

論文内容の要旨

論文題目 **Cyclic GMP-dependent protein kinase type II (cGKII) による  
軟骨細胞肥大分化制御**

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16年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 川崎洋介

骨形成の様式には膜性骨化と軟骨内骨化の2種類がある。膜性骨化は頭蓋骨や鎖骨の大部分にみられ、軟骨を経由することなく未分化間葉系細胞が直接骨芽細胞に分化して骨組織を形成する。一方、軟骨内骨化は脊椎や四肢の長管骨など骨格の大部分で認められる。この過程の特徴は軟骨の型がまず形成され、次いで骨に置換されるという点にあり、異なる種類の細胞の増殖と分化が時間的、空間的に厳密に制御されている。骨成長を担う軟骨成長板では軟骨細胞はまず増殖し、その後増殖を止めて前肥大軟骨細胞となる。前肥大軟骨細胞は肥大軟骨細胞となり特徴的な細胞外基質やサイトカインを産生し、やがて細胞死を起こす。肥大軟骨細胞は骨形成において中心的な役割を果たすことが知られている。

自然発症の小人症ラットKomeda miniature rat Ishikawaは軟骨細胞の肥大分化障害により四肢短縮を呈する。筑田らはPositional candidate cloning法を用いて遺伝子上の原因部位を絞込み、cGKII遺伝子のキナーゼ領域を欠失した機能喪失変異が原因であることを突き止めた。

cGKは線虫からヒトまで良く保存されているセリン/スレオニンキナーゼであり、cGMP結合領域、キナーゼ領域など共通の構造を有する。cGKにはtype Iとtype IIの2種類のアイソフォームが存在する。cGKIは主に平滑筋細胞、血小板、小脳細胞に発現し、血管収縮、血小板活性化、シナプス可塑性に重要な役割を果たす。一方、cGKIIは主に腸管粘膜、腎傍糸球体細胞、軟骨細胞に発現し、小腸におけるCl-Na輸送、腎臓におけるレニン分泌、骨格成長に重要な役割を果たす。cGKII遺伝子欠損 (cGKII<sup>-/-</sup>) マウスは軟骨内骨化障害による小人症を呈することなどから、cGKIIは軟骨内骨化の制御に重要な役割を果たすと考えられている。

軟骨分化におけるcGKII上流の分子としてはC型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) およびグアニル酸シクラーゼ-B (GC-B) が知られている。CNPは膜結合型受容体であるGC-Bを介して細胞内cGMP濃度を増加させる。GC-Bは、小人症を呈するヒト疾患Acromesomelic dysplasia type Maroteauxの原因遺伝子である。また、CNP遺伝子欠損マウス、GC-B遺伝子欠損マウスはcGKII遺伝子欠損マウスと同様に軟骨内骨化障害

による小人症を呈する。このように軟骨内骨化におけるcGKII上流の分子メカニズムについては理解が進んでいるが、下流の分子メカニズムについてはほとんど解明されていない。

本研究は軟骨細胞肥大分化におけるcGKIIの下流の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。まずセリン/スレオニンキナーゼのリン酸化標的分子のスクリーニングシステムを用いた実験で、cGKIIの標的分子のスクリーニングを行った結果、8つの候補分子が同定された。各候補分子について軟骨細胞肥大分化のマーカーであるX型コラーゲンのプロモーターに対する活性をルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより検討した結果、Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) がその活性を有意に抑制し、軟骨細胞肥大分化に関与することが示唆された。更にIn vitro kinase assayによりリコンビナントcGKIIがリコンビナントGSK-3 $\beta$ をSer9でリン酸化することが確認された。マウス軟骨成長板の免疫染色により、GSK-3 $\beta$ はcGKIIと共に前肥大細胞層に優位に局在がみられた。これより軟骨成長板の前肥大細胞層においてcGKIIがGSK-3 $\beta$ と相互作用していることが示唆された。

GSK-3 $\beta$ 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学的過程に関与することが知られている。通常GSK-3 $\beta$ は活性型で存在し、Ser9がリン酸化されることにより活性が抑制される。このため、cGKIIがGSK-3 $\beta$ のSer9をリン酸化することにより、活性型で存在するGSK-3 $\beta$ を抑制すると考えられた。GSK-3 $\beta$ の軟骨細胞肥大分化との関連を検討すると、軟骨細胞株ATDC5細胞にcGKIIを過剰発現した場合も、GSK-3 $\beta$ 活性阻害剤であるLiClを添加した場合も、X型コラーゲンの発現は誘導されたが、恒常活性変異型GSK-3 $\beta$ をcGKIIと共発現させると、この肥大分化は抑制された。このことから、cGKII由来の軟骨細胞肥大分化にGSK-3 $\beta$ が抑制的に働くことが示唆された。

