

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11646

研究課題名(和文)アイソフォーム特異的な新たなJNKシグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of Novel isoform-specific signal transduction mechanisms of JNKs

研究代表者

松口 徹也 (Matsuguchi, Tetsuya)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：10303629

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)：多様な生体反応に関わるキナーゼであるJNKにはJNK1/2/3の3つのアイソフォームが存在するが、それぞれの生理的機能の差異には不明な点が多い。申請者らは以前からJNKアイソフォーム特異的な骨芽細胞分化における役割を細胞レベルで明らかにしてきた。本研究では、1) 間葉系幹細胞から脂肪分化へ至る初期段階に、JNK2がアイソフォーム特異的に必須の役割を果たすこと、2) JNK抑制下での骨分化誘導で生じてくるオステオポンチン発現亢進型の骨芽細胞分化に転写制御因子であるId4が重要な役割を果たすこと、3) 骨形成因子であるBMP9が、オステオポンチン亢進型の骨芽細胞分化に抑制的に働くこと、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、JNK活性がアイソフォーム特異的に、多分化能を持つ間葉系幹細胞から脂肪・骨細胞分化への制御に重要な働きをすること、また骨形成因子であるBMP9がそのプロセスに影響を与えることを明らかにした。本研究の成果は、超高齢化社会のQOL維持のために必須となってくる骨再生療法のよりよい臨床応用法の開発に繋がる重要な所見と考えられる。また、将来的には、JNKが発症に関与する炎症性疾患、糖尿病、がん、心血管障害などの疾患のより効率的な予防・治療法の開発に繋がることも期待される。

研究成果の概要(英文)：JNK is known as a multifunctional kinase controlling various biological functions. There are 3 isoforms (JNK1/2/3) of JNK. However, exact functional differences among these isoforms have not been fully elucidated. We have previously identified isoform-specific regulatory functions of JNK in osteoblast differentiation. Here, we have newly revealed 1) JNK2 specifically play essential roles in the early differentiation process of adipocyte differentiation, 2) Osteopontin-dominant type of osteoblast differentiation is induced by JNK inhibition via a transcriptional regulator, Id4, and 3) BMP9 negatively inhibits osteopontin-dominant differentiation of osteoblasts via inhibiting Id4.

研究分野：生化学

キーワード：細胞分化 骨代謝 骨芽細胞 脂肪細胞 細胞内シグナル伝達 転写因子 骨形成タンパク質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

JNK (cJun N-terminal Kinase)は、細胞ストレス(紫外線、温度変化、浸透圧、ER ストレス等) 感染、サイトカイン刺激等によって活性化され、cJun、ATF2 等の転写因子をリン酸化・活性化するキナーゼである。JNK1/2/3 の3種類のアイソフォームのうち、JNK3は神経、精巣等に発現が集中するが、JNK1/2は共に殆どの組織に発現を認める。近年、各組織におけるJNK1/2の生理機能には明確な差異が認められ、拮抗する作用を示すことも多いことが報告されているが、その詳細な分子機構は不明である。JNKのキナーゼ活性は、キナーゼドメイン内のT-P-Yモチーフの2重リン酸化によって活性化される。申請者らは2001年に、JNKを特異的に不活化するフォスファターゼDUSP16(a.k.a. MKP-M)を発見し(Matsuguchi et al. Mol. Cell. Biol. 2001)、その構造機能連関や遺伝子発現調節機構を解明した(Musikacharoen, Matsuguchi et al. J Biol Chem. 2003)。申請者らはまた、自然免疫系細胞におけるJNK活性化に関わるスキャホールドタンパクとしてのJIP3の働きを明らかにした(Matsuguchi et al. EMBO J. 2003)。

JNKは細胞増殖・分化、発癌、アポトーシス、免疫・ストレス反応、糖質代謝など様々な生体反応を制御することが知られる。申請者らはJNKの細胞分化における役割に注目し、DUSP16の発現量の違いによるJNK活性の変化がヘルパーT細胞の分化方向を決定づけること(Musikacharoen, Matsuguchi et al. J Biol Chem. 2011)、骨芽細胞の後期分化にJNK2の活性化が特異的に関わること(Matsuguchi et al. J Bone Miner. Res. 2009)を示した。これらのin vitroの実験結果と合致して、申請者らが近年作成したDUSP16のKOマウスでは、野生型マウスに比べてインターフェロン(IFN γ)優位のTh1タイプの適応免疫応答の亢進が見られ、腫瘍増大速度の低下を示すと共に、尾部椎間板の異常や後頭骨欠損などの特徴的な骨格異常が認められた。

