各アデノウイルス感染後 7 日目(培養開始 11 日目)に RNA を回収し評価した結果、*Gli1* の強制発現により、*Rankl* の発現量が低下することが確認できた。

4-3 小括

破骨細胞の分化・成熟に対する *Gli1* 欠損の影響を調べるため、まずはマウスマク

ロファージ様細胞株 (RAW264.7) を使用して破骨細胞分化に対するヘッジホッグシグナルの影響を評価した。しかし、RAW264.7 細胞はヘッジホッグシグナルを受容してはいるが、破骨細胞分化には差を生じないことが分かった。

次に、BMSC と BMM Φ の共培養という、実際の生体内に近い状態での培養条件下で、破骨細胞分化誘導を行った結果、破骨細胞分化は BMSC の遺伝子型に強く依存することが分かった。

そこで、BMM Φ と BMSC をそれぞれ単体で破骨細胞分化に関連マーカーを調べた結果、BMM Φ 単体での破骨細胞分化誘導では、遺伝子型の差は見られず、BMSC 単体の評価で、破骨細胞分化支持能が、*Gli1*^{+/-}で有意に高いことを確認した。

さらに、*Gli1*^{+/-}BMSC は骨芽細胞から骨細胞様細胞への分化が亢進し、*Rankl* の発現を上昇させることを確認した。

以上の結果から、*Gli1* 欠損により、骨芽細胞から骨細胞様細胞への分化が進行し、破骨細胞支持能が亢進することによって、破骨細胞分化が促進すると考えられる。これにより、*Gli1* 欠損マウスでは、骨芽細胞と破骨細胞のアンカップリングが生じていることが示唆される。

図表

表 5 本研究で使したプライマー配列 (Real time RT-PCR 用)

種	遺伝子名	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')	size(bp)
mouse	<i>β-actin</i>	AGATGTGGATCAGCAAGCAG	GCGCAAGTTAGGTTTTGTCA	125
	<i>Ptch1</i>	CTGGACTCTGGCTCCTTGTC	CAACAGTCACCGAAGCAGAA	277
	<i>Ctsk</i>	ACGGAGGCATCGACTCTGAA	GATGCCAAGCTTGCCTCGAT	192
	<i>NfatC1</i>	CCTTCGGAAGGGTGCCTTTT	AGGCGTGGGGCCTCAGCAGG	
	<i>Rankl(Tnfsf11)</i>	AGCCATTTGCACACCTCAC	CGTGGTACCAAGAGGACAGAGT	
	<i>Opg(Tnfsf11b)</i>	GTTTCCCAGGACCACAAT	CCATTCAATGATGTCCAGGAG	
	<i>Dmp1</i>	CAGTGAGGATGAGGCAGACA	TCGATCGCTCCTGGTACTCT	175
	<i>SOST</i>	AAGCCGGTCACCGAGTTGGT	GTGAGGCGCTTGCACTTGCA	200

図13

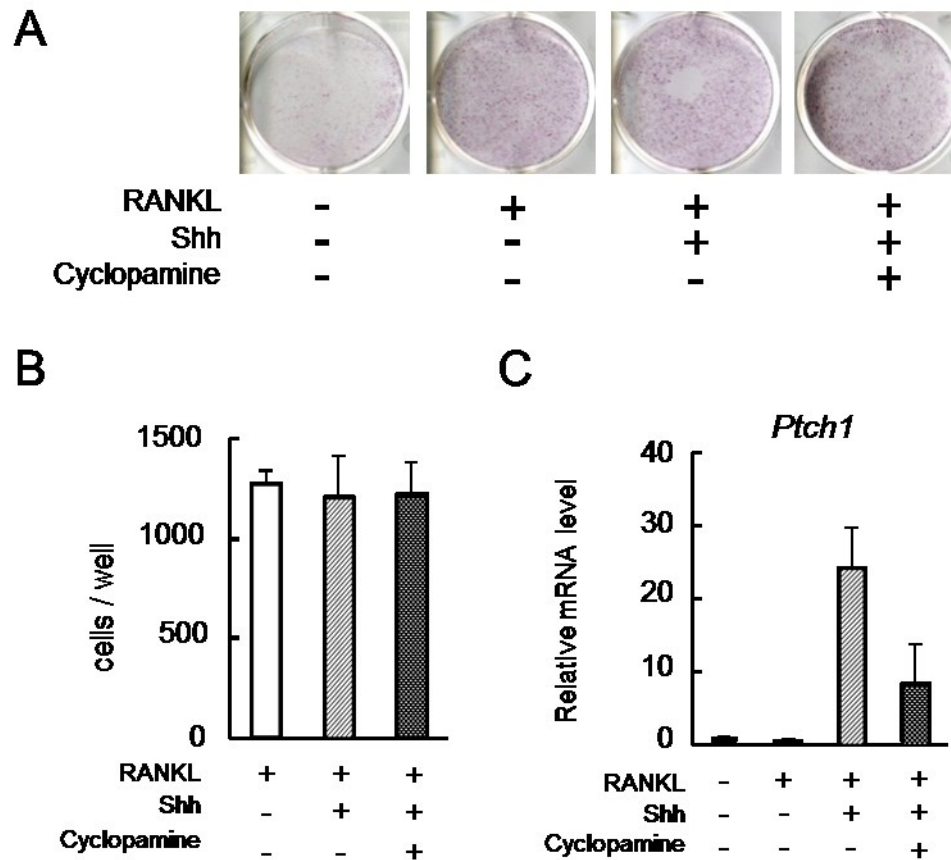


図 13 RAW 細胞を用いた破骨細胞分化の Shh、Cyclopamine 依存性

A 破骨細胞分化の Shh、Cyclopamine 依存性の TRAP 染色結果の典型例 (5 日間培養)

