

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25年 5月 29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390286

研究課題名（和文）G蛋白シグナルを軸とした軟骨分化の包括的制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of chondrocyte differentiation through G protein signal

研究代表者

竹下 克志（TAKESHITA KATSUSHI）

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30262009

研究成果の概要（和文）：

副甲状腺ホルモン関連ペプチド（PTHrP）の主要なシグナル伝達分子であるG蛋白シグナルネットワークの軟骨分化・再生に対する調節機構を、G α sおよびG α q蛋白の軟骨特異的遺伝子改変マウスを解析することによりin vivo とin vitroの両面から多角的に検証することを目的として研究を行った。G α s、G α q蛋白の軟骨組織特異的なコンディショナルKOマウスはCre/loxPシステムを用いて作成したが、軟骨分化に至る前に胎生致死となってしまう、軟骨組織の解析が出来なかった。一方、PTHrP受容体のC末側細胞内ドメインに結合する蛋白質を網羅的に探索したところ、新たな結合蛋白として β カテニンを同定した。PTHrPと β カテニンとの結合によりG α s/cAMPシグナルが抑制され、G α q/Ca $^{2+}$ を促進しそのシグナルが調節される事が明らかとなり、軟骨分化に重要なコラーゲンタイプ10遺伝子の発現調節をしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

PTHrP signal through both G alpha s and G alpha q play important roles in regulation of chondrocyte differentiation, although a precise mechanism is not clear. In this study, we have tried to establish mouse model of both overexpression of either G alpha s or G alpha q in chondrocyte and also establish conditional knock-out mice of either G alpha s or G alpha q in chondrocytes to explore the specific roles of G alpha s and G alpha q in chondrocytes. Moreover, we have explored to find any proteins that interact directly with PTHrP receptor or downstream of its signal and examined any involvement in chondrocyte differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

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：軟骨代謝、G蛋白

1. 研究開始当初の背景

高齢者が要支援、要介護状態に陥る原因の

中で、関節疾患が原因疾患の上位に位置されており、介護予防の上からも関節疾患、特に

変形性関節症 (osteoarthritis; OA) を始めとした加齢性軟骨変性に伴う運動器疾患の予防・治療法の開発・確立が社会的急務となっている。しかしながら、軟骨の分化・再生のメカニズムについての知識の蓄積は極めて乏しいのが現状である。

成長軟骨における軟骨細胞は静止細胞層、増殖細胞層、前肥大軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層とそれぞれ同調した分化段階にある細胞群がきわめて整然と層状に配列したコラムを形成している。この一連の分化過程の制御に、増殖軟骨細胞や軟骨周囲細胞に強く発現し分泌される PTHrP が重要な役割を果たすことが、遺伝子組換えマウスの解析等により明らかとなってきた。PTHrP 遺伝子欠損マウスの成長軟骨の解析では、成長板軟骨の肥大化の異常な亢進を認め、また前肥大軟骨細胞に多く発現している PTH/PTHrP 受容体 (PPR) の KO マウスにおいても同様な結果が得られた。また、恒常的活性型 PPR の軟骨組織過剰発現 (Tg) マウスでは、著明な軟骨細胞の肥大分化抑制が認められ、これらのことから PTHrP シグナルは、軟骨細胞の肥大分化を抑制していることが明らかとなった。しかしながら、PTHrP がその受容体に結合後、どのようなメカニズムで肥大分化抑制を来すのかその全容は明らかとなっていない。PPR は、前肥大軟骨細胞に発現する 7 回膜貫通型受容体で、PTHrP が結合するとその下流の G 蛋白を活性化することによって細胞内シグナルを伝える。この G 蛋白には $G_{\alpha s}$ と $G_{\alpha q}$ の 2 種類があることが知られており、それぞれが独立したシグナル伝達経路を有していることから、PTHrP の軟骨細胞の分化制御にはこれらの 2 つのシグナル経路が深く関わっていることが考えられている。これまでの先行研究で、軟骨肥大分化抑制に対する $G_{\alpha s}$ シグナルの関与についての報告は散見されるが、軟骨細胞特異的 $G_{\alpha s}$ 遺伝子欠損マウスは胎生致死のため成体マウスでの解析が出来ず、もう一方の $G_{\alpha q}$ のシグナルを介した生体内での軟骨代謝調節機構については殆ど解明されていないのが現状である。一方、軟骨の変性と病的骨化が主要病態である変形性関節症も、元来永久軟骨であるはずの関節軟骨に肥大細胞分化・石灰化といった軟骨内骨化が起こることによって発症することが知られている。この変形性関節症における軟骨内骨化の分子メカニズムについても断片的にしか解明されておらず、軟骨肥大化抑制作用を有する PTHrP の G 蛋白を介したシグナルの変形性関節症への関与についても不明である。

