

# 骨芽細胞の分化と機能

田村 正人

鹿児島大学歯学部口腔生化学講座

## Differentiation and function of osteoblast

Masato Tamura

Department of Oral Biochemistry,  
Kagoshima University Dental School,  
35-1, Sakuragaoka 8-chome, Kagoshima, 890-8544, Japan

### Abstract

Elucidation of molecular mechanisms controlling differentiation and function of osteoblasts is one of the major subjects in bone biology. Differentiation of cells is controlled at the level of transcription by various classes of transcription factors that have been identified through biochemical and genetic means. I showed an expression of rat osteocalcin gene in osteoblasts was mediated by basic helix-loop-helix (bHLH) type of transcription factors. Our study presented evidence that the E-box sequence, OCE1, and transcription factors interacting with this motif, are involved in osteoblast-specific osteocalcin gene transcription. Furthermore, I performed degenerate PCR cloning in order to identify cDNA clones encoding bHLH proteins expressed in osteoblasts. We got clones which sequences in the amplified region were homologous to the mouse twist-related HLH protein, Dermo-1. Dermo-1 mRNA was expressed in osteoblast-like cell lines, and could be involved in the osteoblastic differentiation in a negative manner.

Current many studies using gene deficient mice revealed how osteoblast differentiation and bone remodeling are controlled through many other type of transcription factors, Cbfa1 and homeobox protein family. Karsenty et al. showed that Cbfa1 is necessary for differentiation of mesenchymal progenitor cells to osteoblasts, and Cbfa1 controls bone formation by differentiated osteoblasts. Extracellular signals including hormones, growth factors, or cytokines as well as their intracellular mediators regulate osteoblast function. In this paper, I reviewed new understandings of the molecular control of osteoblast differentiation and function.

**Key words:** transcription factor, osteocalcin, helix-loop-helix protein, osteoblast, Cbfa1

## I. はじめに

骨は、石灰化した硬い組織であり骨格系の骨組みを形作るとともに、生体内のカルシウム恒常性を維持する代謝系の一つの臓器である。骨の細胞は、骨形成を司る骨芽細胞（いわゆる骨細胞を含む）と骨吸収の役割を果たす破骨細胞という主に2種類の細胞から成る。これら2つの細胞がどのように分化してできるか、ならびにそれらの細胞の機能がどのように調節されているかを解明することは、発生過程のみならず生体における骨の生理的な機構を理解するために重要である。「骨形成」とは、狭義には発生における骨格形成といった骨芽細胞の分化をいうが、広義には骨における細胞外基質の分泌とそれに引き続いて起こる石灰化といった骨芽細胞の機能を含めて用いる場合もある。ここでは、後者を「骨芽細胞の機能」として、前者の「骨芽細胞の分化」とは分けて論じる。

発生過程において、骨形成の様式には内軟骨性骨化と膜性骨化という二つの異なった様式がある。内軟骨性骨化では、将来、骨になるべきところに一時的に軟骨ができ、その軟骨中に血管が侵入し軟骨細胞がアポトーシスを起こし骨芽細胞に置き換わって骨が形成されるという様式である。以下の膜性骨化によらない部位の骨、特に長管骨はこの様式による。他方、膜性骨化は、一時的な軟骨を経ることなく、間葉系の前駆細胞が直接に骨芽細胞に分化して骨が形成されるしくみであり、頭蓋骨や顎骨などの骨はこの様式により形成される。

80年代初めには、硬組織、すなわち骨や歯に関する生化学的な研究は、他の軟組織の臓器に関する研究に比べて著しく遅れていた。その原因としては、石灰化組織からタンパク質の抽出が容易ではなかったこと、ならびに硬組織における細胞の分離・同定が難しかったことが挙げられよう。80年代になって、ようやく硬組織からタンパク質を可溶化して抽出できるようになり、基質タンパク質が次々に明らかになった。またその頃には、細胞培養技術によって骨から得られた細胞株が樹立され、細胞培養が可能になった。以降、多くのcDNAや遺伝子がクローニングされたこともあって培養という*in vitro*の系を用いて、骨形成に関する遺伝子発現解析の研究が盛んに行われた。しかしながら、長管骨の成長や、骨の石灰化、リモデリングといった個体レベルの骨形成の機構は、*in vitro*の研究から解明するのは容易ではない。90年代になり、ES細胞や遺伝子相同組み換え法を利用したgene target法が普及し、ある遺伝子だけを喪失させたいわゆるノック

アウトマウスの作製ができるようになり、種々の遺伝子のノックアウトにおける硬組織や骨格形成の異常が次々と明らかになってきた。すなわち*in vivo*の個体を用いた研究から、骨芽細胞の分化と機能に関する遺伝子の役割が推測できるようになった。本稿では、骨の形成機構に焦点を当て、骨形成を司る骨芽細胞の分化ならびにその機能に関して、筆者がこれまで行ってきた研究成果も交えて最近の知見について概説したい。

## II. 骨芽細胞とは？

骨芽細胞は、いわゆる間葉系の未分化な細胞から分化すると考えられている。培養条件下では、骨芽細胞の形質は線維芽細胞と非常によく似ており、唯一の特徴としては細胞外の石灰化が挙げられる。線維芽細胞と骨芽細胞の間で発現している遺伝子には、それほど差異はなく、骨形成という生体内で特異な機能を有する細胞であるにもかかわらず、その細胞自体が産生するタンパク質のうち細胞の特異性を規定するものは多くない。かつて、骨の石灰化には、骨芽細胞が産生するコラーゲン以外の基質タンパク質が何らかの機能を果たしていると考えられ、オステオカルシン (BGP, bone gla protein)<sup>1)</sup>、オステオネクチン<sup>2)</sup>、オステオポンチン<sup>3)</sup>、matrix gla protein (MGP)<sup>4)</sup>、骨シアロプロテイン (BSP)<sup>5)</sup>などが精製された。そして、これら非コラーゲン性基質タンパク質は、骨の石灰化に必須であろうという仮説が80年代に提唱された。しかしながら、これまで報告されている骨芽細胞が特異的に産生する基質タンパク質としては、オステオカルシンのみであり、後述するノックアウトの実験から、その仮説は否定された。また、後述する転写調節因子の一つであるCbf1は骨芽細胞で特異的な発現をしている。

