

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790291

研究課題名(和文) 関節軟骨におけるPTH/PTHrP受容体の新規機能の解明

研究課題名(英文) PTH/PTHrP receptor signaling in chondrocyte

研究代表者

平居 貴生 (Hirai, Takao)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：80389072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)はPTH/PTHrP受容体に結合して、軟骨の増殖と軟骨肥大分化に重要な役割を果たす。本研究では、新生児の関節部位から酵素処理法によって軟骨細胞の培養後、PTHrP刺激によって変動する遺伝子群をマイクロアレイ法、リアルタイムPCR法を用いて解析した。その結果、PTHrP刺激後によって増加する転写因子Nfil3/E4BP4は、軟骨代謝に重要な役割を果たす骨関連因子Bmp4、あるいはPtgs2遺伝子を負に制御することを明らかにした。すなわち、本研究においてPTH/PTHrP受容体シグナルによって制御される骨軟骨代謝には時計遺伝子が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and Indian hedgehog (Ihh) form a negative feedback loop that controls the differentiation of chondrocytes in the fetal growth plate. Actions of PTHrP are mediated through the parathyroid hormone (PTH)/PTHrP receptor (PPR). Recent studies indicated that Gsa is the major mediator of the anti-differentiation action of the PPR, while activation of both Gsa and Gq/11a is required for quiescence of stem-like chondrocytes in the resting zone of the growth plate. These studies showed that the stimulation of PTHrP increased the transcriptional factor Nfil3/E4BP4 in articular chondrocytes. On a molecular level, both loss-of-function and gain-of-function experiments demonstrated that Nfil3/E4BP4 negatively regulated Bmp4 and Ptgs2 expression. Our results indicated that PPR signaling in chondrocytes regulated clock gene Nfil3/E4BP4 and may contribute to circadian clock in articular cartilage.

研究分野：生体分子

キーワード：PTH/PTHrP受容体 circadian clock

1. 研究開始当初の背景

[研究の学術的背景]

(1) 再生能力の乏しい組織である骨軟骨組織においては、加齢に伴う代謝機能の破綻や組織の変性、欠損に基づくこれら硬組織の機能異常が変形性関節症 (osteoarthritis; OA)、骨粗鬆症などを誘発し、高齢者の QOL (Quality of Life) に多大な影響を与えることになる。一方で、疾病発症のメカニズムの理解には、標的分子の生体内での正常な機能の理解が不可欠で、これまでに遺伝子破壊個体の作出などでアプローチされてきた。こうした状況下、OA 発症には、マトリックスメタロプロテアーゼ 13 (MMP13) や A disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin-5 motif (ADAMTS5) に代表されるタンパク質分解酵素が関与することがノックアウトマウス (KO マウス) の解析から明らかになりつつあるが、明らかな薬理効果を確立するに至った研究報告は少ない。

(2) 成長軟骨にみられる軟骨内骨化課程 (軟骨の肥大化、X 型コラーゲンの発現、軟骨のアポトーシス) が関節軟骨において誘導されることが OA 発症に関与するという報告がある ()。一方で、副甲状腺関連ペプチド (Parathyroid hormone related peptide; PTHrP) は PTH/PTHrP 受容体に結合して、軟骨細胞増殖・肥大化を制御する。これらの観察所見を考えると、関節軟骨維持機構に PTH/PTHrP 受容体シグナリングが関与している可能性が推察される。すなわち、関節軟骨における機能的 PTH/PTHrP 受容体シグナリングの役割を明らかにすることは、OA 発症の分子メカニズムの解明において重要である。

2. 研究の目的

上記した背景のもと、これまでの関連研究結果を発展・深化させるべく、分子レベルから関節軟骨における PTH/PTHrP 受容体の正常な機能と制御に関する知見を収集すること、関節軟骨に特異的な新規機能を明らかにすることを主題として設定し、疾患発生における分子メカニズムを理解するための知識基盤を整備することを目標とした。

