

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06825

研究課題名(和文)Erk5シグナルによる内軟骨性骨化制御機構

研究課題名(英文)The MAPK Erk5 is necessary for proper skeletogenesis through a molecular axis that involves Smurfs-Smads-Sox9

研究代表者

家崎 高志 (IEZAKI, Takashi)

金沢大学・先端科学・イノベーション推進機構・博士研究員

研究者番号：30784285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨無形成症は長管骨の成長障害をきたす難病のうちでも最も頻度が高い疾患であり、FGFR3遺伝子の点変異が原因であると考えられている。これまでの研究では間葉系幹細胞特異的Erk5欠損マウスの表現型がFGFR3欠損マウスの表現型と高い類似性があることを見出した。そこで本研究課題では、Erk5シグナルによる内軟骨性骨化の制御メカニズムについて明らかにする。Erk5欠損マウスの表現型を詳細に解析した結果、Erk5欠損マウスでは、Smurf2、Smad1のリン酸化が低下し、Smadのユビキチン化と分解が抑制されることで、Sox9タンパク質の過剰な発現により骨格形成に異常を起こす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Erk5 belongs to the MAPK family. Following its phosphorylation by Mek5, Erk5 modulates several signaling pathways in a number of cell types. Here, we show that Erk5 inactivation in mesenchymal cells caused abnormalities in skeletal development by inducing the protein level of Sox9, which is an important transcription factor of skeletogenesis. We further demonstrate that Erk5 directly phosphorylates and activates Smurf2 (a ubiquitin E3 ligase) at Thr249, which promotes the proteasomal degradation of Smad proteins and phosphorylates Smad1 at Ser206 in the linker region known to trigger its proteasomal degradation by Smurf1. Smads transcriptionally activated the expression of Sox9 in mesenchymal cells. Accordingly, removal of one Sox9 allele in mesenchymal cells from Erk5-deficient mice rescued some abnormalities of skeletogenesis. These findings highlight the critical requirement of the Mek5-Erk5-Smurfs-Smads-Sox9 axis in mammalian skeletogenesis.

研究分野：骨格形成

キーワード：キナーゼ 軟骨細胞 骨関節疾患 骨格形成

### 1. 研究開始当初の背景

椎骨、四肢骨では軟骨細胞による軟骨形成後に骨芽細胞によって骨組織に置換される内軟骨性骨化により骨組織が形成され、成長期の骨の成長は骨端の軟骨細胞の増殖と骨化のバランスにより調節される。軟骨無形成症は、内軟骨性骨化の異常により長管骨の成長障害をきたす骨系統疾患であり、四肢短縮型小人症のうちもっとも頻度が高いもので、厚生労働省により難治性疾患に指定されている。FGFR3 遺伝子の G380R 点変異による過剰な活性化が原因とされているが、この疾患に対しては成長ホルモン投与療法や、外科的骨延長術が適用されているが、いずれも対症療法であり、有効な治療薬は開発されていない。

申請者は軟骨細胞成熟を調節する新規因子の探索を目的とし、Extracellular-signal-regulated kinase 5 (Erk5) シグナルによる軟骨細胞分化・成熟調節メカニズムの解明を試みた。Erk5 は Erk1/2、JNK、p38 を含む mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼである。申請者が世界に先駆けて作製した間葉系幹細胞特異的 Erk5 欠損マウス (*Prx1-cre;Erk5<sup>fl/fl</sup>* マウス) は指の骨の劇的な屈曲、四肢の長管骨の増大、軟骨組織の過成長という表現型を示した。この表現型は FGFR3 全身欠損マウスで見られる表現型と類似しており (Colvin et al., *Nat Genet* 1996)、Erk5 が内軟骨性骨化による骨格形成に重要な役割を持つことを示すとともに、上述の骨疾患との関連性を想起させるものである。