オステオカルシンは、血中の量を骨代謝のマーカーとしても利用されるタンパク質である。ビタミンK欠乏動物で骨吸収が抑制されることからオステオカルシンは骨吸収に機能しているのではという予想がされていた。Karsentyらは、このオステオカルシンのノックアウトマウスを作製したところ、より多くの骨が形成されていたと報告している<sup>6)</sup>。すなわちオステオカルシンは骨形成には必須ではなく、骨形成と吸収のバランスに機能することが明らかになった。彼らはさらに詳細に検討を加え、個々の骨芽細胞の骨形成能力が増大していると指摘している。近年、MGPのノックアウトマウスも報告されたが、MGPの欠失において

も軟骨の成長板における石灰化亢進ならびに動脈血管壁の石灰沈着が観察されている<sup>7)</sup>。これらの報告から、オステオカルシンならびに MGP は、生理的には骨形成・石灰化を抑制する機能を有すると考えられるのである。

### Ⅲ. 骨芽細胞分化と HLH 型転写調節因子

近年、遺伝子クローニングにより遺伝子の転写開始点上流の解析が盛んに行われるようになった。そして、多くの転写調節因子がクローニングされてきた。細胞分化の過程では、遺伝子発現すなわち核内で転写を調節する機能を有する転写調節因子が重要な働きをすることが、多くの例から明らかになっている。骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋肉細胞、線維芽細胞などの中胚葉由来細胞に分化する能力を有する前駆細胞が、いわゆる未分化間葉系細胞である。細胞分化においては、一般に分化するに伴って、段階的に分化しうる細胞が限定されていく。例えば、分化段階の低い細胞は5種類の細胞に分化しうるが、さらに分化段階が進むと最終的に2種類の細胞にしか分化できないというように、細胞分化振り分けの多段階機構がある。血液細胞の分化振り分けの機構は、これまでに非常に多くの研究がなされ、未分化段階、分化の中間段階そして最終分化段階と、細胞の分化方向の決定を行なう転写調節因子によって、それぞれの分化段階を規定することが報告されている。血液系細胞の分化においては、ロイシンジッパー型、GATA 型、ラントドメイン型、ヘリッ

クス-ループ-ヘリックス (HLH) 型など、構造が異なる転写調節因子群が分化段階に応じて協調的に機能することが報告されている<sup>8)</sup>。

なかでも、HLH 型転写調節因子群は細胞分化に関わるとして注目され、特に骨格筋細胞、神経細胞などの系で盛んに研究が展開されてきた。骨芽細胞と前駆細胞を同一とする骨格筋細胞では MyoD, myogenin, Myf-5, MRF-4 の4つの HLH 型転写調節因子は、myosin や muscle creatine kinase 等の骨格筋細胞に特異的に発現する遺伝子の転写を活性化し、お互い協調的に機能して分化を進行させる。また、これらの HLH 型因子を線維芽細胞に強制発現させると骨格筋細胞に分化させることができ、骨格筋分化におけるいわゆる「マスター遺伝子」ということができる<sup>9)</sup>。筆者は、骨芽細胞分化においても、この「マスター遺伝子」として機能する転写調節因子を見出すことを目的とした研究を行ってきた。

筆者らは、骨肉腫由来である骨芽細胞様細胞 ROS17/2.8 を用い、ラットオステオカルシン遺伝子のプロモーターを用い HLH 型因子の骨芽細胞分化における役割を検討した。MyoD 等の HLH 型因子は、組織非特異的に存在する E12, E47 といった分子とヘテロダイマーを形成して、遺伝子の転写開始点上流の CANNTG という E-box と呼ばれるコンセンサス配列の領域に結合して、転写活性を促進する。しかしながら、Id (Inhibitor of differentiation) という basic 領域を欠いた HLH 型因子は、MyoD 等の正の HLH

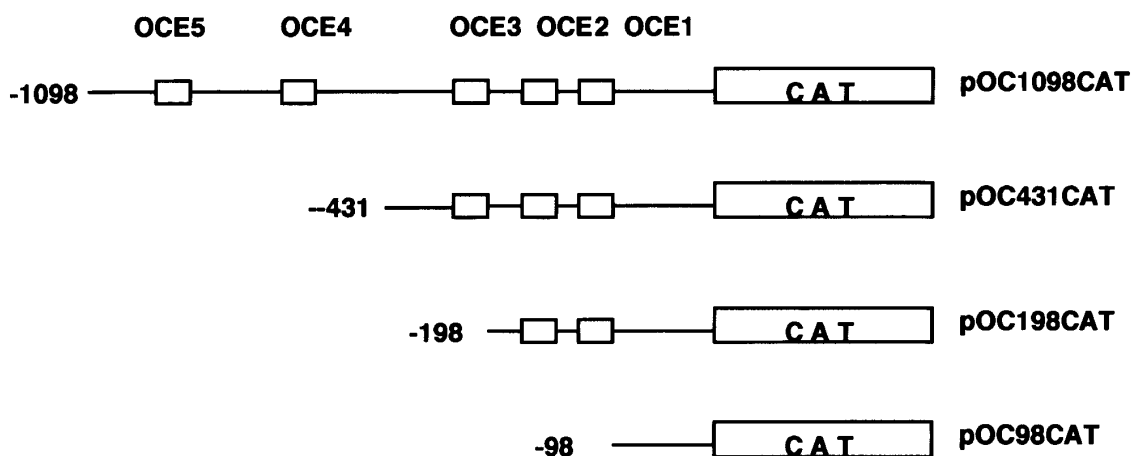


図1 種々の長さのラットオステオカルシン遺伝子プロモーターを挿入した CAT レポータープラスミドのコンストラクト。5' の数字は転写開始点を 0 としたプロモーターの長さを示し、ボックスは OCE1 から OCE5 までの E-box を示す。