B 5 日間培養後の TRAP 陽性多核細胞数の Shh、Cyclopamine 依存性 各条件 4 well、mean±SD

C 5 日間培養による破骨細胞分化後の Ptch1 mRNA 発現量の Shh、Cyclopamine 依存性
n=4、mean±SD

RANKL : 100 ng/mL

Shh : 25 nM

Cyclopamine : 3 μM

図14

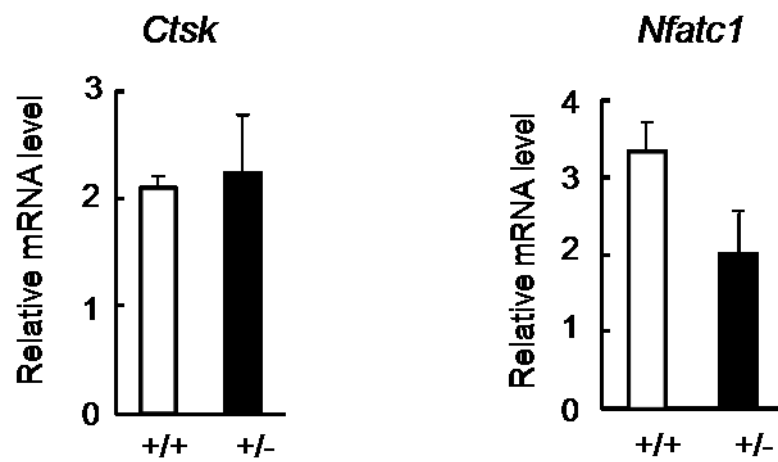


図 14 8 週齢の WT 及び Gli1+/-マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）から採取した BMMΦ の破骨細胞分化マーカーの評価

cathepsinK (Ctsk) 及び Nfatc1 は成熟破骨細胞から発現する遺伝子。

両遺伝子共にその発現量は、遺伝子型による有意差がない。

N=3、mean±SD

図15

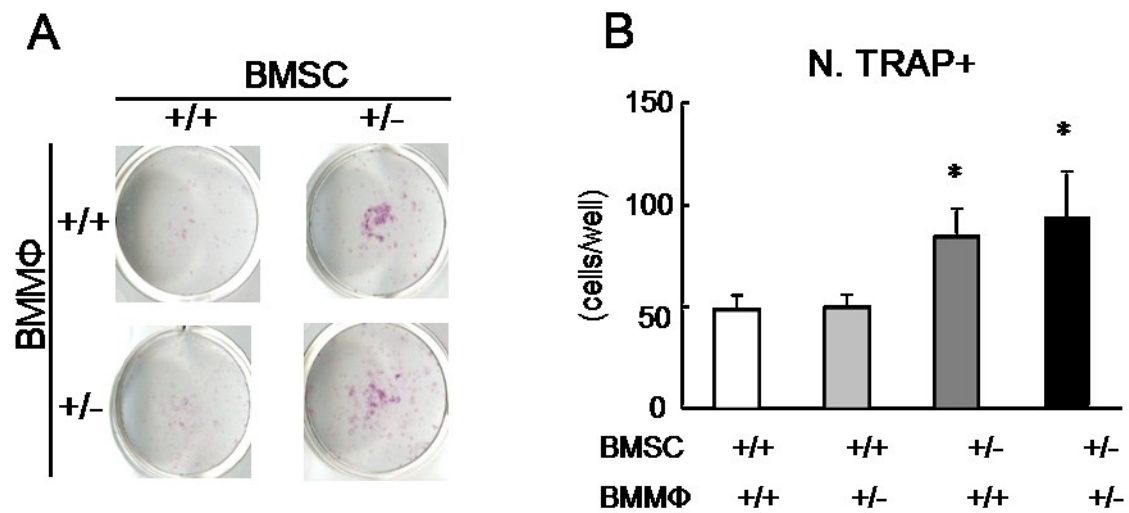


図 15 8 週齢の WT 及び Gli1^{+/-}マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）から採取した BMSC と BMMΦ の共培養による破骨細胞分化の TRAP 染色評価

