

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591941

研究課題名（和文） 細胞系譜特異的ノックアウトを用いた IKK-NF $\kappa$ B の造骨機構における意義の解明研究課題名（英文） Clarifying the role of IKK-NF $\kappa$ B signaling axis in bone formation using lineage specific conditional knockout mice.

## 研究代表者

加藤 友久 (KATO TOMOHISA)

京都大学・再生医科学研究所・講師

研究者番号：50301247

## 研究成果の概要（和文）：

骨及び軟骨形成細胞の系譜で特異的 *Ikk $\beta$*  を欠失するマウスを用いて、各細胞系譜における IKK - NF $\kappa$ B シグナル伝達系の役割について解析を行ったところ、*Ikk $\beta$*  は骨芽細胞系譜の機能は関与しないが、軟骨成長板の肥大軟骨層の異常を介して長管骨の短縮を引き起こすことが明らかとなった。この軟骨成長板の異常は軟骨における *Ikk $\beta$*  の細胞自律的な機能ではなく、初期発生の間葉系細胞由来の間質細胞の環境へ影響を介していることが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

Using osteoblastic cell lineage-specific and chondrocyte specific conditional knockout mice, we have investigated the role of IKK - NF- $\kappa$ B signaling axis in cells that contribute to bone formation. We found that *Ikk $\beta$*  plays role in mesenchymal cells of limb bud in early development. Those cells deregulated the chondrocytes in growth plate of the long bone of post natal mice.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科

キーワード：造骨機構、細胞系譜、シグナル伝達、NF- $\kappa$ B、IKK

## 1. 研究開始当初の背景

骨代謝は、旧来のカルシウム、リン等のミネラル代謝あるいはビタミン D、副甲状腺ホルモン等のホルモン代謝による理解から、現在は中枢神経系あるいは免疫系等、極めて広範囲な生体反応が寄与していることが明らかにされ、新しいパラダイムを迎え、その包

括的理解には個体レベルの解析が必須であると考えられた。IKK - NF- $\kappa$ B シグナル伝達系はサイトカイン刺激に応じた生体の炎症反応や免疫応答において中心的役割を担うシグナルであるが、骨代謝に関しても、いわゆる骨免疫学（オステオイムノロジー Osteoimmunology）における重要な因子とし

て、主として骨芽細胞の形成 (osteoclastogenesis) における役割が解析されてきた。

骨格形成以後の骨組織は、骨芽細胞と破骨細胞の相互作用、いわゆる coupling により、骨改変 (remodeling) と呼ばれる一定の恒常性を維持している。相互作用の主役を担う分子は骨芽細胞が産生する RANKL (ligand for receptor activator of NF- $\kappa$ B) であり、RANK を介して破骨前駆細胞の NF- $\kappa$ B が活性化され、その結果、osteoclastogenesis を促進する。関節リウマチ等の炎症性病態においては活性化 T 細胞や増殖性滑膜細胞から、RANKL が分泌され、osteoclastogenesis が促進されることで恒常性が崩れ、骨破壊が進行する。IKK - NF- $\kappa$ B シグナルの osteoclastogenesis における役割に関しては、種々の遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの解析により、主に生存シグナルの制御を介して破骨細胞の成熟に寄与していることが Michael Karin 博士等のグループにより明らかにされていた (Ruocco *et al.*, *J Exp Med*, 2005)。一方で、骨改変の他方の担い手である骨芽細胞の形成 (osteoblastogenesis) における IKK - NF- $\kappa$ B シグナル伝達系の意義に関する情報は極めて少ない状況であった。

骨芽細胞や軟骨細胞は発生学的に間葉系幹細胞から分化して生じることが知られている。申請者等のグループは、骨芽細胞の組織幹細胞と考えられている間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) について、基礎生物学から骨再生治療への応用まで研究を展開していたが、その過程において、以下の知見を見出していた。

- ① 骨髄間質細胞 (BMSC) の分化能と細胞表面抗原である CD106 (VCAM-1) の間に相関が認められ、CD106 陽性は、細胞の未分化状態を示すマーカーであると考えられた。
- ② CD106 遺伝子の発現制御に IKK - NF- $\kappa$ B シグナルが関与していることが、強制発現系及び IKK 阻害剤により判明した。すなわち、これらの予備結果は IKK - NF- $\kappa$ B シグナルが、MSC を未分化状態に維持しているシグナルである可能性を示唆するものであると考えられた。

以上の学術的背景より、これまで焦点が当てられることが無かった骨形成細胞系譜の細胞群における IKK - NF- $\kappa$ B シグナル伝達系の意義を解明する必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

本件研究では、上述の学術的背景を踏まえ、これまで焦点が当てられることがなかった骨形成細胞系譜の細胞群における IKK-NF-

$\kappa$ B シグナルの意義を解明する必要性を認識し、骨代謝における NF- $\kappa$ B シグナル伝達系の解析を osteoblastogenesis における役割に注目して解明することを目的とした。

