原 著

ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化誘導時における 遺伝子発現の変化

渡 邊 希 江

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学系

摂食機能保存学講座 摂食機能保存学分野

(主任・指導：三浦宏之教授)

(2003 年 12 月 8 日 受付)

Assessment of Gene Expression during Osteoblast Induction of Human Mesenchymal Stem Cells

WATANABE Kie

Fixed Prosthodontics, Department of Restorative Sciences,

Division of Oral Health Sciences, Graduate School,

Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. MIURA Hiroyuki)

The aim of this study was to define transcriptional changes that occur during dexamethasone-induced *in vitro* osteoblastic differentiation using human mesenchymal stem cells (hMSCs). Bone marrow derived hMSCs from three individual donors were grown in DMEM containing 10% fetal bovine serum and antibiotics (basal media, BM). At confluence (Day 0), cells were grown in BM or BM plus ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone (OS). At 0, 3, 7 and 14 days, total RNA was isolated from hMSCs, and ^{32}P -labelled probes were synthesized. Atlas 1.2 gene arrays (Clontech) were hybridized with donor-specific cDNA probes. Acquired data were analyzed using GeneSpring Software (Silicon Genetics) enabling normalization and averaging of donor-specific data sets at each time point. Only 8, 31, and 27 genes were upregulated more than 3-fold at 3, 7 and 14 days, respectively. Over 50 genes were downregulated at each time point. Interestingly, the results of this study did not reflect commonly identified genes that are frequently considered in cellular differentiation along the osteoblastic lineage. Instead, some interesting genes were upregulated. Seven days exposure to OS media resulted in the relatively high induction of several genes, including growth factors and receptors which affect adipocyte, chondrocyte and osteoblast differentiation. IGF II and FGFR 3, FGFR 2 were upregulated in the middle of 14 days' induction. Examination of gene expression at day 14 also revealed a number of receptors (LEPR) and transcription factors (ROR α) were upregulated during 14 days. These could be of importance to the process of early stage differentiation.

I. 緒 言

近年、多様な分化能をもつとされる幹細胞の再生医療への応用が大いに期待されている。なかでも成人骨髄から抽出できる間葉系幹細胞については、骨細胞・軟骨細胞・筋細胞・脂肪細胞などに分化しうる自己の細胞として、その利用に対する期待は大きく、盛んに研究が行われている。とりわけ細胞の分化決定機序の解明は、幹細胞を用いた再生医療の実現には必要不可欠であることか

ら、分化過程で惹起される遺伝子発現の変動に関して、未分化間葉系幹細胞の遺伝子発現パターン解析¹⁾、軟骨への分化過程²⁾、そして骨芽細胞への分化過程³⁾での遺伝子発現パターンの解析など多くの研究がなされている。

分化した骨芽細胞に特異的な遺伝子発現についてはある程度解明されているが、未分化間葉系幹細胞からの骨芽細胞への分化過程における遺伝子発現の変化についてはいまだ不明な点が多く、ヒト間葉系幹細胞(hMSC)の骨芽細胞への分化誘導時に惹起される変化を解明するこ

とは、骨芽細胞分化の機序を理解するための一つの有効なアプローチといえる。

本研究では、これら分化過程における遺伝子発現の変化を検索するために、hMSC を骨芽細胞に誘導し、cDNA アレイによる比較を行った。hMSC は 3 名のドナーの骨髄から抽出されたものを用い、1,176 個の遺伝子発現の変化を比較検討した結果、興味深い遺伝子発現の変化が明らかになったので報告する。

II. 方 法

1. 細胞培養

hMSC は、米国 IRB の規定に基づいてインフォームドコンセントのもと 3 名のドナー腸骨骨髄より抽出した。hMSC の抽出方法、培養条件については Haynesworth らの方法に従った⁴⁾。抽出後の hMSC 培養には 10% ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリンストレプトマイシンを添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, BM) を用い、37°C、5%CO₂ 条件下にて培養した。コンフルエントになった時点 (Day 0) で、Osteogenic supplemented 培地 (BM に 0.1 μ mol/l dexamethasone (Dex), 0.05 mmol/l ascorbic acid (ASA), 10 mmol/l β -glycerophosphate(β -GP) を添加したもの)⁵⁾での培養を開始し、骨芽細胞分化を誘導した。OS 培地は毎日交換し、OS 培地に切り替えてから 14 日目まで培養を続けた。