### 2. 研究の目的

本研究課題では Erk5 シグナルによる内軟骨性骨化の制御メカニズムについて明らかにし、FGFR3 と Erk5 のシグナルクロストークを解析することで、軟骨無形成症の発症、進展における Erk5 の重要性を明らかにする。本研究により、軟骨細胞機能における Erk5 の重要性および、FGFR3 と Erk5 のシグナルクロストークの重要性を明らかにすることができる。また、Erk5 シグナルの機能変動が、骨格形成および、骨系統疾患の発症に重要な役割を持つことが明らかとなることが予想される。そして、その成果を基盤とすることで軟骨細胞の Erk5 を標的とした、新規骨系統疾患治療薬の開発の展開が可能となる。上述のように軟骨無形成症は四肢短縮型小人症の中では頻度の高い難病であり、病態解明および治療薬の開発は進んでいないため、本研究の社会的、学術的意義は非常に高い。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、内軟骨性骨化における Erk5 シグナルおよび、軟骨無形成症発症および骨系統疾患における Erk5 シグナルの重要性を明らかにするため、以下の項目を実施

する。

間葉系幹細胞特異的 Erk5 欠損マウスの表現型の詳細な解析

*Prx1-cre;Erk5<sup>fl/fl</sup>* マウスを用いて胎児全身骨格標本作製し、発生の段階における骨格形成の表現型を解析する。また、マウス長管骨の骨組織切片を作製し、遺伝子欠損マウス組織における表現型を解析する。またこの遺伝子欠損マウスは既に作成済みのため、迅速な研究遂行が可能である。胎児全身骨格標本において遺伝子欠損マウスで表現型が認められない場合は、生後 1-3 ヶ月齢のマウスを経時的に観察し、長管骨の状態を観察する。

Erk5 欠損マウスを用いた骨関節疾患モデルマウス作成

*Prx1-cre;Erk5<sup>fl/fl</sup>* マウスに外科的疾患モデル手術を適用し、病態の変化を解析する。骨粗鬆症モデル、変形性関節症モデルの適用を予定しているが、研究の結果によっては関節炎モデルも予定している。

Erk5 シグナル下流遺伝子の同定とその軟骨細胞での機能解析

*Prx1-cre;Erk5<sup>fl/fl</sup>* マウスの表現型の異常がどのようなメカニズムで起こるのかを細胞を用いた *in vitro* の系で解析する。Erk5 は MAPK ファミリーに属するリン酸化キナーゼとして、下流のタンパク質のリン酸化に関与する。そのため本項目では、

上述の遺伝子欠損マウスから間葉系幹細胞を採取し、軟骨細胞分化培地で培養し、軟骨細胞への分化成熟を検討する。また、骨格形成に関与する因子を中心に mRNA、タンパク質発現解析を行う。また、Erk5 はリン酸化キナーゼであるため、変化が見られた因子および関連する因子のリン酸化の状態を網羅的に解析する。リン酸化の状態に変化が見られなかった場合は、Erk5 は C 末端領域に転写活性化領域を持つ特殊な構造のキナーゼであることが報告されているため、Erk5 が直接転写調節に関わる可能性を検討するため、ルシフェラーゼレポーターシステムを用いたプロモーター解析により、変化が見られた因子の Erk5 による転写活性化を検討する。

(b) (a) で同定した因子、またはその発現を調節する因子が Erk5 により直接リン酸化を受けるかを検討するため、recombinant Erk5 タンパク質を精製する。(a) で同定した因子も同様に精製し、*in vitro* kinase assay により Erk5 のリン酸化基質となるか検討を行う。

(c) (b) で同定した因子について、間葉系幹細胞にレンチウイルスを用いて導入し、(a) で観察された遺伝子欠損マウス由来細胞の表現型(細胞の分化成熟、mRNA とタンパク質の発現変動)が回復するかを検討する。