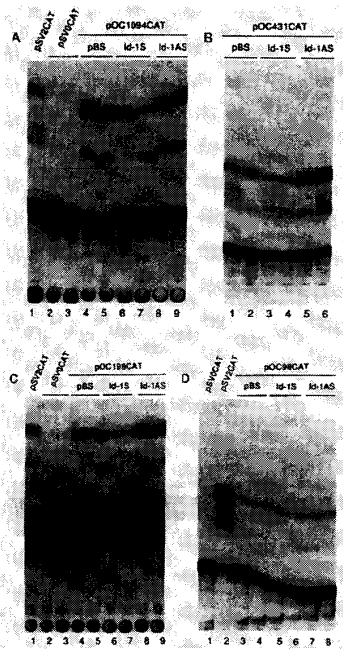


図2 ラットオステオカルシン遺伝子プロモーター活性の Id-1 による抑制効果 種々の長さのラットオステオカルシン遺伝子プロモーターを挿入した CAT レポータープラスミドならびに Id-1 のセンス、アンチセンス発現ベクターを ROS 17/2.8 細胞に共トランスフェクションした後、CAT 活性を測定した。

型因子とヘテロダイマーを形成し E-box への結合能を失い、細胞分化を抑制する<sup>10)</sup>。そこで、この分化抑制活性を有する Id-1 の発現ベクターを、ROS17/2.8 細胞にトランスフェクトして強制発現させる実験を行ったところ、ラットオステオカルシンのプロモーターの転写活性が低下することを見いだした(図1, 2)<sup>11)</sup>。すなわち、この結果はオステオカルシン遺伝子のプロモーターの転写活性に、HLH 型の転写調節因子が作用していることを示すものである。

ラットのオステオカルシン遺伝子の転写開始点上流には、いくつかの E-box 領域がある。筆者らは、転写開始点近傍にあるものから順に OCE1, OCE2, OCE3, OCE4, OCE5 と名付け、どの領域が Id-1 に応答するかを、種々の欠失ならびに部位特異的変異を用いた解析により同定した。すなわち、図1に示す種々の長さのコンストラクトを作製し、CAT アッセイを行った。-198 までのプロモーターを含むレポーターでは、Id-1 により活性は低下したが、pOC98CAT では Id-1 によって活性が低下しないことから、-198 から-98 の部位に存在する OCE1 もしくは OCE2 がこの応答に関与することが考えられた(図2)。そこで、OCE1 ならびに OCE2 の部位の塩基配列を変異させたプロモーターを作製し、CAT アッセイを行ったところ、OCE1 の変異によって活性の著しい低下を示した(図3)。以上の結果は、骨芽細胞においてオステオカルシン遺伝子プロモーターの OCE1 領域に

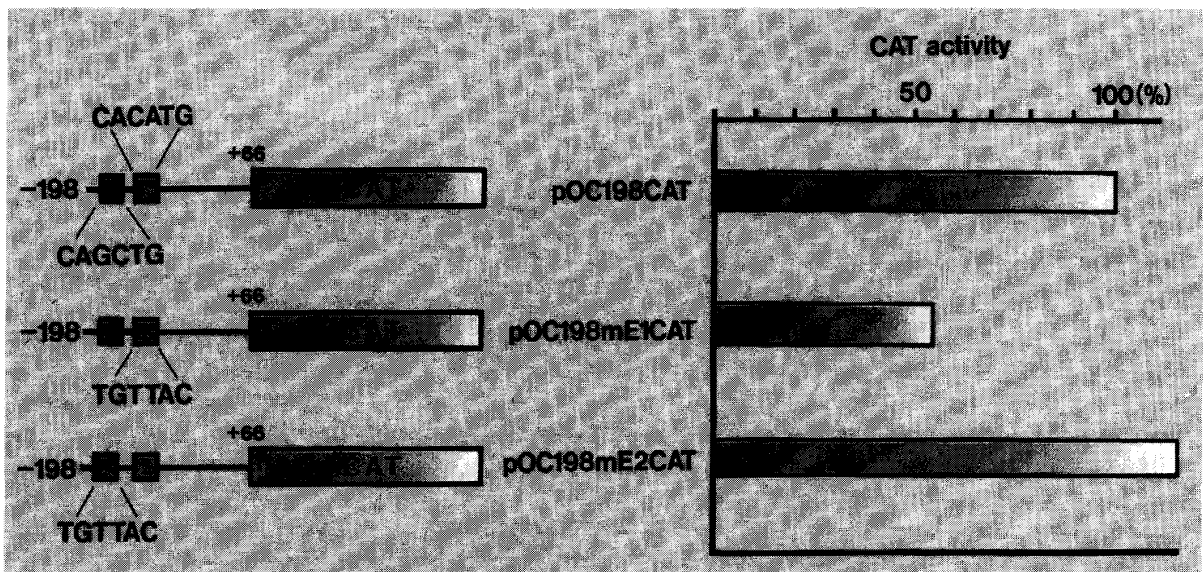


図3 ROS17/2.8 細胞における OCE1, OCE2 領域の変異の転写活性化に及ぼす効果 OCE1 および OCE2 領域の E-box の塩基配列を CANNTG から TGTTAC に置換させた pOC198E1CAT ならびに pOC198E2CAT を作製し、これらを ROS17/2.8 細胞にトランスフェクション後、CAT 活性を測定した。

