

論文内容の要旨

論文題目 Glycogen synthase kinase-3 β による骨芽細胞分化制御機構に関する研究

指導教官 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 釘宮典孝

近年の分子生物的手法による骨芽細胞分化過程の解明により、骨芽細胞分化は bone morphogenetic proteins (BMPs)、Wnt、Hedgehog (Hh)やインスリン/Insulin-like growth factor (IGF)といった多くのシグナル分子とRunx2やOsterixといった転写因子により複雑に制御されていることが判明してきた。これら遺伝子改変動物の解析により多くの転写因子やシグナル分子の役割が解明されてきたが、しかしながらこれら骨形成に関わる転写因子とシグナル経路間の機能的関連についてはほとんど分かっていないのが現状である。

Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)は、元来糖代謝にかかわるセリン/スレオニンキナーゼとして同定されたが、現在では、腫瘍形成、細胞生存や器官形成といった多くの異なった生物的過程に関与していることが分かってきている。この中でも、GSK-3 β はWntとインスリン/IGFシグナル経路における重要な分子であり、これらシグナル経路を抑制的に制御している。

Wntは分泌性シグナル分子を介した細胞間相互作用に関わる分子の1つで、形態形成の誘導因子、細胞の極性決定因子、増殖分化の調節因子として機能している。普段GSK-3 β は β -cateninをリン酸化しており、その細胞内レベルを負に制御している。そこに古典的Wntシグナルが活性化されると、Wntリガンドがその受容体Frizzledと共役受容体であるlow-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5)やLRP6に結合し、APC、Axinなどを介してGSK-3 β は不活性化される。それにより、 β -cateninが細胞質に蓄積して、これが核内移行することで標的遺伝子の転写が活性化される。近年古典的Wntシグナル経路は、発生段階のみならず、出生後の骨形成を促進していることが分かってきている。まずLRP5の機能喪失型変異体は、ヒトにおける骨粗鬆症・偽神経膠腫; osteoporosis-pseudoglioma (OPPG)の原因遺伝子であることが解明され、Lrp5ノックアウトマウスは、骨芽細胞の増殖と分化の障害により骨量の低下を示した。一方、その機能亢進型変異体はヒト、マウスにおいて骨量の増加を呈した。以上より、古典的Wntシグナルは骨形成を正に制御していると考えられている。

一方、インスリンは、血糖調節因子である以外に、IGF-1と共に重要な骨代謝調節因子として知られており、それらの同化作用を示す報告が数多く見られる。*in vitro*で、インスリンが、骨器官培養や骨芽細胞培養において細胞増殖やコラーゲン合成を促進すること、また*in vivo*では、ストレプトゾトシンによるインスリン分泌不全ラットで急速な骨量減少が見られることが報告されている。一方、IGF-1は成長因子であり、成長ホルモンにより肝臓などより分泌され、骨形成促進能があることが知られている。マウスおよ

びヒトにおいて血中IGF-1濃度と骨密度との間に有意な正相関が認められている。GSK-3 β は、これらWntおよびインスリン/IGFシグナル経路を抑制することから、骨形成を負に制御する可能性が考えられる。今回の研究の目的はGSK-3 β の骨形成における役割を解明し、その分子機序を明らかにすることである。

GSK-3 β は、グリコーゲン合成酵素をリン酸化することでグリコーゲン合成を阻害するだけでなく、多くの異なった細胞内機能を制御している。これまで述べたように、さまざまな状況証拠からGSK-3 β は骨芽細胞分化に対し抑制的に働いていることが予想されるが、GSK-3 β の骨形成における生理的な役割はまだ不明であるため、まずGsk-3 β ヘテロノックアウトマウスの骨の解析をした。Gsk-3 β ヘテロノックアウトマウスは、大きな骨格パターンニングの異常はなかったが、骨の放射線学的解析および組織学的解析により、海綿骨と皮質骨とも骨量が増加していることが分かった。一方、成長板における軟骨分化は正常であった。骨形態計測によりGsk-3 β ヘテロノックアウトマウスの骨代謝は、骨形成と骨吸収が共に亢進している高回転型であることが分かり、これは*in vitro*の系でも確認された。これらのデータは、生理的な骨芽細胞分化に対してGSK-3 β は抑制的に制御していることを示唆する。