FGFR3 と Erk5 のシグナルクロストークの解析

上述のように軟骨無形性症の原因の一つとして、FGFR3 の点変異による活性化が報告されている。また、間葉系幹細胞特異的 Erk5 欠損マウスの表現型は FGFR3 欠損マウスの表現型と類似している。そのため、FGFR3 と Erk5 はシグナルクロストークしており、同疾患の発症にはその異常が関与する可能性がある。そこで本項目では、細胞を用いたシグナルクロストーク解析をするため、

- (a) 間葉系幹細胞に活性化型 FGFR3 変異体を導入し、軟骨無形成症モデル細胞を作製する。その細胞における Erk5 の活性化の状態 (Mek5、Erk5 のリン酸化) を測定する。
- (b) 作成した FGFR3 変異細胞に FGFR3 阻害剤、Erk5 阻害剤の暴露、活性化型、不活性化型 Erk5 変異体の導入を行い、軟骨細胞への分化成熟が回復するか観察する。

#### 4. 研究成果

骨格形成における Erk5 の重要性を検討するため、胎児骨格標本作製し観察した。その結果、Erk5 欠損マウスでは頭蓋冠の形成不全、四肢の長管骨の肥大、指の骨の骨化不全が観察された。

Erk5 欠損マウスの表現型のメカニズムを詳細に検討するため、Erk5 欠損細胞において変化が見られる骨格形成関連遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、軟骨細胞分化マーカーである Sox9、Col2a1、Acan の mRNA とタンパク質発現上昇、MMP13、Col10a1 の mRNA 発現低下、Smad1/2/3 のタンパク質発現の上昇が観察された。

変化が見られた因子の詳細な解析を行ったところ、Sox9 の発現は mRNA、タンパク質ともに上昇しているのに対して、Smad はタンパク質の発現が上昇しているにも関わらず、mRNA の発現には変化が見られなかった。また、Smad タンパク質の分解速度が低下していることが示された。

Erk5 がリン酸化キナーゼであることから、変化が見られた各タンパク質と、Erk5 を *in vitro* kinase assay により反応させ、Erk5 の基質となるかを検討した。その結果、Smad1、Smurf2 タンパク質のリン酸化が上昇し、Erk5 の基質となる可能性が示唆された。

Smurf2 がユビキチンリガーゼであることから、Smad の分解速度が低下していたことから、Erk5 欠損細胞ではユビキチンプロテアソーム系による Smad タンパク質の分解が低下しているかを検討した。その結果、Smurf2 のリン酸化部位 T249 のリン酸化状態の変異により Smad1/2 のユビキチン化が変化することが示された。

Erk5 欠損により、Smad の分解が低下することで、Sox9 の転写が促進しているかを検討するため、Erk5 欠損細胞で Sox9 プロモーターの ChIP 解析を行った。その結果、Erk5 欠

損細胞では、Smad1/2/3 の Sox9 プロモーター上へのリクルートが上昇し、Sox9 の mRNA の転写が促進していることが明らかになった。

Erk5 欠損マウスの表現型が Sox9 の過剰な転写促進にあることを検討するため、Erk5 欠損マウスに Sox9<sup>fl/+</sup>を導入した Sox9 ヘテロ欠損マウスをレスキューマウスとして、胎児骨格標本作製し観察した。その結果 Erk5 欠損マウスの表現型の一部である指の骨の骨化不全がレスキューマウスでは回復することが観察された。

以上の結果より、Erk5 は Smurf2、Smad1 のリン酸化を制御することにより、Smad1/2/3 のユビキチン化と分解を促進することで、Sox9 タンパク質の過剰な発現を抑制していること、Erk5 欠損マウスではそのシステムが破綻することにより、Sox9 の過剰な発現により軟骨形成を介した骨格形成に異常をきたす可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

1. Horie T, Fukasawa K, Iezaki T, Park G, Onishi Y, Ozaki K, Kanayama T, Hiraiwa M, Kitaguchi Y, Kaneda K, Hinoi E. 'Hypoxic Stress Upregulates the Expression of Slc38a1 in Brown Adipocytes via Hypoxia-Inducible Factor-1 .' *Pharmacology*. 2018;101(1-2):64-71. 査読有

doi: 10.1159/000480405.