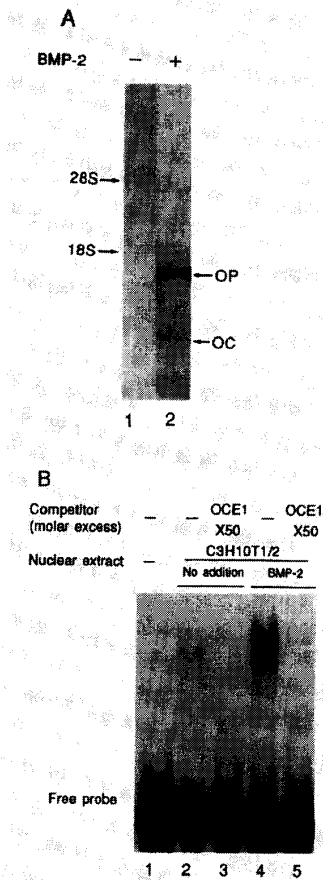


図4 C3H10T1/2細胞におけるヒト組換え BMP-2 のオステオカルシン mRNA の発現と核抽出物の OCE1 との結合活性 (A) C3H10T1/2 細胞に 500ng/ml の rhBMP で 72 時間処理した後、RNA を抽出し、オステオカルシン及びオステオポンチン mRNA の発現を Northern Blot によって調べた。(B) (A) と同様に rhBMP で 72 時間処理した C3H10T1/2 細胞から核抽出物を得、放射性標識した OCE1 プローブを用い、ゲルシフトアッセイを行った。

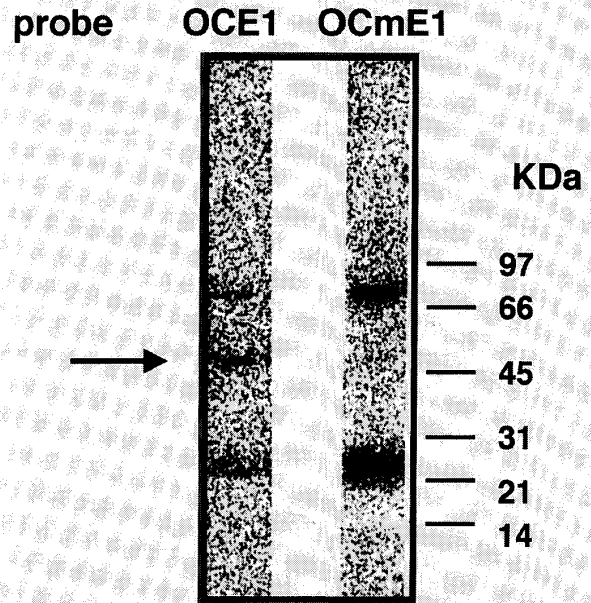


図5 Southwestern 解析による ROS17/2.8 細胞の OCE1 結合タンパク質 ROS17/2.8 細胞の核抽出物を SDS-PAGE した後、放射性標識した OCE1 ならびに E-box の塩基配列を CANNTG から TGTAC に置換させた OCmE1 プローブを用いサウスウエスタン解析を行った。矢印で示したバンドが OCE1 プローブに対して、特異的な結合を示す。

HLH 型の転写調節因子が作用していることを示している<sup>11)</sup>。

更に、ゲルシフトアッセイを行い、ROS17/2.8 の核抽出物に OCE1 に特異的に結合するタンパク質 (OCEBP と名付けた) の存在を示した。この結合は線維芽細胞 C3H10T1/2 では見られないが、培地中に組換えヒト骨誘導タンパク質 (rhBMP)-2 を添加し骨芽細胞に分化させ、オステオカルシンやオステオポンチン mRNA を産生する細胞から抽出した核抽出物では、結合が観察された<sup>11)</sup> (図 4)。競合実験により、この OCEBP が多くの細胞に普遍的に存在する E12/E47 とは異なる骨芽細胞特異的な HLH 型転写

因子である可能性があると考えられた<sup>11)</sup>。サウスウエスタン法によって、この OCEBP の分子量は 50KDa 付近であることがわかった (図 5)。basic HLH 型転写調節因子のオステオカルシンプロモーターの OCE1 への転写活性化の模式図を図 6 に示した。

次に、筆者らは、骨芽細胞特異的な HLH 型因子を探索するため、既知の HLH 型因子の basic HLH の領域の共通塩基配列をもとに PCR プライマーを設計し、RT-PCR 法を用いて ROS17/2.8 細胞の cDNA ライブラリーより cDNA のクローニングを行った<sup>12)</sup>。いくつか得られたクローンの塩基配列を決定したところ、マウスの Dermo-1 という HLH 型因子のラットホモログと考えられるクローンを得た。Northern Blot 法を用いて、骨芽細胞分化と Dermo-1 mRNA の発現との相関を調べたところ、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 は培養経過時間の増加につれて石灰化を伴う骨芽細胞分化が進行するが、それに伴い Dermo-1 の mRNA の発現は低下した (図 7)。また、線維芽細胞 C3H10T1/2 の培地中に組換え hBMP-2 を添加し、骨芽細胞に分化させると Dermo-1 の

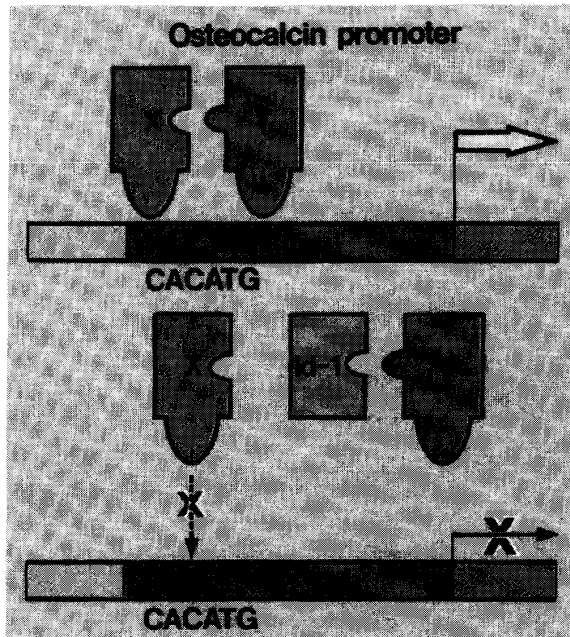


図6 basic HLH 型転写調節因子のオステオカルシンプロモーターの OCE1 への転写活性化  
basic HLH 型転写調節因子の X と Y は、CANNTG モチーフにホモもしくはヘテロダイマーで結合し転写を活性化する。DNA 結合領域を欠く Id が、basic HLH 型転写調節因子とヘテロダイマーを形成すると CANNTG モチーフに結合できず、転写を活性化することができない。