本研究では、軟骨細胞での $G_{\alpha s}$ および $G_{\alpha q}$ 蛋白の gain of function および loss of function を *in vivo* で検証するため、軟骨細胞特異的 G 蛋白過剰発現マウス、およびタモキシフェン誘導性 Cre 遺伝子による Cre-loxP

system を用いた G 蛋白コンディショナル KO マウスの作出を行い、それぞれのマウスの軟骨組織を解析することにより、G 蛋白シグナルを介した生体内での軟骨代謝調節機構を明らかにする。また、*in vitro* でこれら各種遺伝子改変マウス由来の軟骨細胞を用いた解析を行い、G 蛋白による新たな軟骨細胞分化制御関連シグナルを同定し、軟骨内骨化における分子ネットワークの全容解明に迫ることを目的とする。更に、上記遺伝子改変マウスに対し変形性関節症モデルを作成し、変形性関節症における G 蛋白シグナルの関与を解明し、軟骨変性疾患に対する新薬開発への基礎データを得ることを目的にデザインした。

2. 研究の目的

副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) の主要なシグナル伝達分子である G 蛋白シグナルネットワークの軟骨分化・再生に対する調節機構を、 $G_{\alpha s}$ および $G_{\alpha q}$ 蛋白の軟骨特異的遺伝子改変マウスを解析することにより *in vivo* と *in vitro* の両面から多角的に検証する。また、G 蛋白シグナルに制御される新規軟骨細胞分化関連シグナルの同定を試みることで、軟骨変性疾患の予防・治療法開発への基礎データを得ることを試みる。

- (1) 軟骨特異的 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha q}$ 蛋白過剰発現マウスの作出およびその軟骨組織の解析
- (2) タモキシフェン誘導型 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha q}$ コンディショナル KO マウスの作出およびその軟骨組織の解析
- (3) 各遺伝子改変マウスでの変形性関節症モデルの作製と解析
- (4) 軟骨における G 蛋白シグナル関連下流分子の探索

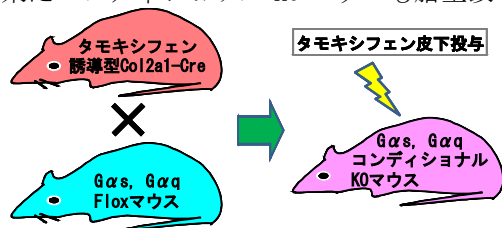
3. 研究の方法

- (1) 軟骨特異的 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha q}$ 蛋白過剰発現マウスの作出およびその軟骨組織の解析
 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha q}$ シグナルの gain of function を *in vivo* で検証するため、 $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha q}$ 蛋白を軟骨組織特異的に強制発現させた過剰発現 (Tg) マウスを作成する。軟骨特異的に G 蛋白遺伝子を発現させるために、エンハンサーを含む 3.5 kb の COL2a1 プロモーターを用い $G_{\alpha s}$ 、 $G_{\alpha q}$ 遺伝子を組み込み、さらに 900 bp におよぶタンデム Poly A を後半に挿入し発現効率を上げたコンストラクトを作成する。作成したコンストラクトを B126 種マウス由来の受精卵にマイクロインジェクションし遺伝子導入を行う。その後、偽妊娠させた母体にもどし F1 世代を作成する。サザンブロット法にて各 G 蛋白遺伝子の過剰発現を確認できたマウスを用い、そのヘテロマウス同士