2. Park G, Horie T, Fukasawa K, Ozaki K, Onishi Y, Kanayama T, Iezaki T, Kaneda K, Sugiura M, Hinoi E. 'Amelioration of the Development of Osteoarthritis by Daily Intake of -Cryptoxanthin.' *Biol Pharm Bull*. 2017;40(7):1116-1120. 査読有

doi: 10.1248/bpb.b17-00161.

3. Park G, Horie T, Iezaki T, Okamoto M, Fukasawa K, Kanayama T, Ozaki K, Onishi Y, Sugiura M, Hinoi E. 'Daily oral intake of -cryptoxanthin ameliorates neuropathic pain.' *Biosci Biotechnol Biochem*. 2017 May;81(5):1014-1017. 査読有

doi: 10.1080/09168451.2017.1280661.

4. Park G, Horie T, Kanayama T, Fukasawa K, Iezaki T, Onishi Y, Ozaki K, Nakamura Y, Yoneda Y, Takarada T, Hinoi E. 'The transcriptional modulator Irf1 controls PGC-1 expression under short-term adrenergic stimulation in brown adipocytes.' *FEBS J*. 2017 Mar;284(5):784-795. 査読有

doi: 10.1111/febs.14019.

5. Takarada T, Xu C, Ochi H, Nakazato R, Yamada D, Nakamura S, Kodama A, Shimba S,

Mieda M, Fukasawa K, Ozaki K, Iezaki T, Fujikawa K, Yoneda Y, Numano R, Hida A, Tei H, Takeda S, Hinoi E. ' Bone Resorption Is Regulated by Circadian Clock in Osteoblasts. ' J Bone Miner Res. 2017 Apr;32(4):872-881. 査読有

doi: 10.1002/jbmr.3053.

6. Onishi Y, Park G, Iezaki T, Horie T, Kanayama T, Fukasawa K, Ozaki K, Hinoi E. ' The transcriptional modulator Ildr1 is a negative regulator of BMP-2-dependent osteoblastogenesis. ' Biochem Biophys Res Commun. 2017 Jan 8;482(2):329-334. 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.063.

7. Fukasawa K, Park G, Iezaki T, Horie T, Kanayama T, Ozaki K, Onishi Y, Takahata Y, Yoneda Y, Takarada T, Kitajima S, Vacher J, Hinoi E. ' ATF3 controls proliferation of osteoclast precursor and bone remodeling. ' Sci Rep. 2016 Aug 2;6:30918. doi: 10.1038/srep30918. 査読有

8. Iezaki T, Fukasawa K, Park G, Horie T, Kanayama T, Ozaki K, Onishi Y, Takahata Y, Nakamura Y, Takarada T, Yoneda Y, Nakamura T, Vacher J, Hinoi E. ' Transcriptional Modulator Ildr1 Regulates Osteoclast Differentiation through Enhancing the NF- B/NFATc1 Pathway. ' Mol Cell Biol. 2016 Sep 12;36(19):2451-63. 査読有

doi: 10.1128/MCB.01075-15.

9. Iezaki T, Ozaki K, Fukasawa K, Inoue M, Kitajima S, Muneta T, Takeda S, Fujita H, Onishi Y, Horie T, Yoneda Y, Takarada T, Hinoi E. ' ATF3 deficiency in chondrocytes alleviates osteoarthritis development. ' J Pathol. 2016 Aug;239(4):426-37. 査読有

doi: 10.1002/path.4739.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家崎 高志 (IEZAKI, Takashi)

金沢大学・先端科学・イノベーション推進機構・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー・博士研究員

研究者番号: 30784285

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )