

審査の結果の要旨

氏名 川崎 洋介

本研究は、軟骨内骨化において重要な役割を演じていると考えられるcGKIIの軟骨肥大分化における分子メカニズムを明らかにするために、cGKIIのリン酸化標的分子のスクリーニングを行い、候補分子に関するin vitroおよび遺伝子欠損マウスを用いたin vivoの発現、機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 軟骨細胞肥大分化に関わるcGKIIのリン酸化標的分子を検索するためにスクリーニングを行ったところ、8つの候補分子が同定された。これらについて軟骨細胞株ATDC5細胞における発現をRT-PCR法により解析したところ、すべての候補分子が発現していた。軟骨細胞肥大分化への作用を検討するために、COL10プロモータールシフェラーゼレポーターベクターと共に各候補分子の発現ベクターを導入し、ルシフェラーゼ活性を測定したところ、GSK-3 β がルシフェラーゼ活性を有意に抑制した。リコンビナントcGKIIとリコンビナントGSK-3 β またはATDC5細胞の全細胞溶解液を反応させ、ウェスタンブロット法で解析したところ、GSK-3 β Ser9がリン酸化された。また、マウス軟骨成長板においてGSK-3 β はcGKIIと同様に前肥大軟骨細胞層に優位に局在がみられ、cGKIIと相互作用していることが示唆された。

2. 軟骨細胞肥大分化に対するGSK-3 β の作用を検討するために、GSK-3 β 活性阻害剤であるLiCl存在下でATDC5細胞を三次元培養し、リアルタイムRT-PCRによる解析を行った。その結果、LiClを加えると、加えない場合に比べて軟骨細胞肥大分化マーカーが強く誘導された。また、野生型マウスに比べGSK-3 β ヘテロ遺伝子欠損(GSK-3 β +/-)マウスの培養軟骨細胞において、肥大分化マーカーであるX型コラーゲンのmRNAが有意に上昇した。レトロウイルスベクターを用いてATDC5細胞に恒常活性変異型cGKIIを導入すると肥大分化マーカーの上昇を認め、恒常活性変異型GSK-3 β を共導入すると、この上昇は抑制された。これより、cGKII依存性の軟骨細胞肥大分化にGSK-3 β が抑制的に働くことが明らかとなった。

3. cGKII遺伝子欠損(cGKII-/-)マウスでは軟骨内骨化障害による軟骨成長板の増高を認め、2~3週齢で野生型マウスとの差が最も大きく、8週齢ではほとんど差はなくなった。また、cGKII-/-マウスの軟骨成長板では、BrdU陽性細胞とX型コラーゲンmRNA発現細胞が混在してみられる中間層が存在した。中間層は、野生型マウスの肥大軟骨細胞層に比べ、X型コラーゲンの発現量が低下している傾向がみられた。一方、GSK-3 β +/-マウスは正常に発育し、軟骨内骨化は正常であった。cGKII遺伝子欠損マウスとGSK-3 β 遺伝子欠損マウスを掛け合わせ、cGKII-/-;GSK-3 β +/-マウスを作出し解析した。その結果、各マウス間で、膜性骨化の指標は有意な差を認めなかったが、軟骨内骨化の指標である長管骨長やCalvarial lengthは、野生型マウスと比べcGKII-/-マウスで有意に減少し、cGKII-/-;GSK-3 β +/-マウスではその減少が回復していた。3週齢cGKII-/-;GSK-3 β +/-マウスの軟骨成長板を解析したところ、cGKII-/-マウスでみられた軟骨成長板の増高が約70%回復していた。これらの知見はGSK-3 β

遺伝子の対立遺伝子の1つを欠失させることで、cGKII^{-/-}マウスでみられた軟骨細胞肥大分化障害が有意に回復することを示しており、cGKIIとGSK-3βは遺伝学的に相互作用があることが明らかとなった。

4. cGKIIはSox9の核内移行を抑制することで、軟骨細胞肥大分化を制御することが報告されている。このcGKII/Sox9経路にGSK-3βが関与するかを検討した。cGKIIはGFP-Sox9の核内移行を抑制し、これはGSK-3β阻害剤であるLiClを添加しても恒常活性変異型GSK-3βを導入しても影響を受けなかった。これよりGSK-3βはcGKII/Sox9経路とは独立していることが示唆された。

5. cGKIIシグナルと古典的Wntシグナルの関連について検討するために、TOPflashをcGKIIと共導入し、ルシフェラーゼ活性を測定すると活性上昇を認め、この上昇は恒常活性型GSK-3βの導入により抑制された。また、ATDC5細胞にcGKIIのキナーゼ領域を欠損した Δ kinase-cGKIIとWT-cGKIIを安定導入しcGMP刺激を加えると、WT-cGKII導入群でβ-cateninの集積がより強く誘導された。これよりin vitroで、cGKIIは古典的Wntシグナルを活性化し、これはGSK-3βを介していることが明らかとなった。また、野生型マウスの軟骨成長板では、β-cateninはcGKIIおよびGSK-3βと同様に前肥大細胞層から肥大細胞層に優位に局在がみられ、cGKII^{-/-}マウスではその染色性が低下していた。これより生体内においてcGKIIにより細胞内のβ-cateninの発現が調節されていることが示唆された。

6. 野生型マウスではRunx2は肥大細胞層に優位に局在がみられ、cGKII^{-/-}マウスでは中間層に優位に局在がみられた。また、ATDC5細胞においてcGKIIを強制発現してもRunx2の発現量は変化しなかった。これより、Runx2の発現制御にcGKIIは関与しないことが明らかとなった。更に、HeLa細胞にGFP-Runx2を導入したところ、cGKIIの強制発現の有無に関わらずGFP-Runx2は核内に優位に局在した。これより、Runx2の細胞内局在制御にcGKIIは関与しないことが明らかとなった。

7. ATDC5細胞にcGKIIを導入し、FGF-2による刺激を加えて、MAPK/STATシグナルの変化を観察した。その結果、FGF-2はErk1/2を最も強くリン酸化したが、cGKIIを強制発現してもMAPK/STATシグナルは変化しなかった。これより軟骨ではcGKIIはFGFシグナルおよびMAPK/STATシグナル伝達経路には関与しないことが示唆された。

本論文は、cGKIIのリン酸化標的分子としてGSK-3βを同定し、cGKIIがGSK-3βをリン酸化することで軟骨細胞肥大分化を制御していることを明らかにした。更にこのcGKII/GSK-3β経路は既知のcGKII/Sox9経路とは独立しており、古典的Wntシグナルとクロストークしていることを解明した。この知見は軟骨分化シグナルネットワークを解明する手がかりになり、さらに軟骨分化の異常が引き起こす骨系統疾患などを含む様々な疾患の病態生理の理解と将来の治療法の開発に役立つことが期待され、学位の授与に値するものと考えられる。