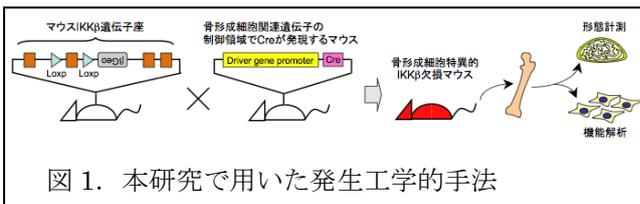


図 1. 本研究で用いた発生工学的手法

具体的には、本研究では、(図 1) に示すような遺伝子改変マウスを用いて、間葉系幹細胞 (MSC) から骨細胞にいたる骨形成細胞系譜において細胞特異的に NF- $\kappa$ B シグナル伝達系において中心的役割を担うことが知られている IKK $\beta$  を欠失させることで、これまで未知であった osteoblastogenesis における NF- $\kappa$ B シグナル伝達系の意義を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

申請者等は、研究開始当初、既に、Karin 博士から IKK $\beta$  のコンディショナルノックアウト (*Ikk $\beta$ <sup>F/F</sup>*) マウスの提供を受けていた。また、未分化間葉系細胞マーカーである *Prx1* 遺伝子及び骨芽細胞マーカーである *Col1 $\alpha$ -1* 遺伝子のプロモーター制御下で Cre リコンビナーゼを発現するマウスも既に有していた。更には、前骨芽細胞のマーカーである *Osterix* 遺伝子により作動する Cre リコンビナーゼを発現するマウスと軟骨細胞のマーカーである *Col2a1* 遺伝子により作動する Cre リコンビナーゼを発現するマウスを入手することになっていた。

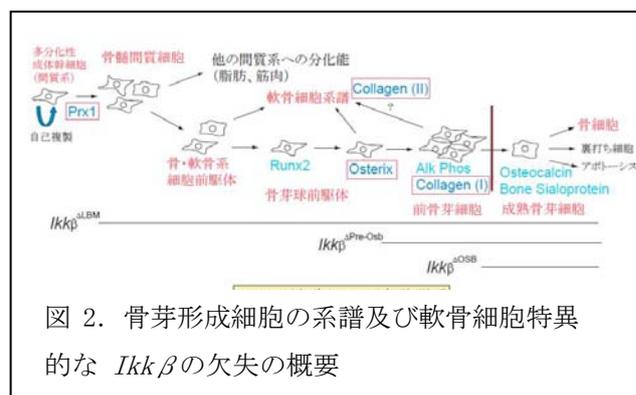


図 2. 骨芽形成細胞の系譜及び軟骨細胞特異的な *Ikk $\beta$*  の欠失の概要

これらの系統の交配によって得られる各細胞系譜特異的ノックアウトマウスを作製することにより、間葉系幹細胞 (MSC) から骨細胞にいたる骨形成細胞系譜において細胞特異的に NF- $\kappa$ B シグナルの制御において中心的な役割を果たす IKK $\beta$  の遺伝子を欠失させたマウスを作製する。各細胞系譜に関する概要は、図 2 に示した通りである。得られた各細胞特異的 *Ikk $\beta$*  欠損マウスを発生

の段階を追って経時的に観察し、骨格形態の肉眼的及び軟 X 線撮影による評価を行う。明らかな異常が認められた場合は、適切な時期に犠死させ詳細な組織学的検討を行う。更に、各細胞特異的 *Ikkβ* 欠損マウスを定期的に犠死させ、骨形態に関してマイクロ CT を中心とした画像解析機器による定量的解析を行う。

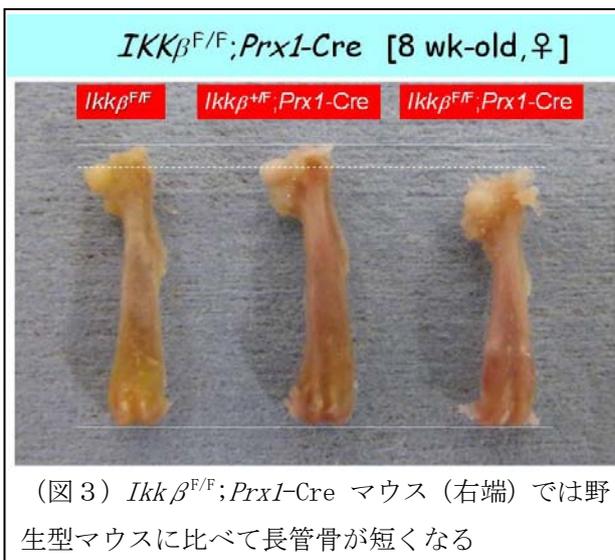
上記解析により骨形成細胞系譜特異的な *Ikkβ* 欠失マウスにおいて骨形成に異常が確定した場合、原因となる細胞における IKK の活性化機構、更には、下流の NF- $\kappa$ B の活性化とその標的遺伝子を分子レベルで明らかにする。