2. RNA 抽出

骨芽細胞分化誘導開始時(0 日目)、誘導後 3, 7, 14 日目の細胞から、Nucleospin Nucleic Acid Purification Kit (クロンテック社) を用いて全 RNA を抽出し、DNase 処理によって GenomicDNA を除去した。

3. 骨芽細胞分化過程の検証

hMSC を 12 well の細胞培養プレート上に播種し、OS 培地のもと骨芽細胞への分化をモニターする目的で、0~14 日までのアルカリフォスファターゼ活性を Sigma Diagnostics Alkaline Phosphatase kit # 85 (Sigma 社) により、また骨芽細胞マーカーとして知られるコラーゲン type I (COL I), オステオカルシン (OC) さらに骨シアロプロテイン (BSP) については mRNA 発現レベルを RT-PCR 法により検証した。RT-PCR の際の cDNA 合成には SuperScript II (Invitrogen 社) を用い、Cooper ら⁶⁾の方法に従って反応を行った。これらの骨芽細胞マーカーの cDNA は、本研究で用いた cDNA アレイ上には含まれていなかった。

4. プローブ合成と cDNA アレイハイブリダイゼーション

抽出した RNA から、Atlas Pure Total RNA Labeling Kit (クロンテック社) を用いて poly+A RNA を精製、[³²P] dATP で放射線標識して、ドナーごとにそれ

ぞれのタイムポイントでプローブを作成した。使用した cDNA は ク ロ ン テ ッ ク 社 Atlas Human Array 1.2 (1,176 genes) で、ハイブリダイゼーションには、各サンプルともにおよそ 8.0×10^6 cpm ずつを用いた。

5. cDNA アレイデータ解析

反応後の cDNA アレイはフォスフォイメージャー Storm 840 (Molecular Dynamics) を用いてスキャンして、取り込んだ画像はデジタル化した。Atlas cDNA アレイ専用の解析ソフトウェア Atlas Image 2.0 software (クロンテック社) を用いて、アレイ上のスポットごとのシグナル強度を数値化し、標準化を行った。おのおののドナーごとに、0 日目のプローブにハイブリダイズしたアレイと 3, 7, 14 日目のプローブにハイブリダイズしたものとを比較し、遺伝子ごとの発現強度を Day 0 の同じ遺伝子のシグナル強度に対する比として算出し (ratio = Day 3 または Day 7 または Day 14 のシグナル強度 / Day 0 のシグナル強度)、遺伝子発現強度の相対的变化を示した。

ドナーの特異性を排除する目的で、ドナー別に算出された ratio を GeneSpring Software 4.2.1 (Silicon Genetics 社) を用いてタイムポイントごとに平均化し、さらに 3 fold 以上のものを変化があったとみなした。

6. クラスター解析

平均化したデータに対し、mRNA 発現の変動の傾向を解析するため、GeneSpring Software 4.2.1 を用いて K-means クラスターリング解析を行い、14 日間の骨芽細胞誘導期間における mRNA 発現レベルの変動パターン別に 7 つのセットに分類した。

7. RT-PCR による確認

OS 培地下で培養後 0, 3, 7, 14 日に得られた RNA から、Superscript II を用いて cDNA を合成した。興味深い発現の変化がみられた Insulin-like growth factor II (IGF II), Leptin receptor (LEPR), Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3), Retinoic acid receptor-related orphan receptor ROR α (ROR α) について、その mRNA 発現強度の変化を確認するため、表 1 に示す条件で Taq polymerase (Invitrogen 社) を用いて PCR を行った。