を交配し F2 世代の Tg マウスを作成し、軟骨組織の解析を進める。具体的には、まず胎児・出生直後のマウスを用いて whole mount を作製し、アルシアンブルーおよびアリザリンレッドによる骨格二重染色を行い、同胞野生型 (WT) マウスと比較することによってパターン異常を検討する。次に Tg マウスの軟骨組織の解析を長管骨成長板を用いて行う。HE 染色の他に、軟骨基質特異的な組織染色法 (サフラニン O 染色、トルイジンブルー染色) や、BrdU のラベリング、ALP 染色、TRAP 染色、軟骨基質の石灰化能を検討するため von Kossa 染色を行い WT マウスと比較検討する。さらに成長板の軟骨分化マーカー (II 型・X 型コラーゲン、MMP13、VEGF など) による免疫染色、in situ hybridization の手法を用いて、軟骨細胞分化の程度を検討し、各 G 蛋白の軟骨細胞特異的な gain of function による軟骨代謝への影響を in vivo で調べる。

(2) タモキシフェン誘導型 *Gαs*、*Gαq* コンディショナル KO マウスの作出およびその軟骨組織の解析)

初年度は主に *Gαs*、*Gαq* 蛋白の軟骨組織特異的なコンディショナル KO マウス作製準備を行う。本マウスは Cre/loxP システムを用いて作成する予定であるが、*Gαs*、*Gαq* 蛋白を loxP で挟み込んだ Flox マウスは既に作出されており、東京大学骨軟骨再生医療講座にて系統維持されている。コンディショナル KO マウスは、同 Flox マウスと軟骨細胞特異的に Cre を発現するマウス (Col2a1-Cre マウス) との掛け合わせで作出されるが、通常の軟骨細胞特異的 Cre マウスとの掛け合わせでは、出来たコンディショナル KO マウスも胎生致



死となりうるため、本研究ではタモキシフェン投与後に軟骨細胞特異的に Cre を発現するタモキシフェン誘導型 Col2a1-Cre マウスと Flox マウスを交配させて、タモキシフェン誘導型コンディショナル KO マウスを作成する。掛け合わせにより作成され、ライン化されたコンディショナル KO マウスが、軟骨細胞特異的にかつタモキシフェン投与後に遺伝子欠損を起こしているかを、コンディショナル KO マウスを ROSA マウスと掛け合わせ、タモキシフェン皮下投与後に生まれる新生児に Lac Z 染色を行い確認する。このシステムを用いると、タモキシフェン皮下投与後に Cre 遺伝子の発現しているところで Lac Z 染色陽

性となり、作成したコンディショナル KO での組織特異性を確認することができる。

コンディショナル KO マウスが作成された後、まずはタモキシフェン依存のかつ軟骨組織特異的に *Gαs*、*Gαq* 蛋白の欠損が起こることを RNA、蛋白レベルで確認する。具体的にはタモキシフェン投与後にコンディショナル KO マウスの脛骨近位端成長板組織を実体顕微鏡下に採取し、同部での RNA、蛋白を各々採取する。その後、各 G 蛋白遺伝子に対する RT-PCR および各 G 蛋白抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、発現レベルを同定する。この G 蛋白遺伝子欠損が確認できた後、Tg マウスと同様に軟骨組織の組織学的解析を進める。タモキシフェン投与を出生直後および生後 4, 8, 12 週齢のマウスに各々皮下投与後、コンディショナル KO マウスの軟骨組織の解析を、長管骨成長板を用いて行う。HE 染色の他に、軟骨基質特異的な組織染色法や、BrdU のラベリング、軟骨基質の石灰化能を検討するため von Kossa 染色を行い WT マウスと比較検討する。さらに、成長板の軟骨分化マーカーによる免疫染色、in situ hybridization の手法を用いて、軟骨細胞分化の程度を検討し、*Gαs*、*Gαq* の軟骨細胞特異的な loss of function による軟骨代謝への影響を in vivo で調べる。