一方、DUSP16 KOマウスには、当初予想していなかった表現型も認められた。大腸菌由来のLPSを用いたエンドトキシンショックモデル実験では、DUSP16 KOマウスは野生型マウスに比べてより高い生存率と低い血中TNF α 濃度を示し、また、高カロリー食を与えた際の耐糖能異常の発症頻度が低下していた。これらの予備実験の結果は、DUSP16が生体内で自然免疫応答や糖質代謝にも重要な役割を果たしている可能性を示唆する。最近、DUSP16 KOマウスにおける3つのJNKアイソフォームのタンパク発現量を調べたところ、複数の臓器でJNK2タンパク量が野生型マウスに比べて有意に増加していることを見いだした。一方、調べたどの臓器においても、JNK1のタンパク量には、著変を認めなかった。また、野生型マウスでは殆ど認められない腎臓でのJNK3のタンパク発現が、DUSP16 KOマウスでは容易に検出できた。これらの結果は、DUSP16がタンパク発現量の制御を介して、生体内でアイソフォーム特異的なJNK活性制御を行っている可能性を示唆する。生体内におけるJNKアイソフォーム毎の活性制御機構については現在までに殆ど解明されておらず、JNKの新たな機能調節機構の発見に繋がる所見として大変興味深い。

2. 研究の目的

上記の背景および申請者のこれまでの研究成果をもとに、JNKが有する多様な生理機能調節機構におけるJNKアイソフォーム特異的な調節様式とその分子機構に注目する。具体的には以下のことを明らかにする。

(1) 脂肪細胞分化におけるJNK活性の役割の解析

間葉系幹細胞(MSC)は多分化能を有する細胞で、骨、軟骨、脂肪、筋肉細胞などに分化する能力を有する。特に脂肪細胞への分化は、相対的な骨量低下に繋がる現象で、高齢化社会におけるQOLの向上を妨げる可能性がある。本研究では、JNK活性による脂肪細胞分化の制御の可能性について検討した。

(2) JNKによる骨芽細胞分化制御の分子機構の解析

我々は以前JNKが骨芽細胞後期分化に必須であること、またその作用がJNK2に特異的であることを証明した(Matsuguchi et al. J. Bone Miner. Res. 2009)。本研究では、JNK活性による骨芽細胞分化制御の分子機構についてより詳細な解析を行った。

(3) 骨形成因子(BMP9)がJNKによる骨芽細胞分化制御に及ぼす影響

BMPは骨再生療法の切り札の1つとして注目されているサイトカインであり、そのうちでもBMP9は強力な骨芽細胞分化誘導作用を持つ。本研究では、BMP9の細胞内シグナル伝達機構を詳細に解析し、JNK活性との関係性に特に注目した。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞分化におけるJNKアイソフォームの役割

JNKの特異的阻害剤およびJNK2アイソフォーム特異的なsiRNA処理の存在下で、マウス前脂肪細胞株である3T3-L1細胞の脂肪分化を誘導し、脂肪滴の出現や脂肪細胞の分化マーカーとして知られるadiponectin、Fabp4、Ppar、C/ebp α のmRNA発現レベルへの影響を解析し

た。また、JNK2を構成する分子量の異なる2つのアイソフォームであるp46JNKおよびp54JNKを強発現し、それぞれが3T3-L1細胞の脂肪分化に与える影響を調べた。

(2) JNKによる骨芽細胞分化制御の分子機構

JNKの特異的阻害薬であるSP600125存在下に骨芽細胞株MC3T3-E1 および初代細胞マウス骨芽細胞を、アスコルビン酸もしくはBMP2にて骨芽細胞分化誘導をかけ、各種骨芽細胞分化マーカーの発現レベルへの影響を調べた。また、マイクロアレイを用いた解析によって、JNK阻害によって、発現レベルが変動する遺伝子を網羅的に検索した。

(3) 骨形成因子BMP9の下流シグナル伝達が、JNKによる骨芽細胞分化制御に及ぼす影響

JNK活性抑制によって誘導される骨芽細胞分化型に、BMP9刺激があたえる影響を調べる。また、BMP9の骨芽細胞分化作用の特異性に注目し、他のBMPとの相違について調べる。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞分化におけるJNKアイソフォームの役割