III. 結 果

1. 骨芽細胞分化への誘導

アルカリフォスファターゼ活性は 14 日間の培養の過程で上昇していることが確認され、骨芽細胞分化マーカー (COL I, OC, BSP) の mRNA 発現レベルの上昇も認められた (図 1, 2)。

表1 RT-PCR 法で用いたプライマーおよび条件

Target mRNA	Location	Sequence	Annealing Temperature
IGF II	Upstream	5'-TGCATTGCTGCTTACC-3'	56
	Downstream	5'-GTCCCTCTCGGACTTG-3'	
LEPR ²²⁾	Upstream	5'-TGTTGTGAATGTCTTGTGCC-3'	55
	Downstream	5'-TACTCCAGTCACTCCAGATTCC-3'	
FGFR 3 ²³⁾	Upstream	5'-GCCGAGGAGGAGCTGGTGGAGGCT-3'	60
	Downstream	5'-CTTGAGCGGGAAGCGGGAGATCTTG-3'	
ROR α ²¹⁾	Upstream	5'-GTAGAAACCGCTGCCAACA-3'	56
	Downstream	5'-ATCACCTCCCCTGCTT-3'

図1

12 well 培養ディッシュ上で hMSC を培養，骨芽細胞に誘導し，誘導後 0, 3, 7, 14 日目に ALP 活性染色したものを示す。14 日目に向かって ALP 活性が上昇している。

2. cDNA アレイによる遺伝子発現分析の結果について

cDNA アレイによる解析の結果，分化誘導後 3, 7, 14 日目において，それぞれ 8, 31, 27 個の遺伝子発現レベルの上昇 (ratio ≥ 3 fold) がみられ，発現レベルが減少した遺伝子 (ratio ≤ 0.3 fold) は，それぞれ 57, 52, 107 個であった。K-means クラスタ分析により，類似した発現変動パターンを示す遺伝子を 7 つのクラスに分類したものを，図 3 に示す。

骨芽細胞分化誘導後 3 日目で ratio が最も大きかったのは Insulin-like growth factor II (IGF II) の 5.3 fold で，IL-4 receptor は 4.4 fold，Integrin $\alpha 5$ は 3.8 fold であった。3 日目にのみ発現上昇がみられたものは，Transcription factor GATA-4 など，クラスターセット 1 に分類した。

7 日目では，すべてのタイムポイントのうち最も多くの遺伝子の mRNA 発現レベルが上昇した。Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3, 12.5 fold)，Fibroblast growth factor receptor (FGFR 2, 8.7 fold) などの成長因子，Activin type I receptor (4.4 fold)，Leptin receptor (LEPR, 5.2 fold) などの細胞レセプターの上昇が認められた。これらはクラスターセット 5, 6 に分類し，このセットには細胞レセプターや転写因子が多く含まれていた。

14 日目で発現が上昇したものはクラスターセット 7

図2

骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現レベルの変動を示す。骨芽細胞分化誘導後 0 日目から 28 日目まで培養した hMSC から全 RNA を抽出，Col I，BSP，OC そして GAPDH について RT-PCR 法を用いてその発現を確認した。

に分類し，Retinoic acid receptor-related orphan receptor ROR α (ROR α , 5.6 fold)，Transcription factor Sp 1 (4.1 fold)，Helix-loop-helix protein (3.7 fold) などの転写因子と Casein kinase I gamma (3.7 fold) などの細胞内キナーゼネットワーク因子が多く含まれていた。

14 日間を通して持続的に発現上昇がみられたものはクラスターセット 4, 5 に分類し，IGF II，LEPR や Fibronectin receptor alpha subunit が含まれていた。

K-means クラスタリング解析により，クラスターセット 4, 5, 6, 7 から 1 つずつの興味深い遺伝子，計 4 つについて，RT-PCR 法を用いてその発現量の変化を確認した。その結果，4 つの遺伝子 (IGF II，LEPR，FGFR 3，ROR α) の mRNA 発現レベルは，cDNA アレイの結果にほぼ対応して上昇していた。(図 4)。