ではGSK-3 β がどのように骨芽細胞分化に関与しているのでしょうか？ 現在知られている骨芽細胞分化に必須の転写因子のうち最も重要なものの1つはRunx2である。Runx2/Cbfa1は、*runt*ドメイン遺伝子ファミリーの一つであり、Runx2ホモノックアウトマウスは骨芽細胞が欠失しており、骨形成が全く生じていなかったため、骨形成に必須の転写因子であるとされている。このように、Runx2は骨芽細胞分化の主要な調節因子であるので、GSK-3 β が骨芽細胞分化をRunx2に作用することで制御している可能性について検討した。

*in vitro*におけるGSK-3 β の機能亢進および機能喪失の実験により、Runx2の転写活性がGSK-3 β により制御されていることが判明した。この制御メカニズムについてRunx2のmRNA発現量、蛋白発現量、細胞内局在やリン酸化に着目したが、GSK-3 β シグナルはこれらのどれも変えなかった。またこのGSK-3 β とRunx2の関連が生理的なものかを確認するために、Gsk-3 β ヘテロノックアウトマウスとRunx2ヘテロノックアウトマウスを掛け合わせたところ、Runx2の対立遺伝子が1つ欠損しているために生じている鎖骨頭蓋異形成症を表現型が、Gsk-3 β の対立遺伝子を1つ欠失させることや、GSK-3 β の選択的阻害剤のリチウムの投与で部分的に救済された。以上より、GSK-3 β は生理的なRunx2機能の制御に深く関与していると示唆される。

以上より、骨芽細胞分化においてGSK-3 β がRunx2の機能を*in vitro*と*in vivo*の両方で抑制していることが分かったが、GSK-3 β シグナルはRunx2のmRNA発現量、蛋白発現量、細胞内局在やリン酸化を変えなかった。このことからRunx2シグナルを修飾するGSK-3 β の他の標的の存在が示唆される。GSK-3 β はc-Jun、c-Fos、JunD、c-Myc、NFATc、cyclin D1、 β -cateninやCCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)といった多くの転写因子をリン酸化し、そして核内での転写過程を制御している。そこで現在知られているGSK-3 β の下流分子を検索し、骨芽細胞分化においてRunx2と相互作用する分子を探索することにしたところ、GSK-3 β の下流分子の中から、C/EBP β とC/EBP δ がRunx2のコアクチベーターとして働くことを解明した。GSK-3 β シグナルはこれらコアクチベーターの細胞内局在とDNA結合能を制御することで、Runx2による骨芽細胞分化を修飾していることを示した。

本研究において、まず *Gsk-3 β* ヘテロノックアウトマウスが骨芽細胞分化促進により骨形成能が亢進していることを示した。さらに頭蓋骨由来の骨芽細胞を用いた *in vitro* の実験で、GSK-3 β は Runx2 の骨芽細胞分化能を抑制した。この GSK-3 β による Runx2 の機能の抑制は直接作用によるものではなく、GSK-3 β は Runx2 のコアクチペーターの細胞内局在や DNA 結合能を制御することで、Runx2 による骨芽細胞分化を調節していた。さらに GSK-3 β と Runx2 は *in vivo* においても遺伝学的に相互作用があり、*Gsk-3 β* 遺伝子のヘテロ欠損や GSK-3 β の選択的阻害剤であるリチウムを投与することで、*Runx2* 遺伝子のヘテロ欠損による表現型を部分的に救済した。これらのデータにより、GSK-3 β は骨形成において骨形成の主要な調節遺伝子である Runx2 の機能を制御する生理的に重要な分子であることが示された。