A BMSC と BMMΦ の各遺伝子型の組み合わせによる破骨細胞分化の典型例
各組合せ 4 well

B 各組合せの TRAP 陽性多核細胞数の計測結果

各条件 n=4、mean±SD、* P<0.05 vs. +/+BMSC×+/+ BMMΦ

M-CSF : 10 ng/mL

RANKL : 100 ng/mL

図16

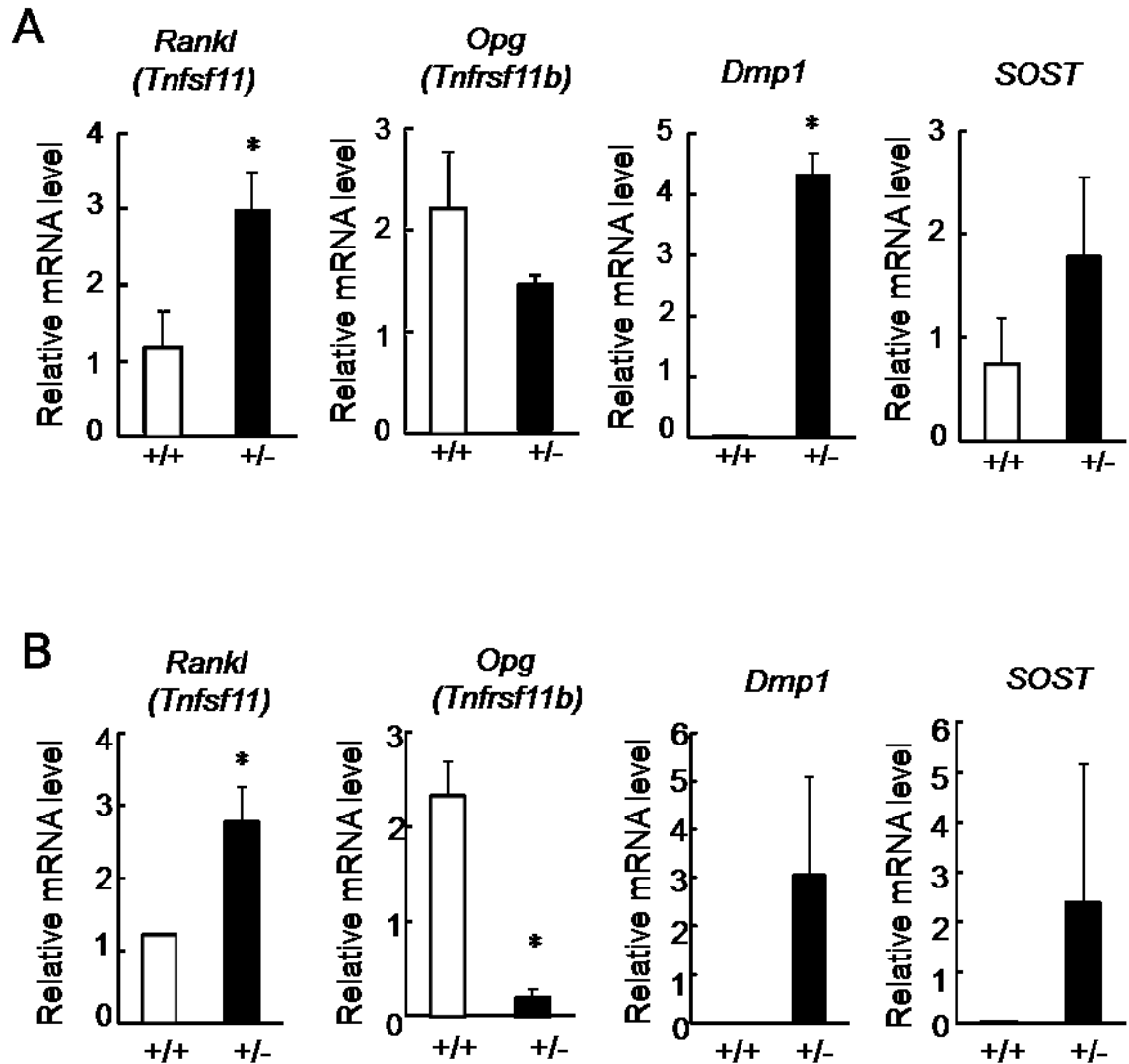


図 16 WT 及び *Gli1*^{+/-} マウスから採取した骨芽細胞の破骨細胞分化支持能比較

A 8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-} マウスの長管骨（大腿骨、脛骨）から採取した BMSC の破骨細胞分化支持マーカーの発現量

B 生後 1 日齢の WT 及び *Gli1*^{+/-} マウスの頭蓋骨から採取した *Opg* の破骨細胞分化支持マーカーの発現量

Rankl は破骨細胞への分化を促進し、*OPG* は分化を抑制する。

Dmp1 及び *SOST* は、骨芽細胞が成熟し骨細胞様細胞まで分化したことを示す遺伝子。

各遺伝子 N=3、mean±SD、* P<0.05 vs WT

図17

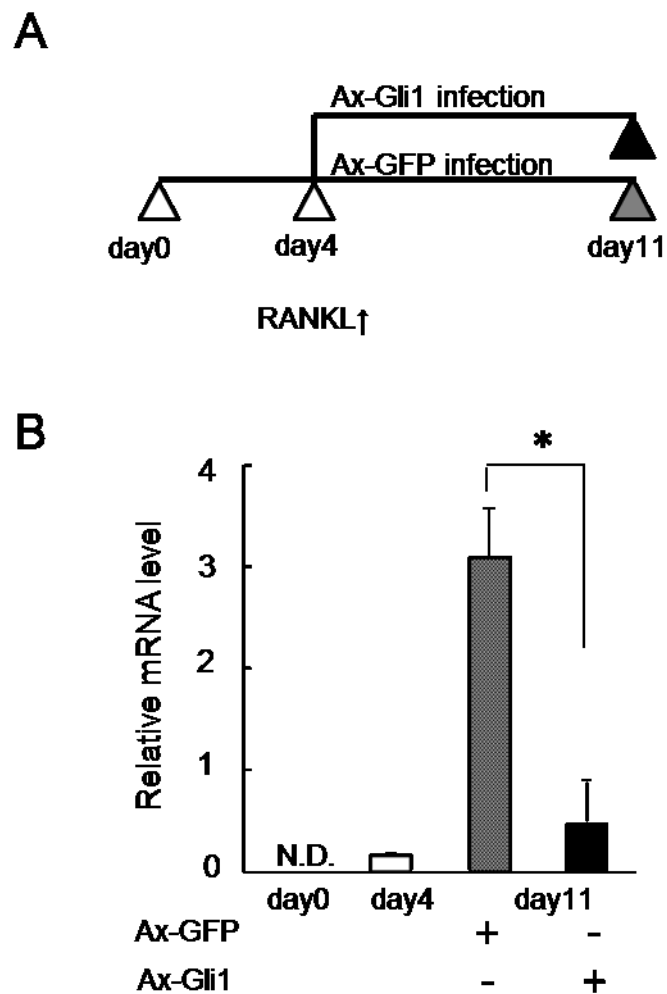


図 17 $Gli1^{+/-}$ マウスの BMSC に対する Gli1 強制発現による *Rankl* の発現量の変化

A $Gli1^{+/-}$ BMSC の培養開始から、*Rankl* 発現に合わせた Gli1 発現用アデノウイルスベクターと (Ax-Gli1) 投与及び評価のタイムスケジュール

B Real time RT-PCR による *Rankl* 発現量の変化

N=3、mean±SD、* $P < 0.05$ vs 比較対象

第 5 章

アデノウイルスベクターを用いた Gli1 の強制発現による 骨折モデルの回復過程に於ける rescue 効果に関する検討

5 - 1 材料と方法

5 - 1 - 1 骨折モデルに於けるアデノウイルスベクターの投与法

本検討に使用したアデノウイルスベクターは、3 - 1 - 4 に記載した通り、本研究用に新たに作製したベクターで、3 - 2 - 1 記載の通り、細胞レベルの実験では、本アデノウイルスベクターの投与により、Gli1 の強制発現が生じ、*Gli1*^{+/-}骨芽細胞の骨形成関連遺伝子の発現レベルが rescue されることを確認済みである。

骨折モデルは、8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスを使用し、2 - 1 - 1 記載のマウス脛骨骨折モデルを適用して作製した。骨折の外科的処置の翌日、イソフルレン吸入麻酔下において 10 μ L のアデノウイルスを、インスリン皮下投与用針付注射筒（BD ロードーズ（Becton, Dickinson and Company））を用いて骨折線領域に注入した。マウスの脛骨の場合、少量の注入でも液漏れが生じやすいため、刺入点は、皮膚切開部を避けた。針先が骨膜に当たった状態での注入は、注入液の反射による液漏れを誘発するので、針先を少し引いた（0.5～1.0 mm）位置で、骨折部周囲に