(1) 関節軟骨組織における PTH/PTHrP 受容体シグナリングの新規機能を明らかにする。

(2) 三次元軟骨スフェロイド法を用いた細胞レベルの解析によって、PTH/PTHrP 受容体シグナリングの標的分子の同定との機能解析、それら分子との相互作用を明らかにする。これらのアプローチによる結果を統合し、PTH/PTHrP 受容体シグナリングの本来の制御、作用機序、生物作用について統括的な理解を目指した。

3. 研究の方法

PTH/PTHrP 受容体シグナリングの標的分子の同定するために軟骨細胞に対する PTHrP

刺激により、影響を受ける分子カスケードの絞込みと同定を、【DNA マイクロアレイ法】、【リアルタイム PCR 法】、【プロモーター解析】、【ChIP アッセイ】、【ウエスタンブロット法】などを用いて試みた。

4. 研究成果

(1) 骨端部に発現している PTHrP は PTH/PTHrP 受容体に結合して、軟骨の増殖と軟骨肥大分化に重要であることが、PTHrP および PTH/PTHrP 受容体 KO マウスの解析から明らかになっている。また、成長軟骨においては、Indian Hedgehog (Ihh) と PTHrP の間にはネガティブフィードバックシステムが形成され、縦方向の骨成長を最大化している ()。さらに、骨芽細胞・軟骨細胞の分化因子 Runx2/Cbfa1 が軟骨細胞の肥大化に必須の転写因子であることが知られているが、Runx2 の上流分子である Ihh シグナル関連分子が OA 治療の標的分子である可能性が指摘されている ()。近年の研究報告より、PTH/PTHrP 受容体および Gs コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを中心とした解析の結果、PTH/PTHrP 受容体シグナルは静止軟骨細胞の未分化維持に関与していることが示唆された ()。一方、本研究では、静止軟骨細胞における PTHrP の役割と未分化維持機構における PTH/PTHrP 受容体シグナルの関与の可能性について検討するために、生後 3 日目の新生児の関節部位から酵素処理法によって軟骨細胞の培養後、PTHrP 刺激をおこない、刺激後 1 時間から 8 時間目までの total RNA を回収し目的遺伝子の変動をマイクロアレイ法、リアルタイム PCR 法を用いて解析した結果、PTHrP (1 nM) 刺激後 1 時間目から転写因子 Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated/E4 Promoter-Binding Protein (Nfil3/E4BP4) mRNA が有意に増加することが明らかとなった。近年、時計遺伝子として同定された Nfil3/E4BP4 は、ヘルパー T 細胞 (Th 細胞) の分化決定に必須な転写因子であることが報告されている ()。我々は、この転写因子 Nfil3/E4BP4 に着目した結果、軟骨代謝に重要な役割を果たす骨関連因子 *Bone morphogenetic protein 4* (*Bmp4*) 遺伝子の発現を負に制御することを明らかにした ()。また、シクロオキシゲナーゼ 2 をコードする *Prostaglandin-endoperoxide synthase 2* (*Ptgs2*) が Nfil3/E4BP4 の標的遺伝子の一つであることを明らかにし、Nfil3/E4BP4 は時計遺伝子群 (*Bmal1* あるいは *Period*) と協調的に *Ptgs2* の発現を制御していることは明らかにした ()。さらに、PTHrP 刺激による ADAMTS5 遺伝子の有意な減少を確認した。一方、軟骨スフェロイド培養法を用いた培養法の確立において一定の成果があった。特定の条件において、静止軟骨細胞が三次元スフェロイド培養法によって細胞塊を形成することを明らかにした。