まず脂肪細胞分化におけるJNKアイソフォーム特異的な役割について解析を行った。JNKの特異的阻害剤およびJNK2アイソフォーム特異的なsiRNA処理の存在下で、マウス前脂肪細胞株である3T3-L1細胞の脂肪分化を誘導したところ、脂肪分化を示す脂肪滴の出現が顕著に抑制された。また、脂肪細胞の分化マーカーとして知られる adiponectin、Fabp4、Ppar、C/ebpaのmRNA発現上昇が全て抑制された。これらの所見は、JNK2がアイソフォーム特異的に脂肪分化に制御的役割を果たすことを示していた。興味あることに、JNK2の抑制による脂肪分化の阻害効果は、脂肪分化初期に限定的であり、脂肪分化後期では効果を認めなかった。さらに、JNK2を構成する分子量の異なる2つのアイソフォームであるp46JNKおよびp54JNKの働きに着目したところ、p46JNK2の強発現は3T3-L1細胞の脂肪分化を促進したが、p54JNK2の強発現は脂肪分化に影響しなかった。これらの実験結果は、p46JNK2がアイソフォーム特異的に初期脂肪分化に必須の役割を果たすことを示していた。次にその分子機構について解析を進めたところ、JNK2による転写因子ATF2のリン酸化（活性化）が、初期脂肪分化に重要なC/ebpd遺伝子のプロモーターへのATF2の結合によるC/ebpd転写亢進を誘導することを見いだした。これらの結果は、生化学の国際的ジャーナルであるBiochemistry Journalに発表した。

(2) JNKによる骨芽細胞分化制御の分子機構

我々は以前JNKが骨芽細胞後期分化に必須であること、またその作用がJNK2に特異的であることを証明した (Matsuguchi et al. J. Bone Miner. Res. 2009)。本研究では、その分子機構についてより詳細な解析を行った。JNKの特異的阻害薬であるSP600125存在下に骨芽細胞株MC3T3-E1 および初代細胞マウス骨芽細胞を、アスコルビン酸もしくはBMP2にて骨芽細胞分化誘導をかけたところ、分化誘導様式に関わらず、通常分化に比べて、SP600125存在下では、オステオポンチンを強発現し、逆に骨芽細胞分化後期に特異的なオステオカルシンの発現量の低いタイプの骨芽細胞分化が誘導された (図1)。次にその分子機構について、マイクロアレイを用いて解析を進めたところ、JNK阻害によって、glycoprotein hormone 2やendothelial cell-specific molecule 1などと共に、転写調節因子として知られるId4の発現が著明に上昇していることを見いだした。また、siRNAによるId4遺伝子ノックダウンを用いた解析などにより、Id4がJNK不活性化によるオステオポンチンの発現上昇に重要な働きをすることが明らかになった (図2)。この結果は、生化学の国際的ジャーナルであるFASEB Journalに発表した。

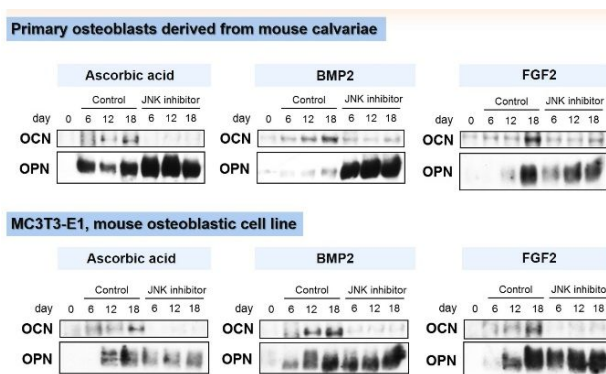


図 1

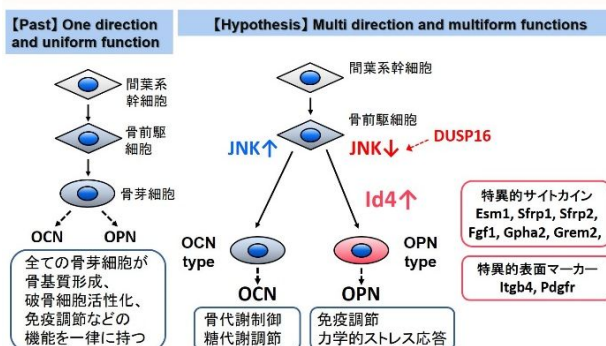


図 2

(3) 骨形成因子BMP9の下流シグナル伝達が、JNKによる骨芽細胞分化制御に及ぼす影響

興味あることに、JNK活性抑制によって誘導されるこのオステオポンチン強発現型骨芽細胞の出現に、BMP9が抑制的に働くことを見いだした。その分子メカニズムを解析したところ、BMP9刺激によって誘導される転写調節因子Hey1が、Id4と複合体を形成して、Id4の働きを弱めることによって起こることを証明した。この研究成果は、Int J Biochem Cell Biol誌に発表した。また、BMP9の骨芽細胞に対する作用の特異性に注目し、BMP2との違いとして、BMP9によって強力に誘導されるEndoglinとGIPC-1タンパク質を介したシグナル伝達経路の存在を明らかにした。このシグナル経路は、PI3キナーゼからAktの活性化経路を促進し、GSK3のリン酸化誘導によるカテニンの蓄積を誘導し、BMP9の強力な骨芽細胞分化誘導能のキープレイヤーとなることを示した(図3)。この研究成果は、FASEB Journalに正式に発表した。