出来る限り遅い注入速度で実施した。Gli1 強制発現効果の比較対象用に、同量（10 μ L）の GFP 発現アデノウイルスベクターを注入した。

5-1-2 放射線学的解析

放射線学的解析は、2-1-2-2 記載のマイクロ CT システム、及び解析方法を用いて、2-2-1 記載の結果に基づき、術後 14 日の仮骨量を評価した。

5-1-3 組織学的解析

術後 14 日の骨折治癒状態を評価するために、1-1-4 記載と同様に、安楽死はペントバルビタールの腹腔内過剰投与により実施し、脛骨を採取し評価した。染色は 2-1-3 記載の方法で実施し、骨折線部の仮骨の組織学的解析を行い、アデノウイルスベクターによる Gli1 強制発現効果の評価した。

5-2 結果

5-2-1 骨折モデルの回復過程に対する Gli1 強制発現効果の放射線学的評価 骨折の回復過程の放射線学的評価

図 18 にアデノウイルスベクターを投与した骨折モデルのマイクロ CT による評価結果を示す。図 18A は、8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-}マウスにそれぞれ外科的処置で

骨折モデルを作製し、Gli1 発現用アデノウイルスベクター (Ax-Gli1) と GFP 発現用アデノウイルスベクター (Ax-GFP) の投与の有無による術後 14 日目の骨折部の回復過程の典型的マイクロ CT 画像を示している。Ax-Gli1 非投与群では、2-2-1 に記載した結果と同様、*Gli1*^{+/-}マウスの骨折部の仮骨形成量は、WT マウスと比較して明らかに小さい傾向が顕著である。しかし、*Gli1*^{+/-}マウスに Ax-Gli1 を投与すると WT と同等以上の仮骨の形成量となることが分かった。さらに WT マウスに於いて、Ax-GFP の投与有無による差は比較的小さいことから、アデノウイルスベクターの投与そのものによる影響は無視できる範囲と判断した。

図 18B は、*Gli1*^{+/-}マウスに対する Ax-GFP 投与群と Ax-Gli1 投与群の骨折部の縦断面と横断面のマイクロ CT 画像の典型例を示している。Ax-Gli1 投与により、仮骨形成量が大きだけでなく、仮骨部の骨量も高いことが観察された。

図 18C は、2-1-2-2 記載のマイクロ CT による解析方法によって、骨折部仮骨の形成量を定量的に解析したものである。定量的解析により、Ax-GFP 投与による仮骨形成量は若干低下する傾向にあるが、統計的有意差はないこと。さらに、Ax-Gli1 投与による効果は大きく、仮骨の断面積も、体積も、統計的有意差のある増加を示すことを確認した。

5-1-3 組織学的解析

図 19 は、2 - 2 - 1 記載と同様、放射線学的評価に続いて、同サンプルを脱灰処理し、骨折部の組織観察を行った結果を示す。上図中仮骨部の黒線枠内を拡大観察したものが下図である。マイクロ CT 観察結果と同様、Ax-Gli1 の投与によって、*Gli1*^{+/-}マウスの仮骨形成量の増大が顕著である。さらに、ヘマトキシリン・エオジン染色によって観察される皮質骨と同様の骨が骨折部を大きく囲む架橋仮骨（ハード仮骨）及び、アルシアンブルー染色によって観察される癒合部の結合仮骨（ソフト仮骨）の形成量が、共に大きく増大していることが明らかとなった。この結果、*Gli1*^{+/-}マウスの仮骨形成量が、WT マウスと同等レベルになっただけでなく、その構造も WT と非常に近似した状態となっていることが分かった。

5 - 3 小括

Gli1 を発現するアデノウイルスベクターを投与することによって、成体マウスに於ける先天的な Gli1 変異が救済されるかどうかを骨折モデルを用いて検証した。

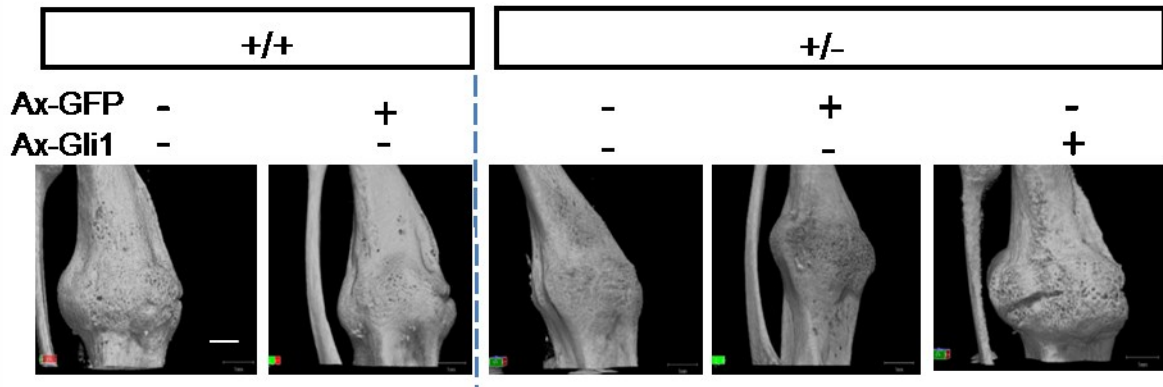
Gli1^{+/-} マウスで低下していた仮骨形成量が、Gli1 の強制発現によって、WT マウスレベルに増大、回復することがマイクロ CT 観察によって確認できた。

さらに、組織観察の結果、*Gli1*^{+/-} マウスで低下していたハード仮骨、ソフト仮骨の形成量が共に増大し、WT マウスレベルまで回復、仮骨の量だけでなく、その構造も WT に類似していた。

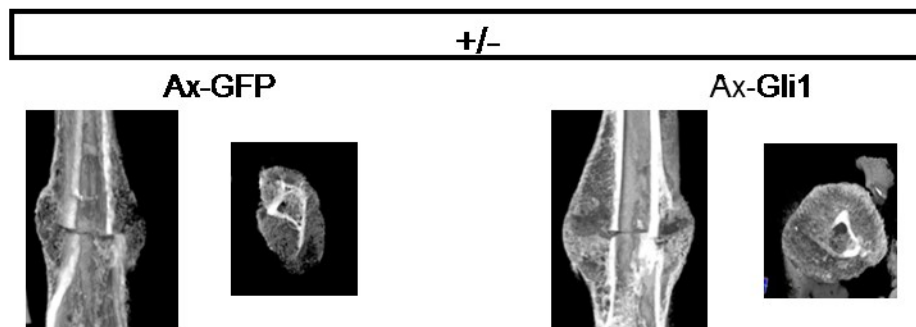
以上の結果、骨折の治癒過程で寄与する軟骨内骨化、及び膜性骨化双方の形成能が Gli1 の発現によって回復し、先天的な *Gli1* の欠損による異常な治癒過程を救済できることを *in vivo* レベルで確認した。

図18

A



B



C

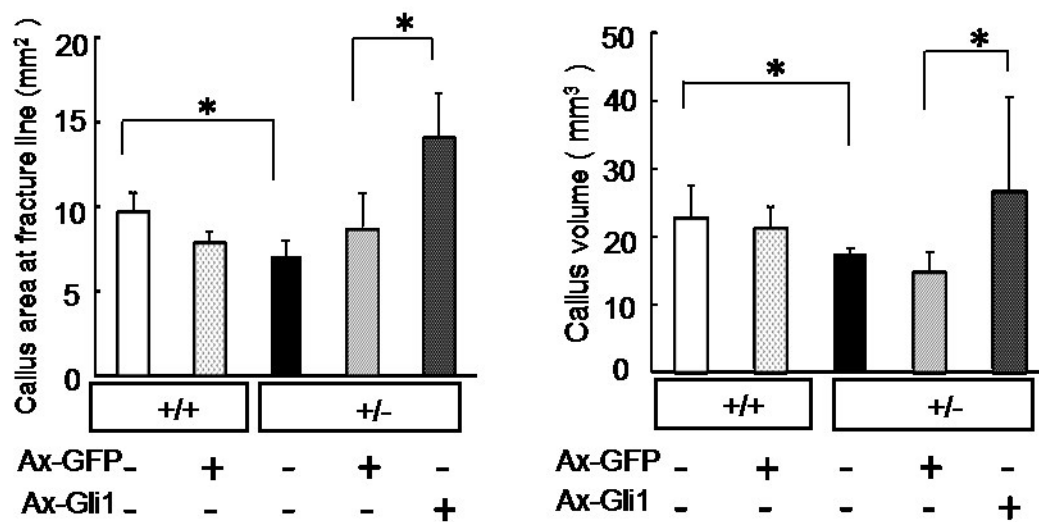


図 18 骨折モデルの回復過程に於ける Gli1 強制発現のマイクロ CT 評価結果

- A 8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-} マウスを用いた骨折モデルに対して、Gli1 発現用アデノウイルスベクター (Ax-Gli1) と GFP 発現用アデノウイルスベクター (Ax-GFP) の投与有無による術後 14 日目の骨折部の回復過程の典型的マイクロ CT 画像。 Bar : 1 mm
- B *Gli1*^{+/-} マウスに於ける Ax-GFP 投与群と、Ax-Gli1 投与群の術後 14 日目の骨折領域の縦断面と横断面の典型的マイクロ CT 画像
- C WT 及び *Gli1*^{+/-} の Ax-GFP 及び Ax-Gli1 の有無による仮骨形成量 (骨折部仮骨断面積及び骨折線 ± 1.5 mm 領域の仮骨体積の定量評価
各条件共に N=5、mean ± SD、* P < 0.05 vs 各比較対象

