

平成21年 5月 11日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791019

研究課題名（和文） JNKシグナル系による骨代謝制御機構の解析

研究課題名（英文） Regulation of Bone metabolism by JNK signaling

研究代表者

中村 貴（NAKAMURA TAKASHI）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：80431948

研究成果の概要：

本研究ではストレスシグナル伝達系である、MKK-JNKシグナル経路の骨細胞における生体内高次機能の解明を目的として研究を進める。具体的には、1) 骨細胞特異的な時期特異的遺伝子破壊システムの構築と条件付き SEK1 遺伝子破壊マウス系統の樹立を行う。続いて、これらマウス系統を交配する事で 2) 骨細胞特異的 SEK1, MKK7 遺伝子破壊マウスの作出を行い、ストレス応答性シグナル伝達分子の骨組織での高次機能について解析を行う。さらに、ストレス応答経路の分子機構を解明する事により、3) 骨組織の重力ストレス感知機構における新規分子標的の同定を目的とする。これまでに MKK7 遺伝子破壊マウスの作出され、成長遅延の表現型が観察されており、骨組織への影響も生じていると考えられる。本マウスの詳細な解析により、本シグナルの新たな生理機能が解明されると期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：ストレス、JNK、SEK1、MKK4、MKK7、骨、遺伝子破壊、リン酸化

1. 研究開始当初の背景

骨細胞由来の培養細胞が電気刺激等のストレスに応答し、細胞内シグナル伝達系の活性化が見られる事、骨組織内ではギャップ結合による神経細胞様の細胞間ネットワークを形成し、その一部が骨芽細胞や破骨細胞とも接している事などから、骨細胞が重力ストレ

ス関知細胞として機能し、骨芽細胞や破骨細胞へその情報を伝達する事で骨形態を制御する可能性が示唆されていた。また最近になって、薬剤処理によって骨細胞を欠失させた骨では、微小重力下において顕著な骨減少を起ささない事が報告され、骨細胞の重力ストレス感知・伝達機構が注目されている。

2. 研究の目的

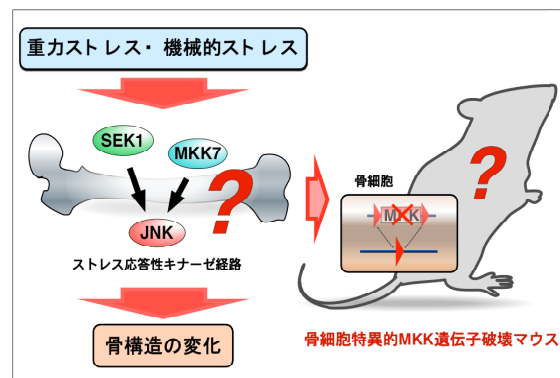
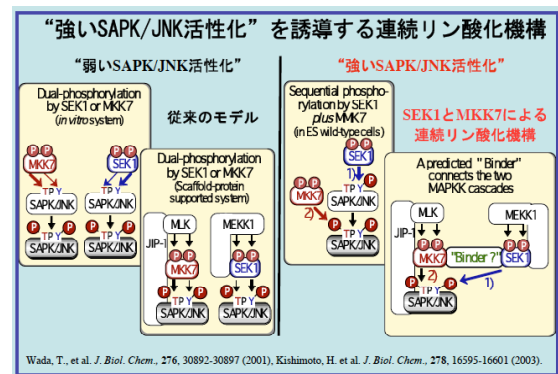
生物は様々な外部環境の変動（ストレス）に対して、的確に応答する事で生体内の恒常性を保ち、個体を維持している。このようなストレスには高温や紫外線のほか、ウイルス・細菌等の生体に対する異物、機械的刺激、更には心理的・生理的刺激など非常に多くの種類が存在する。近年、これらの様々なストレス刺激によって、c-Jun amino-terminal kinase(JNK)系を介するシグナル伝達系が活性化され、細胞増殖・分化・機能調節に関与する事が、主に培養細胞を用いた研究によって明らかになってきている。申請者が新たに所属する研究グループでも、これまでに2種類の活性化因子、SEK1/MKK4とMKK7が協調してJNKをリン酸化し、強力な活性化状態を誘導する事、さらにSEK1およびMKK7の全身性遺伝子破壊マウス系統を樹立し、ともに胎生期の10.5~12.5日齢で致死である事を見出している。

近年、MKK-JNK経路による生体調節機構が注目されており、本研究領域での論文数は増加傾向にある。しかしながら、従来の手法によって作出されたSEK1、MKK7の全身性遺伝子破壊マウスは胎生致死であるため、成体における細胞種特異的な機能解析が不可能であった。そこでCre/loxPシステムによる条件付き遺伝子破壊法を用いる事で、胎生期での致死を回避し、成体骨組織における特異的機能について解析を試みる。