mRNA の発現は低下した (図7)<sup>12)</sup>。これらの結果は、骨芽細胞分化においてはある種の HLH 型転写調節因子は分化方向の逆に作用することを示すものである。Dermo-1 のターゲットとなる遺伝子はまだ見出されておらず、今後、これら転写調節因子のターゲット遺伝子を明らかにするべく研究を行っている。

#### IV. 骨芽細胞分化と runt ドメインを有する転写調節因子

Karsenty のグループは、マウスオステオカルシン遺伝子を用いて、その骨芽細胞特異的な発現に関与する領域を2つ同定し、OSE (osteoblast-specific cis-acting element) 1, 2 と名付け、OSE2 に結合する転写調節因子として Cbfa1 を同定した<sup>13)</sup>。Cbfa1 は、もともと急性骨髄性白血病の転座から見い出された PEBP のファミリーであり、ショウジョウバエの体節形成遺伝子の中のペアルール遺伝子の一つ runt と相同性がある。Runt は runt ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインをもつ転写調節因子であり、ショ

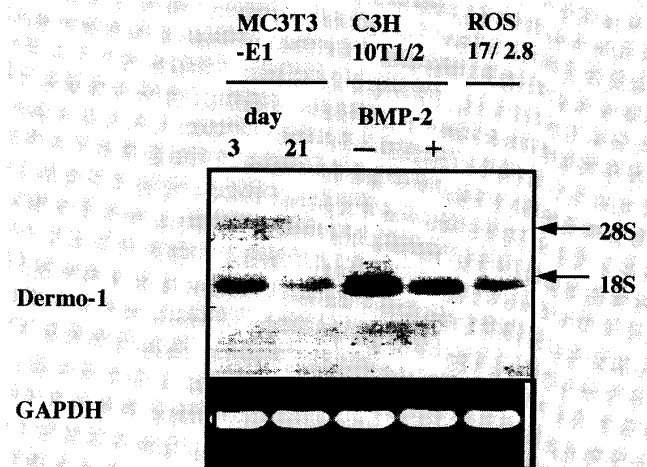


図7 骨芽細胞分化と Dermo-1 mRNA の発現  
MC3T3-E1 細胞の未分化な3日目及び分化の進んだ21日目に RNA を抽出し、Dermo-1 mRNA の発現をノーザンプロットによって調べた (レーン1, 2)。500ng/ml の rhBMP で72時間処理した C3H10T1/2 細胞より、同様に RNA を抽出し、Dermo-1 mRNA の発現をノーザンプロットによって調べた (レーン3, 4)。

ウジョウバエの発生段階において神経系、眼や血球系の発生に関与する分化因子である<sup>14)</sup>。Cbfa1 は、発生段階では骨芽細胞の分化に先立って、将来骨芽細胞ならびに軟骨細胞に分化する前駆細胞に発現が始まり、引き続いて発現は骨芽細胞に特異的となる<sup>15)</sup>。肥大軟骨細胞では弱いレベルの発現が見られ、象牙芽細胞においても発現している<sup>16)</sup>。また、線維芽細胞や筋芽細胞に Cbfa1 を強制発現させると、骨芽細胞に特異的な遺伝子発現が誘導されることが報告された<sup>13)</sup>。

Cbfa1 のノックアウトマウスは、出生直後に死亡する。このマウスは、T 細胞などの造血系の異常が予想されたが、胸腺・皮膚・筋肉や血液像の異常はなく、軟骨分化自体には大きな障害は見られず、骨格系の形と大きさは正常のマウスとそれほど大差ないが、軟 X 線による観察から石灰化した骨が全く無く、骨芽細胞の分化が全く起こらない<sup>13, 15)</sup>。in situ ハイブリダイゼーションでは、骨端部ではオステオネクチンや MGP mRNA は正常と変わらず発現していたが、オステオポンチン mRNA の発現は非常に低く、オステオカルシン mRNA の発現する骨芽細胞は認められていない。以上から、Cbfa1 は軟骨性骨化において骨芽細胞分化に重要な機能を果たす転写調節因子であり、骨芽細胞分化の最も特異的なマーカーとされている。現在までのところ骨形成に関与すると考えられている

BMP, TGF- $\beta$ やそれらの受容体の発現をこのマウスで比較したところ、正常と差のあるものは見つかったという報告はない。また、このマウスは、破骨細胞を欠いており、破骨細胞の分化・形成には骨芽細胞が必須であるということを証明した。Cbfa1 遺伝子をヘテロでしか持たないマウスと、放射線照射によって作製された Ccd と呼ばれる変異マウスでは、鎖骨と頭蓋の低形成という症状が一致し、最も頻度の多い骨系統疾患である鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) の症状と一致していた<sup>17)</sup>。Ccd の変異は Cbfa1 遺伝子の変異であることがわかり、CCD 患者は Cbfa1 遺伝子のヘテロな変異を有している<sup>18)</sup>。

しかしながら、後述するようにいくつかのノックアウトマウスにおいて、Cbfa1 の発現は他の転写調節因子によって調節されており、Cbfa1 の発現自体を調節するさらに上位の転写調節因子の存在が推定される。また、マウスにおいて Cbfa1 の発現が見られるのは胎生10.5日であるが、最初に骨芽細胞が現われるのはそれより4日後であり、Cbfa1 が制御している下位の転写調節因子群の存在も推定される。