(3) 各遺伝子改変マウス由来の初代軟骨培養細胞の検討

実体顕微鏡下に、生直後の Tg マウスおよびコンディショナル KO マウス由来の肋軟骨をコラゲナーゼ処理し、軟骨細胞を採取、培養する。さらにコンディショナル KO マウス由来の軟骨細胞ではタモキシフェンを投与し、遺伝子欠損を誘導する。こうして得られた各種遺伝子改変マウス由来の初代軟骨培養細胞を用いて in vitro で以下の検討を行う。1) 培養軟骨細胞の増殖能を細胞増殖曲線および [3H]-thymidine 取込能により評価する。2) 培養軟骨細胞の分化能・基質合成能・石灰化能をアルシアンブルー染色、アリザリンレッド染色、von Kossa 染色によって評価する。また軟骨分化マーカーの発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検討する。

(4) 各遺伝子改変マウスでの変形性関節症モデルの作製と解析

上記で作製した全ての遺伝子操作マウスにおいて、生理的条件下での変形性膝関節症が見られるか、老齢マウスでの組織像から検討する。同時に各遺伝子改変マウスにおいて不安定膝変形性関節症モデルを作製し、軟骨破壊、骨棘形成の程度を、放射線学的解析として X 線、CT 撮影、組織学的解析として、HE 染色、サフラニン O 染色、トルイジンブルー染色、各種軟骨マーカー分子、細胞周期マーカー、アポトーシス関連分子などに対する免疫染色を行い、野生型同胞マウスと比較検討

する。OAの進行度についてはOARSIスコアおよび我々が確立したgrading systemを用いて組織学的重症度を定量化する。

(5) 軟骨におけるG蛋白シグナル関連下流分子の探索

上述したin vivoおよびin vitroでの検討で、野生型と遺伝子改変マウスとの間に明らかな違いが見られた場合、*Gαs*、*Gαq* 蛋白シグナルの下流に存在する関連因子の検討を主にin vitroの系で行う。タモキシフェン投与後と投与していない各マウスの軟骨よりRNAを抽出し、まずは既に知られている骨代謝、軟骨代謝関連分子をターゲットとした検討を行う。

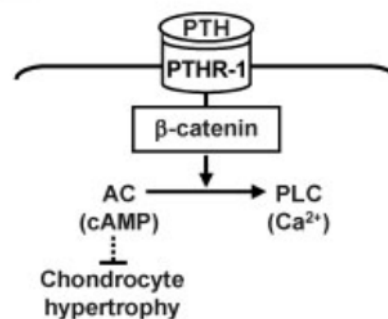
4. 研究成果

副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) の主要なシグナル伝達分子であるG蛋白シグナルネットワークの軟骨分化・再生に対する調節機構を、*Gαs* および *Gαq* 蛋白の軟骨特異的遺伝子改変マウスを解析することによりin vivo と in vitro の両面から多角的に検証することを目的として研究を行った。軟骨特異的 *Gαs*、*Gαq* 蛋白過剰発現マウスの作出およびその軟骨組織の解析の準備を行った。軟骨特異的にG蛋白遺伝子を発現させるために、エンハンサーを含む3.5 kbのCOL2a1プロモーターを用い *Gαs*、*Gαq* 遺伝子を組み込み、さらに900 bpにおよぶタンデムPoly Aを後半に挿入し発現効率を上げたコンストラクトを作成し、作成したコンストラクトをB126種マウス由来の受精卵にマイクロインジェクションし作製した。その遺伝子発現パターンを解析し、偽妊娠させた母体にもどしF1世代を作成し、サザンブロット法にて各G蛋白遺伝子の過剰発現を確認したが、F1世代において、導入したG蛋白遺伝子陽性のTgマウスが生まれず過剰発現が認められなかった。コンストラクトDNAの純度をさらに上げて不純物のより少ないDNAを高濃度でマイクロインジェクションすることを再度試みたが結果は同じであり、また一部少量ながら過剰発現していたTgマウスが胎生致死のため解析不可能となってしまった。軟骨細胞特異的プロモーターにより誘導され、軟骨形成時よりG蛋白遺伝子がドライブされるはずであったが、軟骨組織以外での発現も考えられた。