#### 4. 研究成果

まず、骨芽細胞における IKK - NF- $\kappa$ B シグナルの働きを検討するために、骨芽前駆細胞において IKK  $\beta$  を欠失させた *Ikkβ<sup>F/F</sup>; Col1a1-Cre* マウスと骨芽細胞において IKK  $\beta$  を欠失させた *Ikkβ<sup>F/F</sup>; Sp7-Cre* マウスを解析した。米国カリフォルニア大学ロサンゼルス校 (UCLA) の Wang らのグループは dominant negative 型 IKK  $\gamma$  の遺伝子を細胞特異的に強制発現するマウスを作製して、骨芽細胞において IKK - NF- $\kappa$ B シグナル伝達系を阻害すると海綿骨の骨量と骨密度が増加したと報告した (Chang et al., *Nature Med.*, 2009) が、我々のコンディショナルノックアウトマウスでは、骨形成能に関して、何の異常も認められなかった。我々のマウスは Wang 等がトランスジェニックマウスで用いられたのと同じ *Col1a1* 遺伝子及び *Sp-7* 遺伝子の制御領域によって Cre リコンビナーゼを発現させて IKK  $\beta$  を欠失させたマウスを用いており、原理的には同じ細胞系譜における IKK - NF- $\kappa$ B シグナル伝達系の機能に関する遺伝子改変マウスである。しかし、彼等は dominant negative 型 IKK  $\gamma$  遺伝子の強制発現系を用いており、この系はしばしば artificial な (生理的状況を反映していない) 結果を生むことが知られており、今回も、彼らの結果は artifact であると考えられる。以上により、我々は、IKK - NF- $\kappa$ B シグナル伝達系は骨芽細胞の系譜においては必須でないと結論付けた。

次に、骨形成細胞の体性幹細胞である間葉系幹細胞において IKK  $\beta$  を欠失させた *Ikkβ<sup>F/F</sup>; Prx1-Cre* マウスにおける骨形成能について検討した。当該マウスは、出生直後には明らかな異常は認めなかったが、2 週齢以降、比較対照群のマウスに比べて四肢の短縮を認めた (図 3、参照)。そこで長管骨の形態を解析したところ、成長板の長さが短縮しており、層別の解析から短縮は肥大軟骨層の短縮に起因するものであることが明らかとなった。このことより、*Ikkβ<sup>F/F</sup>; Prx1-Cre* マウ

スでは成長板軟骨の、特に、肥大軟骨層に異常を来し、その結果、長官骨の短縮という表現型を示したと解釈できる。



(図 3) *Ikkβ<sup>F/F</sup>; Prx1-Cre* マウス (右端) では野生型マウスに比べて長管骨が短くなる

肥大軟骨層にの異常について詳細なる原因の追及を試みた。まず、IKK-NF- $\kappa$ B シグナル伝達系の軟骨細胞そのものにおける自律的な機能の関与の可能性が考えられたので、軟骨細胞において IKK  $\beta$  を欠失させた *Ikkβ<sup>F/F</sup>; Col2a1-Cre* マウスを作製した。しかし、当該マウスでは、*Ikkβ<sup>F/F</sup>; Prx1-Cre* マウスにおいてみられた四肢の短縮はみられなかった。このことより、*Ikkβ<sup>F/F</sup>; Prx1-Cre* マウスで観察された肥大軟骨層の短縮は、*Col2* 陽性軟骨細胞系譜以外の細胞における *Ikkβ* 欠損に起因するものであることが示唆された。一つの可能性として成長板周囲に存在する細胞で発生過程において *Prx1* を発現した間葉系細胞由来の細胞が成長板中の軟骨細胞の分化、増殖に影響していることが考えられた。その候補として軟骨膜 (perichondrium) に存在する間葉系幹細胞由来の細胞に焦点を当て、現在、解析を継続中である。また、付随して、*Ikkβ<sup>F/F</sup>; Prx1-Cre* 骨髄中の血液幹細胞の動態に変化があることを見出した。このことは、骨髄中の軟骨膜あるいは骨膜 (periosteum) の IKK  $\beta$  が軟骨前駆細胞だけでなく血液幹細胞の微小環境、いわゆるニッチ (niche) に影響していることを示唆するものと考えられる。

#### 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 2 件)

- (1) Tsuchiya, Y., Asano, T., Nakayama, K., Kato, Jr., T., Karin, M. and Kamata, H. (2010) Nuclear IKK $\beta$  is an adaptor protein for I $\beta$ B $\alpha$  ubiquitination and

degradation in UV-induced NF- $\kappa$ B activation. *Molecular Cell*; **39**: 570-582. 査読有

DOI: 10.1016/j.molcel.2010.07.030

- (2) Jin, Y., Kato, T., Furu, M., Nasu, A., Kajita, Y., Mitsui, H., Ueda, M., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamura, T. and Toguchida, J. (2010) Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun*; **391**: 1471-1476. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.096

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 友久 (KATO TOMOHISA)  
京都大学・再生医科学研究所・講師  
研究者番号：50301247

### (2) 研究分担者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号：40273502

### (3) 連携研究者

なし