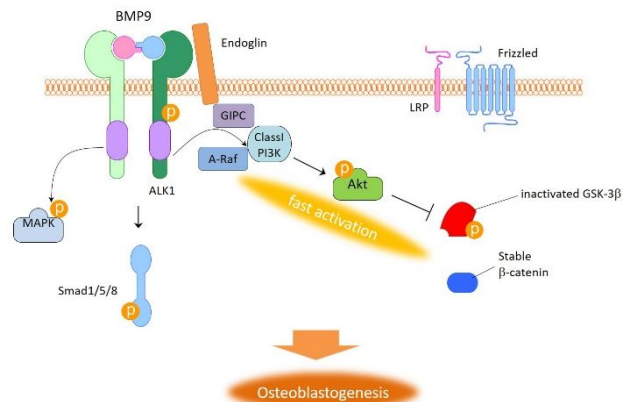


図3

(4) その他の研究成果

現在、生体内でよく見られる低酸素状態が、JNKアイソフォームタンパクレベル、および骨芽細胞分化に関わる影響について解析中である。低酸素で誘導される転写因子 Hif-1 が、解糖系酵素の発現誘導を介して骨芽細胞分化に促進的に働くことを見だし、投稿準備中である。

低出力超音波 (LIPUS) によるメカニカルストレスが、BMP9による骨芽細胞分化誘導を強く促進すること、また、それが、細胞骨格に関わるRHOキナーゼ1を介することを見いだした。これらの成果は、J. Cell Biochem誌に発表した。