一方で、タモキシフェン誘導型 *Gαs*、*Gαq* コンディショナル KO マウスの作出およびその軟骨組織の解析の準備を進めた。*Gαs*、*Gαq* 蛋白の軟骨組織特異的なコンディショナル KO マウスはCre/loxPシステムを用いて作成を試み、*Gαs*、*Gαq* 蛋白をloxPで挟み込んだFloxマウスと軟骨細胞特異的にCreを発現するマウス (Col2a1-Creマウス) との掛け合わせを行った。特に通常の軟骨細胞特異

的Creマウスとの掛け合わせでは、出来たコンディショナル KO マウスも胎生致死となったこともあり、本研究ではタモキシフェン投与後に軟骨細胞特異的にCreを発現するタモキシフェン誘導型 Col2a1-CreマウスとFloxマウスを交配させて、タモキシフェン誘導型コンディショナル KO マウスの作成を行った。しかし、作成したマウスのほとんどが胎生致死となってしまい、生後にタモキシフェンによる遺伝子欠損の誘導は全く確認されなかった。また一部胎生致死を免れたラインも軟骨特異的にCreが発現しないことにより、軟骨特異的 KO マウスにならないことが確認された。これはCreの軟骨以外の臓器での発現による、多臓器でのG蛋白の欠損が起こったと考えられ、再度別ラインのタモキシフェン誘導型 Col2a1-Creマウスを入手し、Creの発現パターンを確認後、作出したが結果は同等であった。

軟骨におけるG蛋白シグナル関連下流分子の探索については新たな知見が得られた。PTHrP受容体のC末側細胞内ドメインに結合する蛋白質を網羅的に探索したところ、新たな結合蛋白としてβカテニンを同定した。軟骨様細胞株であるATDC細胞にGFP標識したPTH受容体を強制発現させると、PTH受容体とカテニンとの結合はPTH刺激によって減弱した。PTH受容体の段階的deletion、mutagenesisによって、C末側582-585の4アミノ酸がβカテニンの結合に必須であることが示された。PTH



刺激後の細胞内Ca²⁺濃度は、βカテニンsiRNAおよびPTH受容体(Δ582-585)変異体の強制発現によって消失したことから、PTHrPシグナル伝達に重要であることが明らかとなった。マウス成長板の免疫染色によって、PTHrP受容体とβカテニンは前肥大軟骨細胞層に共局在していた。さらに、マウス軟骨前駆細胞ATDC5倍養系にPTH(1-34)を投与すると、軟骨肥大分化マーカーであるCOL10の転写活性も発現レベルも抑制されたが、これらはいずれも恒常活性化型βカテニンの過剰発現で回復した。この回復効果はPPR(Δ582-585)変異体導入ATDC細胞においては見られなかった。以上よ

り、軟骨細胞において β カテニンがPTHrP受容体に結合することで、 $G\alpha s/cAMP$ を抑制し $G\alpha q/Ca^{2+}$ を促進して、PTHrPシグナルを調節している可能性が確認された(上図)。

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. Ogata N, Shinoda Y, Wettschureck N, Offermanns S, Takeda S, Nakamura K, Segre GV, Chung UI, Kawaguchi H.

$G\alpha(q)$ signal in osteoblasts is inhibitory to the osteoanabolic action of parathyroid hormone. **J Biol Chem.**

286:13733-40, 2011. 査読有り

2. Yano F, Saito T, Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI, Kawaguchi H.

β -catenin regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signals and chondrocyte hypertrophy through binding to the intracellular C-terminal region of the receptor. **Arthritis Rheum.** 65:429-35, 2013. 査読有り

[学会発表] (計 1件)

緒方直史: PTHによる骨形成促進作用の分子メカニズム. 日本骨代謝学会. 2010. 7. 21、大阪

[図書] (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 克志 (TAKESHITA KATSUSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 30262009

(2) 研究分担者

緒方 直史 (OGATA NAOSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 10361495

中村 耕三 (NAKAMURA KOZO)
国立障害者リハビリテーションセンター自立支援局・局長
研究者番号: 60126133

(3) 連携研究者

なし