一方、骨組織は生体を構築する最大の結合組織として、身体支持という重要な役割を担う。その為、骨組織は重力に代表される機械的ストレスを感知し、自らその形態を変化させることで物理的強度を維持している。このような骨の再構築は、骨形成を司る骨芽細胞と骨吸収を行う破骨細胞によって行われている。一方で、骨基質中に存在する骨細胞(osteocyte)は骨組織構成細胞の中でもっとも数が多い細胞種であるにも関わらず、硬組織に埋まって存在する為に研究材料として扱いにくく、その生理的役割は不明である。しかしながら、骨細胞由来の培養細胞が電気刺激等のストレスに応答し、細胞内シグナル伝達系の活性化が見られる事、骨組織内ではギャップ結合による神経細胞様の細胞間ネットワークを形成し、その一部が骨芽細胞や破骨細胞とも接している事などから、骨細胞が重力ストレス感知細胞として機能し、骨芽細胞や破骨細胞へその情報を伝達する事で骨形態を制御する可能性が示唆されている。また最近になって、薬剤処理によって骨細胞を欠失させた骨では、微小重力下において顕著な骨減少を起こさない事が報告され、骨細胞の重力ストレス感知・伝達機構が注目され

つつある。

以上の背景から、本研究ではストレスシグナル伝達系である、MKK-JNKシグナル経路の骨細胞における生体内高次機能の解明を目的として研究を進める。具体的には、1)骨細胞特異的な時期特異的遺伝子破壊システムの構築と条件付きSEK1遺伝子破壊マウス系統の樹立を行う。続いて、これらマウス系統を交配する事で2)骨細胞特異的SEK1,MKK7遺伝子破壊マウスの作出を行い、ストレス応答性シグナル伝達分子の骨組織での高次機能について解析を行う。さらに、ストレス応答経路の分子機構を解明する事により、3)骨組織の重力ストレス感知機構における新規分子標的の同定を目的とする。



3. 研究の方法

1) 骨細胞特異的な時期特異的遺伝子破壊システムの構築

成熟骨細胞特異的発現遺伝子である Dentin matrix protein-1(Dmpl)遺伝子を含む bacterial arti-ficial chromosome (BAC) クローンを取得し、Recombineering法を用いて、薬剤誘導性Creリコンビナーゼ及び選択マーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子を挿入した標的ベクターの構築を行う。作製した標的ベクターはエレクトロポレーション法を用いてTT2 ES細胞株へ導入し、ネオマイシンによる選択で耐性クローンを取得、

更に Dmp1 遺伝子座へ Cre 遺伝子が挿入された相同組換え体クローンをサザンブロットイング法により選別する。得られた相同組換え体クローンはマイクロインジェクション法を用いてマウス受精卵へ導入、Dmp1-Cre キメラマウスを得る。生殖系列細胞への移行を確認後、テスターマウスと交配し、X-gal 染色を行う事で Cre 遺伝子の発現特異性を確認する。以上により、骨細胞特異的遺伝子破壊システムを構築する。

現在、Recombineering 法を用いた改変マウス作出の為の標的ベクター構築準備を行っている。マウス作製に最低限必要な ES 細胞培養設備は整っており、申請者は既に複数ラインにわたる遺伝子改変マウス作出経験を有していることから、本プロジェクトは予定通りに遂行可能と考えられる。

2) 条件付き SEK1 遺伝子破壊マウス系統の樹立

floxed MKK7 マウス系統は既に樹立済みであるため、floxed SEK1/MKK4 の系統樹立を行っている。これまでに条件付き遺伝子破壊標的ベクターを構築し、E14K ES 細胞への遺伝子導入、相同組換えクローンの選択を行い、キメラマウスを得る事に成功している。生殖細胞系列への移行確認後、FLPe トランスジェニックマウスと交配する事でネオマイシン耐性遺伝子の除去を行う予定である。本マウス系統樹立は速やかに終了すると考えられる。

3) 骨細胞特異的 MKK 遺伝子破壊マウスの作出

骨細胞種特異的な SEK1 および MKK7 遺伝子破壊マウスの作出に向け、Dmp1-Cre マウスと floxed MKK マウスの交配により、骨細胞種特異的な SEK1 および MKK7 遺伝子破壊マウスの作出を行う。作出したマウスは平常状態・尾部牽引による微小重力状態での骨密度・骨構造の変化を DXA 法・3次元マイクロ CT 法を用いて解析する。更に、骨形態計測法を用いて、骨組織の動態について細胞レベルで詳細な検討を行う。これらの遺伝子破壊マウスは骨細胞でのみ MKK-JNK シグナル系が破綻していることから、以上の解析を行う事で骨細胞の重力ストレス応答系での SEK1 と MKK7 の高次機能が解明可能である。