図19

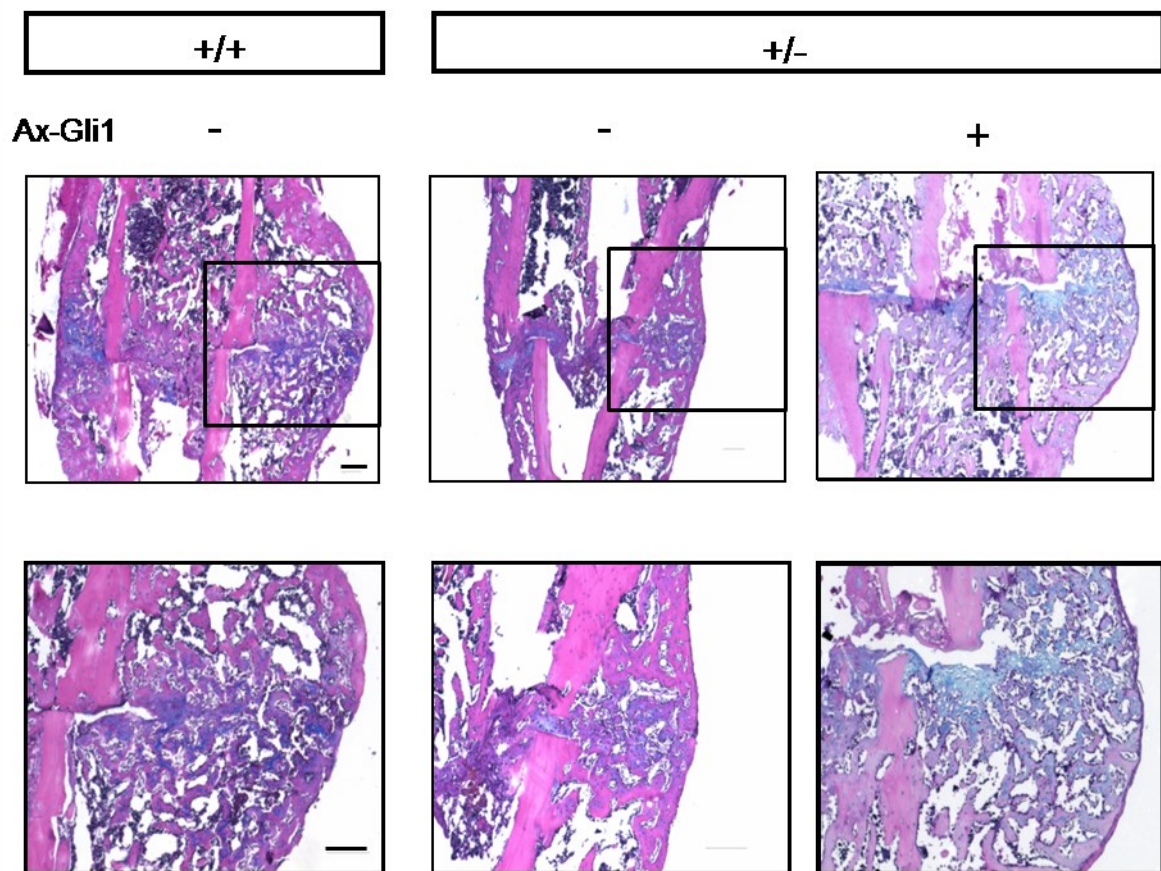


図 19 骨折モデルの回復過程に於ける Gli1 強制発現の組織観察結果

8 週齢の WT 及び *Gli1*^{+/-} マウスを用いた骨折モデルに対して、Gli1 発現用アデノウイルスベクター (Ax-Gli1) の投与有無による術後 14 日目の骨折部の回復過程の骨折部の組織観察図 (ヘマトキシリン・エオジンとアルシアンブルーのダブル染色)

上図中仮骨部の黒線枠内を拡大観察したものが下図

Bar : 200 μ m

第 6 章 考察

本研究から得られた主な知見は以下の 7 点である。

1. 成体マウスの生理的条件下で、*Gli1*^{+/-} マウスは WT マウスと比較して、体長、体重には差がないにも関わらず、明確な骨量低下を生じた。
2. *Gli1*^{+/-} マウスの骨量低下においては、骨形成能の低下と骨吸収能の亢進がみとめられ、アンカップリングな骨のターンオーバーを呈していた。
3. *Gli1*^{+/-} マウスは骨折の回復過程に於ける軟骨内骨化、及び膜性骨化双方の形成能が低下し、仮骨の形成量が障害された。
4. *Gli1* を欠損したマウス頭蓋冠細胞 (OP)、マウス骨髄間質系細胞 (BMSC) に於いては、細胞自律的に骨芽細胞の分化と成熟が障害された。
5. *Gli1* 欠損により、骨芽細胞から骨細胞様細胞への分化が進行し、この結果、破骨細胞支持能が亢進することによって、破骨細胞分化を促進することが示唆された。
6. Hh-Gli1 は、細胞自律的に、破骨細胞分化に関与しないことが分かった。
7. *Gli1*^{+/-} マウスを用いた骨折モデルに *Gli1* を発現するアデノウイルスベクターを投与することによって、骨折の回復過程で低下していた軟骨内骨化、及び膜性骨化双方の形成能が回復することを *in vivo* レベルで確認した。

本研究の結果は、Hh シグナルの下流で働く Gli1 が、骨芽細胞分化を促進するだ

けなく、骨芽細胞から骨細胞への成熟に抑制的にはたらくことで、成体における骨恒常性の維持に関与することを示唆している。

以下、本研究結果を項目別に考察する。

(1) 骨芽細胞の分化、成熟に対する Hh-Gli1 シグナルの作用について

Gli1 欠損によって骨芽細胞の分化、成熟が障害され、骨形成能が低下するが、同時に骨細胞様細胞のマーカー (*Dmp1*, *Sost*) が上昇し、破骨細胞支持能の指標となる *Rankl* の発現が亢進した。ここで、*Gli1* 欠損による骨芽細胞の分化、成熟が障害されながら、骨細胞様細胞のマーカー (*Dmp1*, *SOST*) が上昇した原因としては、以下の2つのメカニズムが考えられる。1つ目は、骨芽細胞の分化、成熟速度の亢進。2つ目は、骨芽細胞の分化、成熟プログラムの異常である。1つ目のメカニズムの場合は、*Gli1*^{+/-}細胞に於いて、*Dmp1*, *Sost* だけでなく、*Alp*, *Ibsp*, *Runx2*, *Sp7*や *Bglap* の発現も上昇する筈であるが、逆に低下していた。したがって、2つ目のメカニズムである骨芽細胞の分化、成熟プログラムの異常が生じた可能性が高い

Gli1 は、*Gli2* 及び *Gli3* と共同で、軟骨膜に存在する骨軟骨前駆細胞に対して、*Runx2* 非依存的に初期分化に関与することが分かっている[13]。一方、*Sp7*陽性細胞における Hh シグナル活性の除去は骨芽細胞分化には影響しないことから[29]、

Hh シグナルは、*Sp7*陽性以降の骨芽細胞分化には必要ないと考えられてきた。ところが、本研究の *Gli1*^{+/-} マウスの表現型、および *in vitro* 解析の結果は、*Gli1* が骨芽細胞初期分化促進作用に加えて、骨芽細胞から骨細胞への分化に対する抑制作用を有することを示唆している。つまり、*Gli1* 欠損は、Gli1 の二つの作用（一骨芽細胞初期分化促進作用と骨細胞分化抑制作用）の破綻へとつながり、骨芽細胞の分化・成熟の障害と骨細胞への分化促進をきたすと考えられる。*Gli1* 欠損による骨芽細胞分化の障害の詳細なメカニズムに関しては、今後さらなる検討が必要である。特に、骨芽細胞遺伝子に於ける Gli1 の結合領域をゲノムワイドで明らかにすることは必須であると考えられる。

（２）成体骨代謝における破骨細胞形成及び骨芽細胞－破骨細胞カップリングにおける Hh シグナルの作用について

大庭らは、*PTCH1* の変異が原因である基底細胞母斑症候群の患者と *Ptch1*^{+/-} マウスに於いて、骨量が増加することを示しているが[15]、Mak らによれば、*Bglap* 陽性細胞特異的 *Ptch1* 変異マウスでは骨量が低下する[29]。この二種のマウスの骨の表現型は逆の結果となっているが、細胞レベルでは、どちらのマウスにおいても骨芽細胞分化、破骨細胞分化が亢進している。表現型が異なるのは、そのバランスに差が生じている為と考えられる。これら先行研究と本研究の結果は共に、成体に

における Hh シグナルの直接的な骨芽細胞分化促進作用を支持する点で一致している。

一方、成体における破骨細胞分化における Hh シグナルの役割については、未だ不明な点が多い。本研究では、*Gli1* を欠損した骨芽細胞-骨細胞系において、破骨細胞支持能の指標となる *Rankl* の発現が亢進した。*In vitro* の検討で、破骨細胞分化は Hh-Gli1 の影響を受けなかったことと併せると、*Gli1*^{+/-} マウスに於ける破骨細胞数の増加による骨吸収能の上昇は、骨芽細胞・骨細胞が発現する *Rankl* を介した間接的反応であることを示唆している。上述の大庭ら及び Mak らの結果も、Hh が骨芽細胞を介して間接的に破骨細胞形成を制御していることを示している。

Gli1^{+/-} 細胞における *Rankl* の発現上昇については、(1) で述べた骨細胞への分化促進に加えて、*Gli1* が直接的に *Rankl* の発現を負に制御する機構の存在も考えられる。実際、*Gli1*^{+/-} マウスの BMSC に *Gli1* 発現用アデノウイルスベクターを感染させて、*Gli1* の発現を回復させると、*Gli1*^{+/-} 細胞で見られる *Rankl* の発現上昇が消失した。*Gli1* が直接的に *Rankl* の転写制御に関わっているかという点については、前述のゲノムワイドな *Gli1* の結合領域の探索が有用であると考えられる。

ここまで述べてきた、Hh シグナルによる骨芽細胞分化制御を介した間接的な破骨細胞形成制御に加えて、直接制御の存在や破骨細胞形成へ寄与しないことを示唆する報告も存在する。Heller 等は、*Smo* の阻害により細胞自律的に破骨細胞分化が低下するとしている[30]。また、Joeng 等は、*Sp7* 陽性細胞で *Gli2* を活性化する

と、骨芽細胞の分化及び機能が障害されるものの、破骨細胞の数と機能は正常に保たれ、骨量減少が生じることを示した[31]。さらに、彼等の実験では、*Ptch1* も *Gli1* も発現が上昇、即ち Hh シグナルが活性化した状態で骨量が減少しているが、我々の研究では、*Gli1* 欠損による Hh シグナルが抑制された状態で骨量が減少している。このように、骨芽細胞－破骨細胞カップリングとその骨量維持作用における Hh シグナルの役割については、一見矛盾する結果が複数得られており、未だ議論の余地がある。この点を総合的かつ論理的に理解するには、それぞれの研究で Hh シグナルが操作されている細胞種や実験条件の違いを考慮した上で、Hh シグナルの作用対象と時期や、他の関連因子との相互作用を含めて明確にしていくことが必要であると考えられる。

(3) 骨折モデルに於ける Hh-Gli1 シグナルの作用について

本研究では、骨折モデルの治癒過程を評価することによって *Gli1* の骨恒常性に対する影響を示した。*Smo* 欠損マウスの骨の治癒過程を評価した先行論文[32]も、*Gli1*^{+/-} マウスに於ける低仮骨形成を示した本研究結果とよく一致している。しかし、*Gli1*^{-/-} 胎仔の軟骨の成長は障害されない[12]ことから、本研究結果の *Gli1*^{+/-} マウスに於けるソフト仮骨の形成量の低下は意外な結果ともいえる。また、軟骨形成に於いては、Gli3 抑制型の関与が、他の Gli よりも大きいことが示されている[10]。

以上のことを考慮すると、軟骨形成に対する Gli1 の作用も胎生期と成体では異なる可能性があり、生理的状态と病的状態でも異なる可能性もある。Gerstenfield らは、骨折のような病態時に於いては、軟骨の急速な増殖・形成を必要とするとしている[17]。このような状況においては、胎生期と異なり、Gli1 をはじめとする活性型 Gli を必要とする可能性が考えられる。

(4) 成体に於ける Hh リガンド産生細胞について

さらに、成体での Hh シグナルの作用については Hh リガンドのソースについて考慮する必要がある。Maeda らは、成長板軟骨からの Ihh 分泌が、マウスの生後の海綿骨の維持に必要であることを示した[33]。また、ヒトでは、骨髄の Col I 陽性細胞が Ihh を発現している[34]。ソフト仮骨で発現する Ihh[35]も骨膜や骨芽細胞や骨細胞で発現する Shh[36,37]も骨折治癒には重要な因子である。Hh シグナルは成体の骨格維持に作用しているが、動物種によっては、成長板は成長後に閉じてしまう為、成長板軟骨以外の Hh の発生源を同定していくことも今後の課題である。

(5) 結論

本研究は、Hh-Gli1 シグナルが、胎生期だけでなく、成体の骨の恒常性維持に重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、骨芽細胞と破骨細胞のカップ

リング反応に作用し、リモデリングのバランスを大きく左右する因子であることも示唆された。一方で、上記の如く、Gli2 や Gli3 という他の Gli ファミリーとの関係や、標的遺伝子と作用時期による影響など、解決すべき課題は多い。また、1 – 2 – 1 に記載したように、*Gli1*^{-/-} マウスは全身的影響が大きかった為、本研究は全て *Gli1*^{+/-} マウスを使用して検討を行ったが、あくまで外見的特徴から全身的影響が少ないと判断しただけである。従って、*Gli1*^{+/-} マウスに於いて、全身的影響が完全に除外されている保証はない。全身的影響の完全除外には *Gli1 flox* マウスを作製し、骨芽細胞特異的に *Gli1* を欠損させる必要がある。しかしながら、そのような変異マウスに関する報告は、渉猟しえた範囲では現状存在せず、今後の検討課題の一つである。しかし、本研究によって、Gli1 による成体の骨恒常性維持機構の一端が明らかになったことに加えて、今まで相反すると見られた表現型を論理的に理解するための糸口になると考えられる。これらの理解と、その理解に基づく Hh シグナルの作用時期も含めた精密制御が骨関連疾患の治療や予防戦略の分子的基盤になると期待される。

謝辞

本研究は、東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 臨床医工学部門にて行いました。本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇篤な御指導、及び貴重なご助言を賜りました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻長口腔外科学分野 高戸毅教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、4 年間にわたり終始御懇篤な御指導、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（医学系研究科兼担）鄭雄一教授、大庭伸介特任准教授に謹んで感謝申し上げます。