すなわち、新生児の関節部位から酵素処理法によって細胞を単離後、三次元スフェロイド培養法によって培養すると、培養軟骨細胞は細胞塊を形成することが明らかとなった。これら細胞塊の特徴は、細胞塊を形成するが細胞増殖能は低く、静止軟骨細胞の特徴を再現する可能性が示唆された。我々は、BrdU Pulse-Chase 法によって、静止軟骨層には Labal-Retaining Cells (LRC) が局在することを明らかにしているが、これらの結果は、関節軟骨組織には LRC が局在し、関節軟骨の変性・欠損や機能破綻には、軟骨前駆細胞未分化維持機構の異常が関与している可能性を示唆するかもしれない。

近年、Per2-luc マウスより摘出した骨標本を培養した場合、24時間のリズム的な発光を示し、これらの概日時計は PTH によってリセットされるなど、時計遺伝子による軟骨代謝の制御の可能性が示唆されている()。すなわち、PTH/PTHrP 受容体シグナルによって制御される「概日時計」と骨軟骨代謝との関連について明らかになりつつある()。一方で、PTH 投与が OA に対して有効である可能性も報告されている()。今後は、PTH/PTHrP 受容体シグナルの標的分子である Nfil3/E4BP4 の個体レベルでの機能解析、すなわち、Nfil3 KO マウスの解析によって、PTH/PTHrP 受容体シグナルによる概日リズムの制御あるいは分子時計制御との関連について詳細に検討する必要がある。特に、PTHrP 刺激によって発現減少する ADAMTS5 遺伝子に関しては、Nfil3/E4BP4 が直接制御するか否かについて今後詳細に検討する必要がある。

引用文献

Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nature Medicine*, 16(6), 2010, 678-686

Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423(6937), 2003, 332-336.

Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, Khoury MA, Whetstone H, Ho L, Hsu C, Ali SA, Alman BA. Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nature Medicine*, 15(12), 2009, 1421-1425

Chagin AS, Vuppapapati KK, Kobayashi T, Guo J, Hirai T, Chen M, Offermanns S, Weinstein LS, Kronenberg HM:

G-protein stimulatory subunit alpha and Gq/11 G-proteins are both required to maintain quiescent stem-like chondrocytes. *Nature Communications*, 5, 2014, 3673

Yu X, Rollins D, Ruhn KA, Stubblefield JJ, Green CB, Kashiwada M, Rothman PB, Takahashi JS, Hooper LV. Th17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science*, 342(6159), 2013, 727-730

Hirai T, Tanaka K, Togari A: 1-Adrenergic Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Clock Genes and Bone Morphogenetic Protein-4 Expression through Up-Regulation of the Transcriptional Factor Nfil3/E4BP4. *Journal of Biological Chemistry*, 289(24), 2014, 17174-17183

Hirai T, Tanaka K, Togari A: β -adrenergic receptor signaling regulates *Ptgs2* by driving circadian genes in osteoblasts. *Journal of Cell Science*, 127(17), 2014, 3711-3719

Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Umemura Y, Tsuchiya Y, Shirai T, Oda R, Inokawa H, Kubo T, Yagita K. Prolonged bioluminescence monitoring in mouse ex vivo bone culture revealed persistent circadian rhythms in articular cartilages and growth plates. *PLoS One*, 8(11), 2013, e78306

Sampson ER, Hilton MJ, Tian Y, Chen D, Schwarz EM, Mooney RA, Bukata SV, O'Keefe RJ, Awad H, Puzas JE, Rosier RN, Zuscik MJ. Teriparatide as a chondroregenerative therapy for injury-induced osteoarthritis. *Science Translational Medicine*, 3(101), 2011, 101ra93

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)

Hirai T, Tanaka K, Togari A: α_{1B} -adrenergic receptor signaling controls circadian expression of *Tnfrsf11b* gene by regulating clock genes in osteoblasts. *Biology Open*, 査読有, 4(11), 2015, 1400-1409. DOI: 10.1242/bio.012617

Hirai T, Kobayashi T, Nishimori S,

Karaplis AC, Goltzman D, Kronenberg HM: Bone is a major target of PTH/PTHrP receptor signaling in regulation of fetal blood calcium homeostasis. *Endocrinology*, 査読有, 156(8), 2015, 2774-2780.
DOI: 10.1210/en.2014-1835.

