

論文の内容の要旨

論文題目 軟骨細胞における静水圧刺激による
シグナル伝達に関する研究

氏名 刈屋(松村) 佑美

論文要旨：

(背景と目的)

生体内において、細胞は常に化学刺激や物理刺激などの多くの細胞外刺激に曝露されている。これらの様々な細胞外刺激に対して適切に細胞応答することで、細胞はホメオスタシスを保っている。細胞外刺激によって引き起こされる細胞応答は、細胞増殖の促進や細胞の分化、細胞形態の変化、細胞遊走など多岐に渡り、これらの様々な細胞応答はそれぞれ特異的なシグナル伝達経路によって制御されている。これらのシグナル伝達経路を同定することによって、シグナル伝達経路の活性の制御による効率的な細胞応答の誘導が可能になると予想され、疾病に対する新たな治療法の確立や、再生医療などの臨床分野への応用も期待される。

本研究室は、生体内において関節軟骨内の軟骨細胞に負荷される物理刺激の一種である静水圧に着目し、その生理学的機能について研究を行ってきた。生体から軟骨細胞を摘出して2次元培養を行うと、軟骨細胞のマーカーmRNAであるII型コラーゲン(*Col2a1*)やプロテオグリカンの一種である *Aggrecan* の発現が低下し、脱分化することが分かっている。我々は現在までに、脱分化した軟骨細胞への静水圧負荷によって、これらのマーカーmRNA の発現が亢進し、軟

骨細胞への再分化が促進されることを報告している。しかし、静水圧負荷による軟骨細胞分化のメカニズムについては、ほとんど解明されていない。そこで、静水圧刺激のシグナル伝達経路の同定を試みた。

(結果及び考察)

マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞に静水圧を負荷し、各シグナル分子のリン酸化抗体を用いた Western blotting 法や、活性化した低分子量 G タンパク質のみを認識するリコンビナントタンパク質を用いたプルダウンアッセイ法を用いて解析を行ったところ、静水圧負荷によって複数のシグナル伝達経路が活性化することが明らかになった。まず、静水圧負荷によって、MAPK である ERK のリン酸化(活性化)の亢進が観察された。ERK の MAPKK である MEK の選択的阻害剤である UO126 の存在下では、静水圧負荷による ERK の活性化が抑制されたことから、静水圧負荷による MEK/ERK 経路の活性化が明らかになった。更に、静水圧負荷による低分子量 G タンパク質 Ras 及び Rap1 の活性化が確認されたことから、静水圧負荷による MEK/ERK 経路の活性化は、Ras 及び Rap1 によって制御される可能性が示唆された。一方、cAMP 依存性のプロテインキナーゼ PKA の選択的阻害剤である H89 存在下において、Rap1 及び ERK の活性化が亢進したことから、ATDC5 細胞では PKA が Rap1 及び ERK の活性化を抑制していることが明らかになった。このことから、ATDC5 細胞は他細胞より比較的高い cAMP の濃度を有することも示唆された。以上より、ATDC5 細胞において、cAMP/Epac1 経路は Rap1 を介して ERK を活性化するが、cAMP/PKA 経路は Epac1 による Rap1 の活性化を抑制すると考えられる。しかし、H89 存在下において静水圧を負荷した際にも、負荷時間依存的な ERK の活性化が見られたことから、この経路以外にも、静水圧依存的に ERK を活性化する経路が存在することが予想される。また、本研究の結果から静水圧負荷による Ras の活性化が確認されているため、Ras によって MEK/ERK 経路が活性化する可能性も示唆された。次に、軟骨細胞のマーカー mRNA である *Col2a1* や *Aggrecan* の発現を制御する重要な転写因子である *Sox9* の発現に静水圧負荷が与える影響を定量 RT-PCR 法を用いて検討したところ、静水圧負荷によって *Sox9* の発現が亢進することが明らかになった。一方、UO126 存在下においても *Sox9* の発現の亢進が見られたこと

から、静水圧負荷による *Sox9* の発現誘導には、MEK/ERK 経路は関与しないことが明らかになった。加えて、*Sox9* の発現を制御する転写因子の一つである CREB も静水圧負荷によって活性化されることが分かったが、この活性化にも MEK/ERK 経路は関与しなかった。これらの結果から、本実験下において静水圧負荷による MEK/ERK 経路非依存的な CREB もしくは他の転写因子の活性化によって、*Sox9* の発現誘導が起こる可能性が示唆された。一方、細胞膜とアクチン線維のリンカータンパク質であり、アクチン細胞骨格のリモデリングに関与する ERM タンパク質が、静水圧負荷によって活性化されることも明らかになった。ERM タンパク質は、低分子量 G タンパク質 RhoA とそのエフェクター分子である Rho 結合キナーゼ(ROCK)によって活性化されることが知られていることから、静水圧負荷による RhoA/ROCK/ERM タンパク質経路によるアクチン細胞骨格のリモデリングの促進が示唆された。

静水圧負荷による Rap1 の活性化が認められたため、この活性化メカニズムについて更に検討を行った。Rap1 の活性化因子である Epac1 は、同じく静水圧による活性化が明らかになった ERM タンパク質の一つである Ezrin と相互作用することが報告されており、Ezrin も Rap1 と同様にアクチン細胞骨格のリモデリングに関与することが知られている。ERM タンパク質は、ROCK 等によって活性化されることで構造変化を起こし、細胞膜とアクチン細胞骨格に結合しリンカータンパク質として機能できるようになる。また、一般的に低分子量 G タンパク質は互いの活性を制御し合う、すなわちクロストークすること知られているために、静水圧負荷によって Ezrin を介して RhoA と Rap1 がクロストークするのではないかと考え、生化学的及び分子生物学的解析、蛍光顕微鏡観察によって検討を行った。その結果、Ezrin が Epac1 と相互作用して複合体を形成し、RhoA による Ezrin の活性化を介して Ezrin-Epac1 複合体が細胞質から細胞膜へと移行することが観察された。また、Epac1 の細胞膜移行によって Rap1 の活性化が亢進することも明らかになった。これらの結果から、静水圧負荷によって、RhoA/ROCK/Ezrin/Epac1/Rap1 経路が活性化する可能性が示唆された。

(結論)

本博士論文研究から、静水圧負荷による低分子量 G タンパク質 Ras 及び Rap1 の活性化に加えて MEK/ERK 経路の活性化が認められたことから、Ras 及び Rap1 による ERK/MAPK 経路の活性化が初めて示唆された。また、静水圧負荷による MEK/ERK 経路に非依存的な転写因子 CREB の活性化及び *Sox9* の発現量の増加も新規に明らかになった。加えて、静水圧負荷によって活性化された ERM タンパク質の Ezrin が、RhoA と Rap1 のシグナル伝達経路をクロストークさせるシグナル分子として機能する可能性も示された。以上より、静水圧刺激は多くのシグナル分子を活性化する多機能な物理刺激であることが証明された。静水圧刺激応答性の各シグナル伝達経路の活性化による細胞増殖や細胞分化等の細胞応答の誘導メカニズムについて更に検討を重ねることで、将来的に軟骨疾患に対する治療法の開発や、幹細胞を細胞ソースとした再生医療への知見の応用が期待される。