Cluster Days

図 3

発現パターンの類似している遺伝子を K-means クラスタリングにより 7 つのセットに分類し、いずれかのタイムポイントで 3 fold 以上発現が増加しているものをクラスターセットごとに示す。Ratio の大きさにより色の濃淡で表した。

図4

クラスターセット4, 5, 6, 7より選出したIGF II, LEPR, FGFR3, ROR α について、RT-PCR法によるmRNA発現レベルの変動を示す。アレイに用いたものと同じRNAからcDNAを合成、それぞれ表1に示すプライマーと条件でPCRを行った。

IV. 考 察

図1, 2より、14日間の分化誘導でALP、骨芽細胞分化マーカーのmRNAレベルが上昇していることが認められ、本実験の培養条件においてhMSCの骨芽細胞への分化が誘導されていることが確認された。

本実験の結果では、一般的によく知られる骨芽細胞特異的遺伝子およびTGF β スーパーファミリーの発現上昇は認められなかった。使用したcDNAアレイには、BMP-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8が含まれていたが、いずれも発現量は少なく、発現レベルの変動もみられなかった。BMPsは未分化な間葉系幹細胞を骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化させ、さらに、未分化な骨芽細胞（前骨芽細胞）に作用すると、それらを成熟した骨芽細胞へと分化させる。細胞から分泌されたBMPは、産生細胞または周囲の細胞のBMPレセプターに結合することによりその作用が発現する。またDiefenderferら⁷⁾により、hMSCにおけるBMPシグナリングを活性化する経路は、一つではない可能性が示唆されている。本実験で、分化途中のhMSCではBMPの発現が上昇しなかった。すなわち、骨芽細胞の分化過程の少なくとも初期から中期においては、BMPやTGF β スーパーファミリーがオートクラインに作用する機序は必須ではないということである。

しかし、一方で骨形成の過程で重要な役割を示すいくつかの興味深い遺伝子の発現変動が認められた。

IGF IIはすべてのドナーで強く発現が上昇しており、3日目でratioが5.31 fold, 7日目6.21 fold, 14日目

4.59 foldであった。IGFsは、骨量を決定するのに重要な役割を担っており⁸⁾、特にIGF IIは骨基質で最も豊富に発現する成長因子の一つであるとともに、骨形成や脂肪細胞への分化を促す。ラットとヒトの*in vivo*の実験では、IGF IIは骨形成を促進し、さらにIGF IとIGF IIはラットの脊椎からの細胞を骨芽前駆細胞と脂肪前駆細胞に分化促進することが明らかにされている⁹⁾。一方、本実験ではIGF IIの活性を抑制すると考えられているInsulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP 3)は、すべてのドナーで発現が減少していた(3日目0.36 fold, 7日目0.39 fold, 14日目0.19 fold)。IGF結合タンパクは、血流中のIGFを運搬するキャリアーとなったり、細胞外基質に貯蔵したりする役割をもち、IGFがIGFレセプターに結合するのを妨げることでIGFの活性を抑制する。ただし、IGFBP 3とIGFBP 5はIGFあるいはIGFレセプターに依存しない機序で骨芽細胞へのIGF刺激を増強するなど、細胞機能を調節する働きをもつ可能性が示唆されている¹⁰⁾。本実験でみられたIGF II発現の増加は、IGFBP-3発現の減少による抑制の解除によるものであると考えられるが、その機序には、両者の結合が関与するものとしえないものが考えられる。IGF IIの発現が、7日目をピークにしてすべてのタイムポイントで増加していたことから、IGF IIは骨芽細胞への分化に対して、その早い段階から後期にいたるまで重要な機能を果たしていると考えられる。

また、骨量を調節する重要な役割をもつレセプター、LEPRは3日目で3.2 fold, 7日目で5.2 fold, 14日目2.2 foldであった。Leptinは骨形成において重要な役割を果たすこと¹¹⁾が知られ、LeptinとLeptin receptorノックアウトマウスでは、骨芽細胞のシグナル伝達が起こらない¹²⁾。さらにLeptinは、OPGおよび骨芽細胞依存的に破骨細胞の分化を阻害することも知られている¹³⁾。Bassilanaら¹⁴⁾の報告と同様、本実験により、hMSCが骨芽細胞に分化する過程でLEPRのmRNA発現レベルが上昇することが確認された。このことは、骨芽細胞への分化が起こる環境においては、骨量調節因子も関与し、破骨細胞の分化阻害による骨形成優位の状況となることを示している。

成長因子レセプターの一つである、Fibroblast growth factor (FGF)のレセプター、FGFR2, FGFR3も7日目で強い発現が認められた。FGFは、軟骨形成と骨形成の両方で重要な役割をもち、FGFRからのシグナルは細胞数の増加、増殖停止、分化を引き起こす¹⁵⁾。FGFR2は骨芽細胞前駆幹細胞の増殖期にのみ発現し、FGF2レベルの増加によりFGFR2発現と増殖が抑制される¹⁶⁾。FGFR3は、軟骨細胞の増殖に必須であるとともに、骨成長をも阻害することが知られている¹⁷⁾。また、マウス間葉

系幹細胞における軟骨細胞分化過程で、BMP-2 によってその発現上昇が上昇する¹⁸⁾。

以上のように、本実験においては 7 日目に、これら細胞増殖に関与する成長因子が大きな変動をみせており、細胞増殖が活発だったことが推測される。

一方、分化誘導後 7 日目から 14 日目にかけては多くの遺伝子発現が誘導され、特に転写因子が多くみられた。Osterix¹⁹⁾や cbfa 1²⁰⁾が骨芽細胞分化において必要不可欠な転写因子として知られるように、骨芽細胞分化の過程ではさまざまな転写因子が機能している。特に 14 日目で、ROR α が 5.6 fold と強く発現上昇していたのは興味深い結果である。ROR α は、あらゆる組織に広く発現しており、核内レセプタースーパーファミリーに属する転写因子で、最近ラット骨肉腫由来の細胞株 ROS 172.8 において BSP を活性化することが報告されている。ROR α の *staggerer* ミュータントマウス (*sg/sg*) では骨密度が著しく減少した骨減少症が認められ、薄く長い骨の形成が観察されるなど、骨代謝におけるその重要性が確認されている²¹⁾。本実験においても、BSP の発現上昇に先立って、緩やかに ROR α の発現が上昇しており、骨芽細胞への分化後期に機能するものと考えられる。

V. 結 論

本稿では、3 名のドナーから採取した hMSC の骨芽細胞分化過程にみられる遺伝子発現の変動を示した。骨芽細胞誘導後の 14 日間は、主に細胞増殖と骨基質成熟の時期であると考えられ、骨芽細胞への分化過程の初期から中期に相当するものと考えられる。本実験では、IGF II, LEPR, FGFR 3, ROR α などの mRNA レベルの変動が顕著に認められ、これらの遺伝子の骨芽細胞分化初期から中期への関与とその重要性が示唆された。

Acknowledgements

This research was supported by Professor Lyndon F. Cooper. I would like to express our appreciation to him for his invaluable advice. I thank Professor Hiroyuki Miura and Professor Katsumi Uoshima for their suggestions. I also thank the members in Bone Biology and Implant Therapy Laboratory at the University of North Carolina at Chapel Hill, and Dr. Hideya Hamano, and the members in Fixed Prosthodontics, Department of Restorative Sciences, Division of Oral Health Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University.

This study was presented at 81st General session of the IADR (June 26, 2003, Goteborg).