## V. 骨芽細胞分化と Hox 遺伝子群

マウスの発生段階ではいくつかの Hox 遺伝子群も骨芽細胞分化に関わっている。Hox 遺伝子群はホメオボックスという構造をもつ転写調節因子群で、発生過程で頭尾軸に沿った部位特異的な形態形成を決定している。Hox 遺伝子群のノックアウトでは、体軸骨で正常のマウスに比べて、より頭部側の表現型が現われるというホメオティックな骨格の変異が生じている。例えば、Hoxb-4 のノックアウトでは第二頸椎が第一頸椎となる骨格異常が見られる<sup>19)</sup>。また、Hoxa-1, Hoxa-3 といったより頭部側のノックアウトではホメオティック変異は呈さず、鰓弓由来の骨・軟骨の形成に異常が見られ、Hox-9 より尾側の Hox 遺伝子のノックアウトでは、末梢である四肢の骨に変形を呈している。Hox 遺伝子の一つであるショウジョウバエの distress (Dlx) 遺伝子のマウスホモログである Dlx 5, Dlx 6 は内軟骨性骨化の凝集の部位で発現しており、Dlx 5 遺伝子をノックアウトすると頭蓋の形態異常や膜性骨化の遅延等の表現型を呈する<sup>20)</sup>。このマウスは、Cbfa1 の発現に影響がないことから Dlx 5 遺伝子は、骨芽細胞分化において Cbfa1 遺伝子の下位もしくは

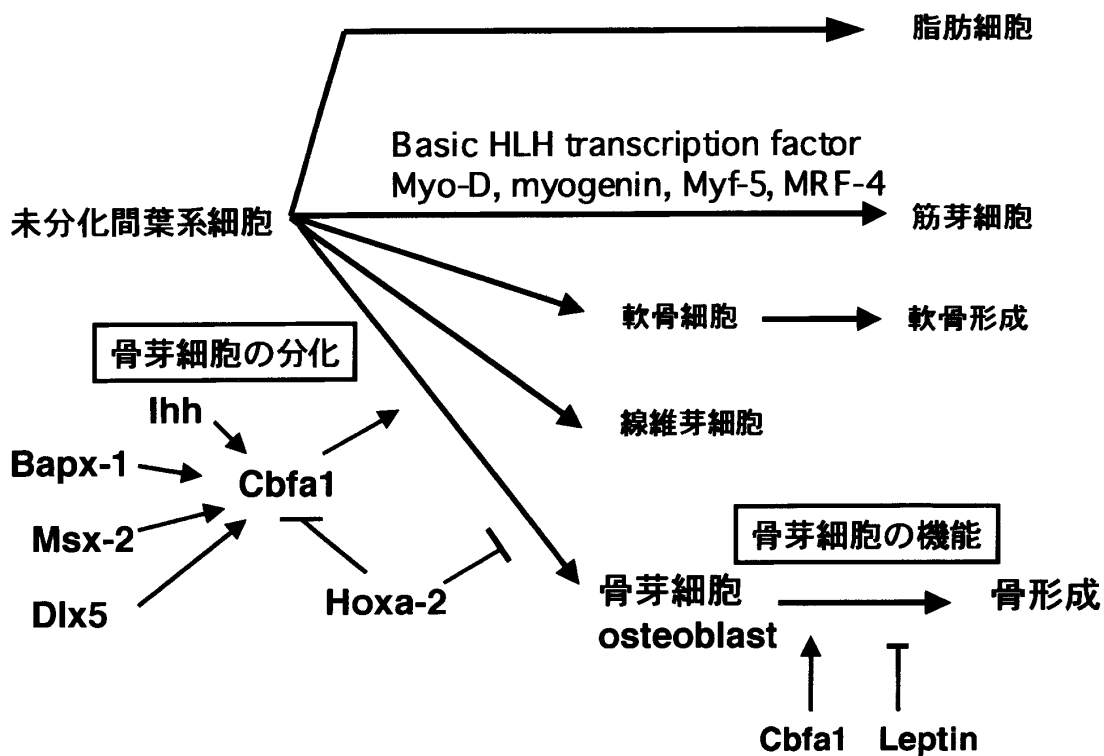


図8 未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化と骨芽細胞の機能

全く関連のない経路と考えられる。Dlx5 と Dlx6 は同時に発現していることから、Dlx5 のノックアウトで骨格系の異常が著しくないのは、類似した構造ならびに機能のタンパク質が代替的に働き、失われた遺伝子の機能を補完してしまういわゆる redundancy といった現象によるのかもしれない。他方、ショウジョウバエの筋節の Hox 遺伝子 Msh のマウスのホモログである Msx-2 のノックアウトでは、骨化の遅延と骨量の減少という、骨格系により大きな変異が生じる。このマウスでは、Cbfa1 及びオステオカルシン遺伝子の発現の減少がみられることから、Msx-2 は Cbfa1 の上位で機能しているものと考えられる<sup>21)</sup>。同様に、ショウジョウバエの Hox 遺伝子群のひとつである bagpipe のマウスのホモログである Bapx1 のノックアウトでも、Cbfa1 遺伝子の発現の減少を引き起こすことから、Bapx1 は Cbfa1 の上位で働いているものと考えられる<sup>22)</sup>。更に、Hoxa-2 のノックアウトでは第二鰓弓において Cbfa1 の異所性の発現を伴う骨形成が見られ、Hoxa-2 は第二鰓弓において局所的に Cbfa1 の発現を抑制し骨形成を抑制していることが示唆される。以上の知見を図 8 にまとめた。