4) 骨組織の重力ストレス感知機構における新規分子標的の同定

平常状態および微小重力状態においた骨細胞特異的 MKK 遺伝子破壊マウスより骨組織を採取し、抽出した RNA やタンパク質を cDNA マイクロアレイおよび二次元電気泳動法で解析する事で、MKK-JNK シグナルの骨細胞での標的遺伝子候補群を得る。各種候補因子は

免疫染色法によって、マウス骨組織での発現量を個々に検討するとともに、骨細胞系培養細胞 MLO-Y4 を用いたルシフェラーゼアッセイやキナーゼアッセイにより、直接の標的分子の同定を行う。

この研究に関する準備が最も順調に進んでいる。MKK-JNK 経路によって、ヒストンのメチル化パターンが変化する事が既にわかっており、MKK-JNK 経路の新たな標的分子の探索が容易になってきた。MKK-JNK のキナーゼアッセイ、ツーハイブリッドアッセイ、DNA アレイの準備は整っている。

4. 研究成果

これまでに MKK7 遺伝子破壊マウスの作出され、成長遅延の表現型が観察されており、骨組織への影響も生じていると考えられる。本マウスの詳細な解析と本研究の継続により、JNK シグナルの新たな生理機能が解明されると期待される。

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 5 件)

1) Shinya Ohata, Makiko Nawa, Takeshi Kasama, Tokiwa Yamasaki, Kenji Sawanobori, Shoji Hata, Takashi Nakamura, Yoichi Asaoka, Tomomi Watanabe, Hitoshi Okamoto, Takahiko Hara, Shuji Terai, Isao Sakaida, Toshiaki Katada, Hiroshi Nishina, Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Feb 20;379(4):817-23.

査読・有

2) Ichiro Takada, Masatomo Mihara, Miyuki Suzawa, Fumiaki Ohtake, Shinji Kobayashi, Mamoru Igarashi, Ken-ichi Takeyama, Min-Young Youn, Takashi Nakamura, Yoshihiro Mezaki, Shin-ichiro Takezawa, Yoshiko Yogiashi, Hirochika Kitagawa, Gen Yamada, Shinji Takada, Yasuhiro Minami, Hiroshi Shibuya, Kunihiro Matsumoto, Shigeaki Kato, A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signaling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol.* 9, (11), 1273-1285, 2007

査読・有

3) Takashi Nakamura, Yuuki Imai, Takahiro Matsumoto, Singo Sato, Kazusane Takeuchi, Katsuhide Igarashi, Yoshifumi Harada,

Yoshiaki Azuma, Andree Krust, Yoko Yamamoto, Hiroshi Nishina, Shu Takeda, Hiroshi Takayanag, Daniel Metzger, Jun Kanno, Kunio Takaoka, T. John Martin, Pierre Chambon, Shigeaki Kato, Osteoclastic estrogen receptor alpha mediates the osteoprotective estrogen action through Fas ligand signaling. Cell, 130(5): 811-823, 2007
査読・有

4) Ken-ichi Aihara, Hiroyuki Azuma, Masashi Akaike, Yasumasa Ikeda, Masataka Sata, Nobuyuki Takamori, Shunsuke Yagi, Takashi Iwase, Yuka Sumitomo, Hirotaka Kawano, Takashi Yamada, Toru Fukuda, Takahiro Matsumoto, Keisuke Sekine, Takashi Sato, Yuko Nakamichi, Yoko Yamamoto, Kimihiro Yoshimura, Tomoyuki Watanabe, Takashi Nakamura, Akimasa Oomizu, Miniru Tsukada, Hideki Hayashi, Toshiki Sudo, Shigeaki Kato, Toshio Matsumoto, Strain-dependent embryonic lethality and exaggerated vascular remodeling in heparin cofactor II-deficient mice. J Clin Invest. 117(6): 1514-1526, 2007
査読・有

5) Toru Fukuda, Kaoru Yamagata, Sally Fujiyama, Takahiro Matsumoto, Iori Koshida, Kimihiro Yoshimura, Masatomo Mihara, Masanori Naitou, Hideki Endoh, Takashi Nakamura, Chihiro Akimoto, Yoko Yamamoto, Takenobu Katagiri, Charles Foulds, Shin-ichiro Takezawa, Hirochika Kitagawa, Ken-ichi Takeyama, Bert W. O' malley, Shigeaki Kato, DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. Nat Cell Biol. 9(5): 604-611, 2007
査読・有

[学会発表] (計1件)

Shigeaki Kato, Takashi Nakamura, Takashi Sato, Yoko Yamamoto,
Transcriptional regulation of Steroid Action
2nd Conference on Skeletal Biology and Medicine, April 27, 2007, New York

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/index.htm>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 貴 (NAKAMURA TAKASHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：80431948

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：