GSK-3 $\beta$ ホモ遺伝子欠損 (GSK-3 $\beta$ <sup>-/-</sup>) マウスは胎生致死で、軟骨内骨化に関する情報は得られない。一方、GSK-3 $\beta$ ヘテロ遺伝子欠損 (GSK-3 $\beta$ <sup>+/-</sup>) マウスは正常に発育し、軟骨内骨化に明らかな異常は認められなかった。cGKIIがGSK-3 $\beta$ の機能を制御するということが生理的なものであるかを検討するために、cGKII遺伝子欠損マウスとGSK-3 $\beta$ 遺伝子欠損マウスを掛け合わせて複合遺伝子欠損マウス(cGKII<sup>-/-</sup>;GSK-3 $\beta$ <sup>+/-</sup>) を作出し解析した。その結果、GSK-3 $\beta$ 遺伝子の対立遺伝子の1つを欠失させることでcGKII<sup>-/-</sup>マウスでみられた軟骨細胞肥大分化障害が有意に回復した。これよりcGKIIとGSK-3 $\beta$ は遺伝学的に相互作用があることが示唆された。

Sox9は軟骨分化に欠かせない転写因子として知られており、軟骨細胞の肥大分化を抑制することが知られている。cGKIIはSox9の核内への移行を抑制することで、Sox9による軟骨肥大分化抑制を減弱し、この作用にはcGKIIのキナーゼ活性が不可欠である。一方、cGKIIによるSox9の核内移行抑制は、cGKIIによりリン酸化されないSox9

遺伝子変異体に対しても同様に見られる。これよりcGKIIによるSox9の直接のリン酸化がSox9の細胞内局在を制御するわけではなく、Sox9の細胞内局在を制御するcGKII下流の分子が存在すると考えられている。そこでcGKIIによるSox9の細胞内局在の制御にGSK-3 $\beta$ が関与するかを検討した。その結果、cGKIIはGFP-Sox9の核内移行を抑制し、これはGSK-3 $\beta$ 阻害剤であるLiClを添加しても恒常活性変異型GSK-3 $\beta$ を導入しても影響を受けなかった。このことからcGKIIによるSox9の核内移行の抑制にGSK-3 $\beta$ は関与せず、軟骨肥大分化制御においてcGKII/GSK-3 $\beta$ 経路はcGKII/Sox9経路とは独立していることが示唆された。

GSK-3 $\beta$ は様々なシグナル伝達経路に関与していることが知られており、この中でも軟骨細胞肥大分化との関連が指摘されている古典的Wntシグナルに重要な分子である。古典的Wntシグナルを活性化すると軟骨細胞の肥大分化が促進し、古典的Wntシグナルの主要なエフェクター分子である $\beta$ -cateninの軟骨特異的遺伝子欠損マウスでは軟骨細胞の肥大分化が遅延することが報告されている。そこで本研究では古典的Wntシグナルに注目し、cGKII/GSK-3 $\beta$ 経路との関連について検討した。古典的Wntシグナル活性化の指標であるTOPflashをcGKIIと共導入し、ルシフェラーゼ活性を測定すると、cGKIIを導入しなかった対照群に比べ活性上昇を認め、この上昇は恒常活性型GSK-3 $\beta$ の導入により抑制された。また、軟骨細胞株ATDC5細胞にWT-cGKIIとcGKIIのキナーゼ領域を欠失した $\Delta$  kinase-cGKIIを安定導入しcGMP刺激を加えると、WT-cGKII導入群で $\beta$ -cateninの集積がより強く誘導された。これより、cGKIIは古典的Wntシグナルを活性化し、これはGSK-3 $\beta$ を介することが示唆された。また、野生型マウスの軟骨成長板では $\beta$ -cateninはcGKIIおよびGSK-3 $\beta$ と同様に前肥大細胞層に優位に局在がみられ、cGKII<sup>-/-</sup>マウスの軟骨成長板ではその染色性が低下していた。これより軟骨成長板において $\beta$ -cateninはcGKIIおよびGSK-3 $\beta$ と相互作用し、生体内においてcGKIIにより細胞内の $\beta$ -cateninの発現が調節されていることが示唆された。

次に、軟骨細胞肥大分化制御に関わる主要な転写因子Runx2およびFibroblast Growth Factor (FGF) シグナル伝達経路とcGKIIの関連について検討したが、明らかな関連は認められなかった。

以上のことから、生体内でcGKIIがGSK-3 $\beta$ をリン酸化・不活化することで軟骨細胞肥大分化を制御していることが示唆された。またこのcGKII/GSK-3 $\beta$ 経路は古典的Wntシグナルとクロストークしており、既知のcGKII/Sox9経路とは独立していると考えられた。

本研究により、軟骨細胞の肥大分化を制御するcGKIIに関わる新たな分子ネットワークとその相互作用が明らかとなった。①cGKII/GSK-3 $\beta$ /古典的Wntシグナル伝達経路および②cGKII/Sox9経路の2つの経路を基軸としたcGKIIシグナルの分子メカニズムについて今後の研究の発展に期待したい。