

論文の内容の要旨

論文題目 軟骨細胞分化における GSK-3/RelA シグナルの機能解析に関する研究

東京大学大学院医学系研究科 平成 20 年 4 月入学 医学博士課程外科学専攻

氏名 伊藤 祥三

【要旨】

近年の日本では少子高齢化が急速に進んでおり、高齢者の要支援・要介護者の増加、およびそれに伴う医療コストの増大が社会問題となっている。要支援・要介護状態に陥る原因として変形性関節症に代表される軟骨変性を基盤とした関節変性疾患は上位に位置しており、関節変性疾患に対する新規の予防・治療法開発は整形外科学に課せられた急務と言える。軟骨再生による治療法の実現には、軟骨細胞の発生・分化に関与するシグナルネットワーク群を解明し、それを応用する手法が有用であると考えられる。

脊椎動物の四肢の発生においては軟骨内骨化が重要な役割を果たしている。軟骨内骨化の過程においては未分化間葉系細胞が凝集し、その後軟骨前駆細胞、軟骨細胞へと分化する。軟骨細胞は増殖しながら中心部に向かって成熟し、肥大軟骨細胞を含む軟骨成長板を形成する。肥大軟骨細胞の一部は石灰化し、軟骨内への血管侵入とともにアポトーシスに至り、骨への置換が起こる。

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) は転写因子、構造タンパク、シグナルタンパクをはじめとして多数の基質を持つセリン・スレオニンキナーゼである。哺乳類ではそれぞれ独立した遺伝子によりコードされる GSK-3 α と GSK-3 β という 2 種類のアイソフォームが存在する。

GSK-3 には複数の活性調節機構が存在する。GSK-3 は上流キナーゼによりリン酸化されると基質との結合が妨げられ、不活性型となる（リン酸化依存型機構）。また GSK-3 は古典的 Wnt シグナルの調節因子としても機能するが、その際の活性調節は Axin・Adenomatous polyposis coli (APC) などの骨格タンパクとの結合により行われる（リン酸化非依存型機構）。

PI3K/Akt、cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA)、protein kinase C (PKC)、および古典的 Wnt シグナルは軟骨分化に関与することが報告されており、それらの中心的なメディエーターである GSK-3 はこの過程に重要な役割を果たすと考えられる。

本研究においては軟骨細胞分化の背景に存在するシグナルネットワーク群について GSK-3 を中心として解析することを目的とした。

まず軟骨細胞における GSK-3 の発現、機能を確認し、GSK-3 遺伝子欠損マウスの骨格系に関する表現型、組織学的特徴を解析し、生理的条件下における GSK-3 の役割を検討した。さらに軟骨細胞分化に

における GSK-3 の基質のスクリーニングを行い、候補分子として NF- κ B ファミリーメンバー RelA を同定し、その機能解析を行った。

マウス未分化軟骨細胞株 ATDC5 細胞の分化誘導培養において、GSK-3 α と GSK-3 β はともにコンスタントに発現していたが、初期分化では活性型、後期分化では不活性型として存在した。マウス胎児脛骨切片の免疫染色では肥大細胞層に不活性型である p-GSK-3 が発現していた。

Gsk3a^{-/-}マウス・Gsk3b^{+/-}マウスは野生型 (WT) と比較して成長に差は見られなかったが、Gsk3a^{-/-}・Gsk3b^{+/-}マウスは胎生期より成長障害を呈し、出生後も catch up しなかった。組織学的には増殖細胞層の染色性の低下、初期分化マーカー Col2 の発現低下が見られたが、後期分化マーカー Col10・Ihh・Pth1r の発現には差はなかった。

GSK-3 α ・GSK-3 β を安定導入した ATDC5 細胞を分化誘導培養すると、それぞれの単独導入で初期分化マーカー Sox9・Col2a1・Acan の mRNA 発現は増加し、共導入によりさらに上昇した。逆に siGSK-3 α ・siGSK-3 β を導入すると、それぞれの単独導入で初期分化マーカーの mRNA 発現は減少し、共導入によりさらに低下した。GSK-3 遺伝子欠損マウス胎児より肋軟骨細胞を採取・培養すると、Gsk3a^{-/-}・Gsk3b^{+/-}マウスでは初期分化マーカーの mRNA 発現は減少した。また、GSK-3 α or GSK-3 β の欠損による代償性の発現上昇は見られなかった。

以上のデータより GSK-3 α ・GSK-3 β は軟骨初期分化の段階で働いて分化を促進しており、それぞれの機能は重複していると推測された。

軟骨細胞で GSK-3 の遺伝子欠損が古典的 Wnt シグナルに与える影響について検討したが、 β -catenin の転写活性、発現レベル、細胞内局在は変化せず、軟骨初期分化における古典的 Wnt シグナルの関与は否定的と考えられた。そこで軟骨分化における GSK-3 のリン酸化ターゲット分子を探索するため、3段階でのスクリーニングを行った。その結果、NF- κ B ファミリーメンバー RelA が同定された。

ルシフェラーゼアッセイにより軟骨細胞での GSK-3 による RelA リン酸化部位として 254 番のスレオニン残基 (T254) が同定され、同部位の変異により RelA の軟骨初期分化マーカーに対する転写活性化作用が著しく低下した。

RelA は GSK-3 と同様に初期分化から後期分化にわたり、コンスタントな発現が見られたが、p-RelA^{T254} は初期分化で発現しており、後期分化ではほとんど発現が見られなかった。マウス胎児脛骨切片の免疫染色では p-RelA^{T254} は増殖細胞層で優位に発現していた。この結果は GSK-3 α ・GSK-3 β が初期分化の段階で活性型として存在することと一致していた。

培養 ATDC5 細胞において、GSK-3 の導入で p-RelA^{T254} の発現が増加し、siGSK-3 の導入で減少したことから、GSK-3 は RelA を直接リン酸化してその転写活性を制御していると考えられた。一方、GSK-3/siGSK-3 で RelA の核内移行・発現レベル・細胞内局在は変化しなかった。

Rela fl/fl マウスの肋軟骨細胞に外在性 Cre を強制発現させ、RelA の deletion を行うと初期分化マーカーの mRNA 発現低下が見られた。これは野生型 RelA の導入で回復したが、T254A-RelA・GSK-3 では回復しなかった。以上から RelA は軟骨初期分化に促進的に働いており、GSK-3 による T254 のリン酸化は RelA の機能調節に重要と思われた。

in vivo での RelA の機能を検討するため、2 種類の組織特異的遺伝子欠損 (*Prx1-Cre;Rela fl/fl*、*Col2a1-Cre;Rela fl/fl*) マウスを作出し、解析を行った。その結果、*Prx1-Cre;Rela fl/fl* マウスは長管骨の成長障害を呈し、*Col2a1-Cre;Rela fl/fl* マウスは全身性の成長障害を示した。組織学的には両者でともに増殖細胞層の染色性低下・Col2 の発現減少が見られ、その表現型は *Gsk3a^{-/-};Gsk3b^{+/-}* マウスと類似していた。

以上の事実より、GSK-3 α ・GSK-3 β は軟骨細胞で協調して機能し、RelA T254 のリン酸化を介して軟骨初期分化を制御すると考えられた。