チロシンキナーゼであるSykが、PLC 活性を調節することで間葉系幹細胞の多分化能において重要な役割を果たすこと、骨芽細胞が分泌するサイトカインであるオステオポンチンが、FAK特異的脱リン酸化酵素の発現レベルに影響することで、細胞接着に重要な役割を果たすFAK活性を抑えることで骨芽細胞の反応性に及ぼす影響についても解析を進め、それぞれ国際科学ジャーナルであるJ. Cell. Physiol.およびMol. Biol. Cellに発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Eiraku N, Chiba N, Nakamura T, Amir MS, Seong CH, Ohnishi T, Kusuyama J, Noguchi K, Matsuguchi T.	4. 巻 33
2. 論文標題 BMP9 directly induces rapid GSK3- phosphorylation in a Wnt-independent manner through class I PI3K-Akt axis in osteoblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 12124-12134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201900733RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kusuyama J, Bandow K, Ohnishi T, Amir MS, Shima K, Semba I, Matsuguchi T.	4. 巻 476
2. 論文標題 CXCL13 is a differentiation- and hypoxia-induced adipocytokine that exacerbates the inflammatory phenotype of adipocytes through PHLPP1 induction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem J.	6. 最初と最後の頁 3533-3548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20190709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kusuyama J, Seong C, Nakamura T, Ohnishi T, Amir MS, Shima K, Semba I, Noguchi K, Matsuguchi T.	4. 巻 116
2. 論文標題 BMP9 prevents induction of osteopontin in JNK-inactivated osteoblasts via Hey1-Id4 interaction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Biochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 105614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biocel.2019.105614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kusuyama J, Amir MS, Albertson BG, Bandow K, Ohnishi T, Nakamura T, Noguchi K, Shima K, Semba I, Matsuguchi T.	4. 巻 33
2. 論文標題 JNK inactivation suppresses osteogenic differentiation, but robustly induces osteopontin expression in osteoblasts through the induction of inhibitor of DNA binding protein 4 (Id4).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 7331-7347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201802465R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kusuyama J., Kamisono A, ChangHwan S, Amir MS, Bandow K, Eiraku N, Ohnishi T, Matsuguchi T.	4. 巻 233
2. 論文標題 Spleen tyrosine kinase influences the early stages of multilineage differentiation of bone marrow stromal cell lines by regulating phospholipase C gamma activities.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 2549-2559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.26130.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kusuyama J., Bandow K., Ohnishi T., Hisadome M., Shima K., Semba I., Matsuguchi T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Osteopontin inhibits osteoblast responsiveness through the downregulation of focal adhesion kinase mediated by the induction of low molecular weight-protein tyrosine phosphatase	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Cell	6. 最初と最後の頁 1326-1336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E16-10-0716	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kusuyama J, Ohnishi T, Bandow K, Amir MS, Shima K, Semba I, Matsuguchi T.	4. 巻 474
2. 論文標題 Constitutive activation of p46JNK2 is indispensable for C/EBP induction in the initial stage of adipogenic differentiation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem J.	6. 最初と最後の頁 3421-3437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20170332.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kusuyama J, Nakamura T, Ohnishi T, Eiraku N, Noguchi K, Matsuguchi T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) Promotes BMP9-Induced Osteogenesis and Suppresses Inflammatory Responses in Human Periodontal Ligament-Derived Stem Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Orthop Trauma.	6. 最初と最後の頁 S4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/01.bot.0000520897.92470.70.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松口 徹也、千葉 紀香、成 昌奂、大西 智和
2. 発表標題 BMP9 刺激によって誘導される Hif-1 は解糖系酵素 PDK1 の発現を介して骨芽細胞分化に必須の役割を果たす
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西智和 千葉紀香 松口徹也
2. 発表標題 解糖阻害は初期分化段階の初代骨芽細胞においてユビキチン-プロテアソーム系を介してアポトーシスタンパク質の発現を増加させる
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉紀香、大西智和、松口徹也
2. 発表標題 BMP-9による骨芽細胞分化におけるEgr-1の役割の解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成 昌奂、大西 智和、千葉 紀香、松口 徹也
2. 発表標題 Elucidation of molecular mechanisms and functional roles of Notch signaling molecule Hes1 in BMP9-induced osteoblast differentiation
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榮樂菜保子 , 大西智和 , 千葉紀香 , 野口和行 , 松口徹也
2. 発表標題 BMP9 の Class1 PI3K-Akt 経路を介した直接的な骨芽細胞分化誘導
3. 学会等名 第 1 回南九州歯学会総会 ・ 学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉紀香 , 大西智和 , 松口徹也
2. 発表標題 Chlamydia pneumoniae 肺感染におけるマスト細胞の役割
3. 学会等名 第 1 回南九州歯学会総会 ・ 学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西智和 , 千葉紀香 , 松口徹也
2. 発表標題 実験的歯周炎マウスモデルにおけるP. gingivalis 感染の糖尿病性腎症に及ぼす影響
3. 学会等名 第 1 回南九州歯学会総会 ・ 学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口幸恵、千葉紀香、松口徹也
2. 発表標題 転写因子Egr-1 (Early Growth Response Protein-1) は骨形成因子 (BMP-9) による骨芽細胞分化誘導に重要な役割を果たす
3. 学会等名 第 1 回南九州歯学会総会 ・ 学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松口徹也、千葉紀香、楠山譲二、大西智和
2. 発表標題 BMP9の骨芽細胞分化誘導作用におけるPI3K-Akt-GSK3b/b-cateninシグナル経路の重要性
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉紀香、楠山譲二、大西智和、松口徹也
2. 発表標題 クラミジア肺炎時の肺への免疫細胞の浸潤におけるマスト細胞の重要な役割
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榮樂菜保子、中村利明、野口和行、松口徹也
2. 発表標題 骨芽細胞分化におけるBMP9の特異的シグナル伝達経路の解明
3. 学会等名 日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成昌ファン, 松口徹也, 中村典史
2. 発表標題 骨形成タンパク質9 (BMP9) 刺激骨芽細胞における Notch エフェクター分子 Hes1 の発現誘導機構および機能的意義
3. 学会等名 第73回 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西智和、千葉紀香、榮樂菜保子、スパン・アミール、松口徹也
2. 発表標題 ケラチノサイトにおける紫外線B波長によるインターフェロン 反応性の阻害はERストレスを介する
3. 学会等名 第91回日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西智和、楠山譲二、榮樂菜穂子、スパン・アミール、松口徹也
2. 発表標題 解糖系阻害が骨芽細胞のユビキチン-プロテアソーム機構に及ぼす影響
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大西 智和 (Ohnishi Tomokazu) (30244247)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授 (17701)	
研究分担者	楠山 譲二 (Kusuyama Joji) (70596105)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	
研究分担者	柿元 協子 (Kakimoto Kyoko) (40274849)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	