## VI. 骨芽細胞分化と細胞増殖因子

発生期の骨形成には、さまざまな細胞増殖因子が骨芽細胞の分化に関与していることが考えられる。培養骨芽細胞を用いた実験では、BMP は Cbfa1 の発現を誘導することや TGF- $\beta$  は Cbfa1 の発現を減少させることが報告されているが、この作用は間接的でありその機構や生理的意味について、詳細は不明である。BMP は、もともと異所性の骨誘導活性から名付けられたが、のちに単一の分子ではなく多くの因子がファミリーをなしている。BMP は骨以外の組織でも発現しており、近年ではヒトの骨系統疾患との関連やマウスの骨格異常を呈する先天異常の研究から、発生過程で骨格を含めた種々の組織や器官の形態形成に関与していることが知られている<sup>23)</sup>。例えば、BMP-2 ならびに BMP-4 のノックアウトマウスは、胎生期に死亡し生まれてこない。BMP-4 もしくは BMP-2, 4 の I 型受容体である BMPR-IA (ALK3) のノックアウトでは中胚葉誘導が起こらない。また BMP-7 のノックアウトでは過剰趾・肋骨の癒合などの骨格異常のみならず、目ならびに腎糸球体の欠損が報告されている。しかし、これらの機構についてはまだ明らかではない。

PTHrP (parathyroid hormone related peptide) は、もともと腫瘍による高カルシウム血症の起因物質

として見出だされ、PTH と構造上類似性があることからその名が付けられたタンパク質である。軟骨では PTHrP mRNA は静止・増殖軟骨細胞に発現している。PTHrP ノックアウトマウスでは出生後すぐに死亡するが、胎生18日には増殖軟骨細胞の著しい減少が見られ、増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化の促進によって早期の骨化が起きていることがわかった。

一方、Ihh (indian hedgehog) は細胞増殖因子の一つであり、増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への移行部に発現している。hedgehog タンパク質の下流遺伝子とされる Patched や gli の発現は、外軟骨膜に認められる。PTHrP の発現は Ihh を発現している細胞と増殖軟骨細胞の境界ならびに外軟骨部分に発現が認められ、またニワトリの肢芽においてレトロウイルスで Ihh を異所性に発現させると PTHrP の発現が増加する。さらに *in vitro* の培養系で、PTHrP 受容体 (PTHrPR) ノックアウトマウスの胎生16.5日の軟骨細胞は、正常マウスの細胞より早く肥大化すること、正常マウスの軟骨細胞は PTHrP や Shh (sonic hedgehog) の添加により分化が抑制されるのに、PTHrPR ノックアウトマウスの軟骨細胞では PTHrP や Shh が作用しない<sup>24)</sup>。以上から、Ihh は、PTHrP の発現を制御して軟骨細胞の分化、肥大化を抑制するという機構が考えられている。Ihh 遺伝子のノックアウトマウスでは、骨芽細胞分化にも影響が見られており、Cbfa1 の発現が減少している。内軟骨性骨化の過程で、Ihh がどのような因子を介して骨芽細胞分化に関係するかはまだ不明である。

## VII. 骨芽細胞機能を調節する因子

骨は、生涯にわたって形成と吸収を繰り返し代謝している。これを、リモデリングといい、2つの相、すなわち骨吸収とそれに引き続いておこる骨形成が連続して起こる。骨粗鬆症は、加齢による性ホルモンの減少を主な原因とする疾患であり、骨量の減少と骨折のリスクが高くなる。この疾患では、骨のリモデリングに異常が生じ、結果として骨吸収が亢進している。骨粗鬆症患者の骨形成を増加させる方法が見出せれば、疾患の治療に大きく役立つと考えられる。リモデリングに作用する全身性のホルモンとしては、古くから知られる PTH、エストロゲンがまず代表的なものとして挙げられよう。

では、骨形成を調節する転写調節因子としては、どのようなものがあるのだろうか？既に述べた Cbfa1



は、すでに分化した骨芽細胞の骨形成に対しても促進的な効果があり、最終分化した骨芽細胞のオステオカルシン遺伝子や、転写開始点上流に Cbfa1 の結合部位を有するいくつかの骨基質タンパク質遺伝子の発現を増加させる。ドミナントネガティブトランスジェニックマウス、すなわち、ドミナントネガティブとして機能するオステオカルシン遺伝子プロモーターの Cbfa1 結合部位を欠失させたもの ( $\Delta$ Cbfa1) を導入したマウスでは、骨格系の異常はなく生まれてくるが、その後成長が止まってしまう。このマウスでは、骨芽細胞の分化が阻害されているわけではなく、細胞あたりの基質タンパク質の合成や分泌が低下し、骨形成量が低下するとされている<sup>25)</sup>。すなわち、骨形成という骨芽細胞機能を Cbfa1 が調節している (図 8)。

#### Ⅷ. 中枢性の骨芽細胞機能の制御機構

近年、ホルモンの一つとしてレプチンとよばれるタンパク質が発見され、注目されている。レプチンは脂肪細胞によって合成され、視床下部に存在するレセプターに結合して飢餓と肥満に関与している。レプチン欠損マウス (ob/ob) もしくはレプチン受容体の欠損マウス (db/db) では、肥満とともに、骨量が加齢とともに増加し、正常マウスの 2~3 倍となる<sup>26)</sup>。ヒトにおいても、レプチン遺伝子の遺伝的な欠損では、著しい肥満、性機能低下症と骨量の増加を呈する。また、脂質の代謝障害により脂肪細胞の欠損した脂肪異栄養症という疾患では、骨量が増加し骨硬化症の症状を呈する。すなわち、レプチンは骨形成を抑制していると考えられる。

骨のリモデリングにレプチンはどのような機序で働いているのだろうか? ob/ob や db/db マウスでは、骨芽細胞や破骨細胞の分化、破骨細胞の機能は正常であることなどから、レプチンはすでに分化した骨芽細胞の機能に影響を与えていることが予想された。しかしながら、骨芽細胞にはレプチンの受容体は存在しないこと、また ob/ob マウスの脳室内にレプチンを注入する実験では、骨量が正常レベルに減少することから、血中のレプチンが循環して全身の骨の骨芽細胞に機能するのではなく、レプチンは視床下部からの何らかの中枢性のコントロールを介して骨芽細胞機能に影響を及ぼしていることを示唆している<sup>26)</sup>。最近、視床下部のメラノコルチンレセプター 4 というレプチン受容体に類似した受容体の変異によっても、肥満と骨量の増大を示すことが報告された<sup>27)</sup>。

