

Expression profile of *Xenopus banded hedgehog*, a homolog of mouse *Indian hedgehog*, is related to the late development of endochondral ossification in *Xenopus laevis*

(アフリカツメガエルにおける軟骨内骨化の遅延は、マウス *Indian hedgehog* のホモログであるアフリカツメガエル *banded hedgehog* の発現様式に関連している)

長崎大学大学院 歯学研究科歯学専攻 4年次

森石 武史

哺乳類の骨格は膜性骨化と軟骨内骨化のどちらかの骨化様式により形成される。膜性骨化では、結合組織中の未分化間葉系細胞が直接骨芽細胞に分化し、軟骨を伴わずに骨が形成される。頭蓋冠や顔面骨、下顎骨、鎖骨の一部がこの骨化様式で形成される。一方、軟骨内骨化では、まず骨格形成予定部に軟骨コアが形成され、その中央部が肥大化し、石灰化すると周囲に骨襟が形成される。次いで骨襟周囲の結合組織から石灰化軟骨内に血管が侵入し原始骨髄が形成されると石灰化軟骨・骨髄境界部に海綿骨が形成され、軟骨内骨化が進展する。哺乳類の脊椎や四肢の長管骨はこの骨化様式で形成される。しかし、カエルなどの無尾両生類の長管骨の形成過程では軟骨内骨化の形成が顕著に遅延することが報告されている。そのため、本研究では脊椎動物の進化の過程で軟骨内骨化がどのような変遷を遂げてきたかを明らかにする研究の一環として、アフリカツメガエルの長管骨形成過程における軟骨内骨化遅延のメカニズムを解析した。

本研究では、まず様々な発育段階のアフリカツメガエルより後肢を摘出し、組織学的に観察した。その結果、アフリカツメガエルの後肢長管骨の発生過程では、まず肢芽中央部で間葉系細胞が軟骨細胞へ分化し、軟骨コアが形成され (Stage 52: 足が出たところのオタマジャクシ)、その後、未石灰化軟骨の周囲に骨襟が形成された (Stage 57: 足が成長し変態直前のオタマジャクシ)。そして、長管骨の中央部の未石灰化軟骨が吸収され、原始骨髄が形成されたが、軟骨・骨髄境界部には軟骨内骨化の形成はみられなかった (Stage 61: 変態期のオタマジャクシ)。変態後の成長過程のカエル (体長 4cm) でも軟骨・骨髄境界部に軟骨内骨化はみられず、十分に成熟したカエル (体長 6cm) で軟骨・骨髄境界部に不規則な海綿骨が形成されていた。また、カエル長管骨では骨端軟骨に皮質骨が食い込む様な特徴的な組織像が観察され、その先端部骨表面にはアルカリフォスファターゼ陽性の骨芽細胞が散見された。

最近、マウスの軟骨内骨化における *Indian hedgehog* (*Ihh*) の役割が注目されているので、次にアフリカツメガエルの長管骨形成過程における *banded hedgehog* (*bhh*: マウス *Ihh* のホモログ) とその標的遺伝子 *pachtd 1* (*ptc1*), *gli1* および骨軟骨関連遺伝子の発現を Reverse transcription chain reaction (RT-PCR) 法で解析した。その結果、Stage 52 の後肢で *bhh*, *ptc1*, *gli1*, *type II collagen*, *runx2* の mRNA が発現しており、Stage 57 の後肢となるとこれらの mRNA の発現がさらに上昇し、*osteocalcin* mRNA も発現していた。そして、変態後のカエルの骨格ではこれらの mRNA の発現レベルはさらに上昇していた。これらの結果より、アフリカツメガエルの長管骨の形成過程では *bhh* のシグナルが活性化されており、

哺乳類の軟骨内骨化に関連する遺伝子も発現していることが明らかとなった。

次に、アフリカツメガエルの肢芽形成過程における *bhh*, *ptc1*, *gli1* mRNA の発現様式を In situ ハイブリダイゼーション法で解析した。その結果、Stage 53 の後肢の軟骨細胞に *bhh*, *ptc1*, *gli1* mRNA の発現が観察できた。そして、それ以降の発育段階の後肢でも軟骨・骨髄境界部よりわずかに離れた軟骨細胞に *bhh*, *ptc1*, *gli1* の mRNA の発現が認められたが、軟骨・骨髄境界部に存在する間葉系細胞には *ptc1*, *gli1* mRNA の発現は認められなかった。つまり、アフリカツメガエルでは軟骨で発現した *bhh* のシグナルが軟骨・骨髄境界部の間葉系細胞に伝達されていないと考えられた。一方、骨端軟骨に皮質骨が食い込んでいく先端部外側の間葉系細胞では *bhh*, *ptc1*, *gli1* mRNA が発現しており、同部の細胞には *runx2* と *osteocalcin* mRNA の発現も認められた。これらの結果は、皮質骨先端部の骨形成には *bhh* のシグナルが密接に関連しており、*bhh* が骨芽細胞の分化に関与していることを示唆している。

本研究により、アフリカツメガエルの骨端軟骨で発現している *bhh* のシグナルは軟骨・骨髄境界部の間葉系細胞に伝達されていないことが明らかとなり、それがアフリカツメガエルで軟骨内骨化が遅延している原因の一つと考えられた。一方、骨端軟骨に食い込んでいく皮質骨先端外側部における *bhh* の発現様式は骨芽細胞の分化と密接に関連していたために、両生類の *bhh* は進化的にすでに骨形成誘導能を獲得していると考えられた。今後、*bhh* の作用メカニズムを解析することが脊椎動物の進化の過程における軟骨内骨化の変遷を明らかにするために重要と考えられた。