最後に、臨床医工学部門において、各種実験の技術的指導と貴重なご助言を賜りました University of Southern California 北條宏徳博士、獨協医科大学 小宮山雄介博士、東京大学医学部附属病院ティッシュエンジニアリング部 骨・軟骨再生医療講座 矢野文子博士、をはじめ諸先生方に厚く感謝申し上げます。

参考文献

1. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* Oct 30;287(5785):795-801
2. Ingham PW, McMahon AP (2001) Hedgehog signaling in animal development ; paradigms and principles. *Genes Dev* 15:3059-3087
3. Kronenberg HM (2003) Development regulation of the growth plate. *Nature* 423:332-336
4. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13: 2072-2086.
5. Chung UI, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM (2001) Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* 107: 295-304.
6. Long F, Chung U I, Ohba S, McMahon J, Kronenberg H M, et al. (2004) Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 131: 1309-1318.
7. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, et al. (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of

- osteoblasts. *Cell* 89: 755-764.
8. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, et al. (1997) *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765-771
 9. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, et al. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* Oct 3;383(6599):407-13.
 10. Hilton MJ, Tu X, Cook J, Hu H, Long F (2005) *Ihh* controls cartilage development by antagonizing *Gli3*, but requires additional effectors to regulate osteoblast and vascular development. *Development* 132: 4339-4351
 11. Joeng KS, Long F (2009) The *Gli2* transcriptional activator is a crucial effector for *Ihh* signaling in osteoblast development and cartilage vascularization. *Development* 136: 4177-4183
 12. Park HL, Bai C, Platt KA, Matise MP, Beeghly A, et al. (2000) Mouse *Gli1* mutant are viable but have defects in *Shh* signaling in combination with a *Gli2* mutation. *Development* 127: 1593-1605.
 13. Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, et al. (2012) *Gli1* protein participates in hedgehog-mediated specification of osteoblast lineage during endochondral ossification.

J Biol Chem 287: 17860-17869.

14. Hojo H, Ohaba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, et al. (2013) Hedgehog-Gli Activators Direct Osteo-chondrogenetic Function of Bone Morphogenetic Protein toward Osteogenesis in the Perichondrium. J Biol Chem 288: 9924-9932
15. Ohba, S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, et al. (2008) Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. Dev Cell 14: 689-699.
16. Shimoaka T, Kamekura S, Chikuda H, Hoshi K, Chung UI, et al. (2004) Impairment of bone healing by Insulin receptor substrate-1 deficiency. J Biol Chem 279: 15314-15322.
17. Louis C. Gerstenfeld, Dennis M. Cullinace, George L. Barnes, Dana T. Graves, Thomas A. Einhorn (2003) Fracture Healing as a Post-Natal Developmental Process: Molecular, Spatial, and Temporal Aspects of Its Regulation. J Cellular Biochem 88: 873-884
18. Ogata N, Chikazu D, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, et al. (2000) Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. J Clin Invest 105: 935-943
19. Akune T, Ogata N, Hoshi K, Kubota N, Terauchi Y, et al. (2002) Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of

osteoblasts. *J Cell Biol* 159: 147-156

20. Maeda Y, Hojo H, Shimohata N, Choi S, Yamamoto K, Takato T, Chung UI, Ohba S (2013) Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials*. Jul;34(22): 5530-7
21. Kugimiya F, Kawaguchi H, Kamekura S, Chikuda H, Ohba S, et al. (2005) Involvement of endogenous bone morphogenetic protein (BMP) 2 and BMP6 in bone formation. *J Biol Chem* 280: 35704-35712.
22. Zhang X, Peterson KA, Liu XS, McMahon AP, Ohba S. (2013) Gene regulatory networks mediating canonical Wnt signal directed control of pluripotency and differentiation in embryo stem cells. *Stem Cells* 31(12): 2667-2679.
23. Tenzen T, Allen BL, Cole F, Kang JS, Krauss RS, et al. (2006) The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell* 10(5): 647-656
24. Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3 β floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124, 1313-1322.
25. Ogasawara T, Katagiri M, Yamamoto A, Hoshi K, Itaka K, et al. (2004a) Osteoclast differentiation by RANKL requires NF-kappaB-mediated downregulation of cyclin

- dependent kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res* 19: 1128-1136.
26. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, et al. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20: 345-357.
27. Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, et al. (2000) Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 141: 3478-3484.
27. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Ohhara M, et al. (2011) Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17: 1231-1234.
28. Rodda SJ, McMahon AP (2006) Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 133: 3231-3244
29. Mak KK, Bi Y, Wan C, Chuang PT, Clemens T, et al. (2008) Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression. *Dev Cell* 14: 674-688.
30. Heller E, Hurchla MA, Xiang J, Su X, Chen S, et al. (2012) Hedgehog signaling inhibition blocks growth of resistant tumors through effects on tumor microenvironment.

Cancer Res 72: 897-907.

31. Joeng KS, Long F (2013) Constitutive activation of Gli2 impairs bone formation in postnatal growing mice. PLoS One 8: e55134.
32. Wang Q, Huang C, Zeng F, Xue M, Zhang X (2010) Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stemcells induces bone formation in vivo. Am J Pathol 177: 3100-3111.
33. Maeda Y, Nakamura E, Nguyen MT, Suva LJ, Swain FL, et al. (2007) Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 6382-6387.
34. Nakase T, Miyaji T, Kuriyama K, Tamai N, Horiki M, et al. (2001) Immunohistochemical detection of parathyroid hormone-related peptide, Indian hedgehog, and patched in the process of endochondral ossification in the human. Histochem Cell Biol 116: 277-284.
35. Vortkamp A, Pathi S, Peretti GM, Caruso EM, Zaleske DJ, et al. (1998) Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. Mech Dev. 71: 65-76.
36. Miyaji T, Nakase T, Iwasaki M, Kuriyama K, Tamai N, et al. (2003) Expression and distribution of transcripts for sonic hedgehog in the early phase of fracture repair.

Histochem Cell Biol 119: 233-237.

37. Horikiri Y, Shimo T, Kurio N, Okui T, Matsumoto K, et al. (2013) Sonic hedgehog regulates osteoblast function by focal adhesion kinase signaling in the process of fracture healing. PLoS One 8: e76785.