文 献

- 1) Jia, L., Young, M. F., Powell, J., Yang, L., Ho, N. C., Hotchkiss, R., Robey, P. G. and Francomano C. A. : Gene expression profile of human bone marrow stromal cells : high-throughput expressed sequence tag sequencing analysis. *Genomics* 79 : 7-17, 2002.
- 2) Sekiya, I., Vuorio, J. T., Larson, B. L. and Prockop, D. J. : *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9 : 4397-4402, 2002.
- 3) Doi, M., Nagano, A. and Nakamura, Y. : Genome-wide screening by cDNA microarray of genes associated with matrix mineralization by human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 : 381-390, 2002.
- 4) Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M. and Caplan, A. I. : Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13 : 81-88, 1992.
- 5) Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. and Bruder, S. P. : Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J. Cell. Biochem.* 64 : 295-312, 1997.
- 6) Cooper, L. F., Harris, C. T., Bruder, S. P., Kowalski, R. and Kadiyala, S. : Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. *J. Dent. Res.* 80 : 314-320, 2001.
- 7) Diefenderfer, D. L., Osyczka, A. M., Reilly, G. C. and Leboy, P. S. : BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect. Tissue Res.* 2003 : 305-311, 2003.
- 8) Linkhart, T. A., Mohan, S. and Baylink, D. J. : Growth factors for bone growth and repair : IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19(Review) : 1 S-12 S, 1996.
- 9) Jia, D. and Heersche, J. N. M. : Insulin-like growth factor-1 and -2 stimulate osteoprogenitor proliferation and differentiation and adipocyte formation in cell population derived from adult rat bone, *Bone* 27 : 785-794, 2000.
- 10) Rosen, C. J., Donahue, L. R. and Hunter, S. J. : Insulin-like growth factors and bone : the osteoporosis connection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206(Review) : 83-102, 1994.
- 11) Takeda, S. and Karsenty, G. : Central control of bone formation. *J. Bone Miner. Metab.* 19(3) (Review) : 195-198, 2001.
- 12) Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A. F., Beil, F. T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J. M. and Karsenty, G. : Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay : a central control of bone mass. *Cell* 100 : 197-207, 2000.
- 13) Holloway, W. R., Collier, F. M., Aitken, C. J., Myers, D. E., Hodge, J. M., Malakellis, M., Gough, T. J., Collier, G. R. and Nicholson, G. C. : Leptin inhibits osteoclast generation. *J. Bone Miner. Res.* 17 : 200-209, 2002.
- 14) Bassilana, F. and Susa, M. : Human mesenchymal stem cell undergoing osteogenic differentiation express leptin and functional receptor. *J. Bone Miner.*

- Res. 15 : S 378, 2000.
- 15) Goldfarb, M. : Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7 : 311-325, 1996.
 - 16) Iseki, S., Wilkie, A. O. M., Heath, J. K., Ishimaru, T., Eto, K. and Morriss-Kay, G. M. : *Fgfr2* and *osteopontin* domains in the developing skull vault are mutually exclusive and can be altered by locally applied FGF 2. *Development* 124 : 3375-3384, 1997.
 - 17) Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A. and Leder, P. : Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84 : 911-921, 1996.
 - 18) Hoffmann, A., Czichos, S., Kaps, C., Gazit, D., et al. : The T-box transcription factor Brachyury mediates cartilage development in mesenchymal stem cell line C3H10T1/2. *J. Cell Sci.* 115(4) : 769-781, 2002.
 - 19) Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B. : The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108 : 17-29, 2002.
 - 20) Karsenty, G. : Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11 (Review) : 343-346, 2000.
 - 21) Meyer, T., Kneissel, M., Mariani, J. and Fournier, B. : *In vitro* and *in vivo* evidence for orphan nuclear receptor RORalpha function in bone metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 9197-9202, 2000.
 - 22) Thomas, T., Gori, F., Khosla, S., Jensen, M., Burguera, B. and Riggs, L. : Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 140(4) : 1630-1638, 1999.
 - 23) Rousseau, F., el Ghouzzi, V., Delezoide, A. L., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A. and Bonaventure, J. : Missense FGFR 3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD 1). *Hum. Mol. Genet.* 5(4) : 509-512, 1996.