Chagin AS, Vuppalapati KK, Kobayashi T, Guo J, Hirai T, Chen M, Offermanns S, Weinstein LS, Kronenberg HM: G-protein stimulatory subunit alpha and Gq/11a G-proteins are both required to maintain quiescent stem-like chondrocytes. *Nature Communications*, 査読有, 5, 2014, 3673.
DOI: 10.1038/ncomms4673.

Hirai T, Tanaka K, Togari A: 1-Adrenergic Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Clock Genes and Bone Morphogenetic Protein-4 Expression through Up-Regulation of the Transcriptional Factor Nfil3/E4BP4. *Journal of Biological Chemistry*, 査読有, 289(24), 2014, 17174-17183.
DOI: 10.1074/jbc.M113.546135.

Hirai T, Tanaka K, Togari A: β -adrenergic receptor signaling regulates *Ptgs2* by driving circadian genes in osteoblasts. *Journal of Cell Science*, 査読有, 127(17), 2014, 3711-3719.
DOI: 10.1242/jcs.148148.

[学会発表](計9件)

平居 貴生, 田中 健二郎, 戸苅 彰史: α_1 B-adrenergic receptor signaling regulates circadian expression of the osteoprotegerin by regulating clock genes in osteoblasts. 第22回日本時間生物学会学術大会, 平成27年11月21日, 東京大学(東京)

平居 貴生, 田中 健二郎, 戸苅 彰史: 骨芽細胞における時計遺伝子 NFIL3/E4BP4 の役割. 第57回歯科基礎医学会学術大会, 平成27年9月11日-9月13日, 朱鷺メッセ(新潟)

平居 貴生, 田中 健二郎, 戸苅 彰史: Transcriptional factor Nfil3/E4BP4 regulates cellular proliferation in response to α_1 B-adrenergic receptor signaling in osteoblasts. 第33回日本骨代謝学会学術集会. 平成27年7月23日-7月25日. 京王プラザホテル(東京)

平居 貴生, 田中 健二郎, 戸苅 彰史: 1-adrenergic receptor signaling

regulates cell proliferation through up-regulation of Nfil3/E4BP4 expression in osteoblasts. 第88回日本薬理学会年会. 平成27年3月18日-3月20日. 名古屋国際会議場(愛知)

平居 貴生, 田中 健二郎, 戸苅 彰史: Circadian clock system regulates Bmp4 expression in osteoblasts. 第21回日本時間生物学会学術大会, 平成26年11月7日-11月9日, 九州大学医学部百年講堂(福岡)

平居 貴生, 田中 健二郎, 戸苅 彰史: 骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 における時計遺伝子による *Ptgs2* 遺伝子発現の制御. 第57回 NPO 法人日本口腔科学会・中部地方部会, 平成26年10月11日, アスト津(三重)

平居 貴生, 田中 健二郎, 戸苅 彰史: β -アドレナリン受容体シグナルによる *Ptgs2* 遺伝子発現における時計遺伝子の関与. 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 平成26年9月27日, 福岡国際会議場(福岡)

平居 貴生, 田中 健二郎, 戸苅 彰史: 骨芽細胞に発現する *Bone morphogenetic protein 4* 遺伝子は時計遺伝子 Nfil3 によって制御される. 第32回日本骨代謝学会学術集会, 平成26年7月26日, 大阪国際会議場(大阪)

平居 貴生, 田中 健二郎, 戸苅 彰史: Nfil3 regulates *Ptgs2* expression in osteoblasts. 第20回日本時間生物学会学術大会, 平成25年11月9日, 近畿大学(大阪).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平居 貴生 (HIRAI, Takao)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号: 80389072