#### Ⅸ. おわりに

これまでに述べたように、90年代に骨芽細胞の分化と機能について分子レベルでの解明が進み、骨研究は大きな進展を遂げた。今後、骨芽細胞分化における HLH 型転写調節因子、Cbfa1 ならびに Hox 遺伝子群の上位や下位のシグナル、骨形成を制御する転写調節因子や中枢性の骨形成調節機構が更に解明されるにちがいない。本稿では触れなかったが、破骨細胞研究も大きく進展しており、骨芽細胞の機能を亢進させ骨量の減少を補う因子や機構が更に明らかになれば、骨粗鬆症のみならず顎骨・歯槽骨を標的とした歯科口腔領域の疾患の治療法に、広く応用されるのも夢ではないだろう。

#### 謝辞

本稿において、紹介した筆者の研究は、東京医科歯科大学・難治疾患研究所において野田政樹教授らとの共同研究による。また、研究費は、文部科学省科学研究費の補助を受けた。

#### 文献

- 1) Price, P. A. & Williamson, M. K.: Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J. Biol. Chem.*, 260, 14971-14975, 1985
- 2) Termine, J. D., Kleinman, H. K., Whitson, S. W., Conn, K. M., McGarvey, M. L. & Martin, G. R.: Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 99-105, 1981
- 3) Oldberg, A., Franzen, A. & Heinegard, D.: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83, 8819-8823, 1986
- 4) Price, P. A.: Gla-containing proteins of bone. *Connect. Tissue Res.*, 21, 51-57, 1989
- 5) Fisher, L. W., Hawkins, G. R., Tuross, N. & Termine, J. D.: Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.*, 262, 9702-9708, 1987
- 6) Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A. &

- Karsenty, G.: Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382, 448-452, 1996.
- 7) Luo, G., Ducy, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R. & Karsenty, G.: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386, 78-81, 1997
  - 8) Lenny, N., Westendorf, J. J. & Hiebert, S. W.: Transcriptional regulation during myelopoiesis. *Mol. Biol. Rep.*, 24, 157-168, 1997
  - 9) Garrell, J. & Campuzano, S.: The helix-loop-helix domain: a common motif for bristles, muscles and sex. *Bioessays*, 13, 493-498, 1991
  - 10) Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. & Weintraub, H.: The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, 61, 49-59, 1990
  - 11) Tamura, M. & Noda, M.: Identification of a DNA sequence involved in osteoblast-specific gene expression via interaction with helix-loop-helix (HLH)-type transcription factors. *J. Cell Biol.*, 126, 773-782, 1994
  - 12) Tamura, M. & Noda, M.: Identification of Dermo-1 as a member of helix-loop-helix type transcription factors expressed in osteoblastic cells. *J. Cell Biochem.*, 72, 167-176, 1999
  - 13) Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. & Karsenty, G.: *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89, 747-754, 1997
  - 14) Speck, N. A. & Terry, S.: A new transcription factor family associated with human leukemias. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 5, 337-364, 1995
  - 15) Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. & Kishimoto, T.: Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89, 755-764, 1997
  - 16) D'Souza, R. N., Aberg, T., Gaikwad, J., Cavender, A., Owen, M., Karsenty, G. & Thesleff, I.: *Cbfa1* is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development*, 126, 2911-2920, 1999
  - 17) Silience, D. O., Ritchie, H. E. & Selby, P. B.: Animal model: skeletal anomalies in mice with cleidocranial dysplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 27, 75-85, 1987
  - 18) Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J. B., Aylsworth, A. S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W. G., Henn, W., Knoll, J. H., Owen, M. J., Mertelsmann, R., Zabel, B. U. & Olsen, B. R.: Mutations involving the transcription factor *CBFA1* cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 89, 773-779, 1997
  - 19) Horan, G. S., Kovacs, E. N., Behringer, R. R. & Featherstone, M. S.: Mutations in paralogous *Hox* genes result in overlapping homeotic transformations of the axial skeleton: evidence for unique and redundant function. *Dev. Biol.*, 169, 359-372, 1995
  - 20) Acampora, D., Merlo, G. R., Paleari, L., Zerega, B., Postiglione, M. P., Mantero, S., Bober, E., Barbieri, O., Simeone, A. & Levi, G.: Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the *Distal-less*-related gene *Dlx5*. *Development*, 126, 3795-3809, 1999
  - 21) Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S., Peters, H., Tang, Z., Maxson, R. & Maas, R.: *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat. Genet.*, 24, 391-395, 2000
  - 22) Tribioli, C. & Lufkin, T.: The murine *Bapx1* homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Development*, 126, 5699-5711, 1999
  - 23) Nakayama, T., Cui, Y. & Christian, J. L.: Regulation of BMP/Dpp signaling during embryonic development. *Cell Mol. Life Sci.*, 57, 943-956, 2000
  - 24) Kronenberg, H. M., Lanske, B., Kovacs, C. S., Chung, U. I., Lee, K., Segre, G. V., Schipani,

- E. & Juppner, H.: Functional analysis of the PTH/PTHrP network of ligands and receptors. *Recent Prog. Horm. Res.*, 53, 283-301, 1998
- 25) Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M. & Karsenty, G.: A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes. Dev.*, 13, 1025-1036, 1999
- 26) Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A. F., Beil, F. T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J. M. & Karsenty, G.: Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 100, 197-207, 2000
- 27) Farooqi, I. S., Yeo, G. S., Keogh, J. M., Aminian, S., Jebb, S. A., Butler, G., Cheetham, T. & O'Rahilly, S.: Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J. Clin. Invest.*, 106, 271-279, 2000