

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592320

研究課題名 (和文)：顎顔面骨再生に向けた β カテニンと PTH の骨形成相互作用の解明研究課題名 (英文)：Clarification of interaction between β -catenin and PTH in osteogenesis for craniofacial bone regeneration

研究代表者：

菅野 勇樹 (KANNO YUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80451813

研究成果の概要 (和文)：

本研究の目的は、骨形成作用を持つ PTH シグナルと PTH 受容体に結合する β カテニンとの相互作用による骨代謝調節機構の存在およびその作用を解明することである。相互作用による骨形成促進機能が解明されることにより、更にはより効果が強く副作用の少ない PTH 関連骨形成促進剤の開発に結びつけることを目標としている。

研究成果の概要 (英文)：

The purpose of this study is to clarify regulatory mechanism of bone metabolism and its effect via interaction between PTH signaling, that has anabolic effect in bone, and β -catenin binding to PTH/PTHrP receptors. By elucidating osteogenic function via the interaction, we aim to develop PTH-related osteogenesis-accelerating drugs that are more effective with less side-effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：顎顔面、骨再生、PTH シグナル

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域では顎顔面の先天性疾患や外傷などによって骨部分欠損が生じるが修復方法として自家骨移植が主に行われている。しかし、自家骨移植では健全な部位を犠牲にすることになることから、これらに取って代わる治療法として細胞を積極的に利用した組織修復を目指す再生医療のアプローチが必要であると考えられる。骨再生においては骨髄由来の間葉系細胞を骨細胞に分

化させ、移植することによって、欠損骨部を再生しようとする試みは多くおこなわれている。しかし、骨髄由来間葉系細胞の増殖能には限界があり、かつ増殖培養中に分化性能が低下することが挙げられる。このため、再生医療を応用した骨再生の成功のためには、この問題点を乗り越えることが不可欠である。そこで十分な骨芽分化を経て、実際に機能する再生骨を得るために骨形成促進剤を併用することを着想した。近年、副甲状腺ホ

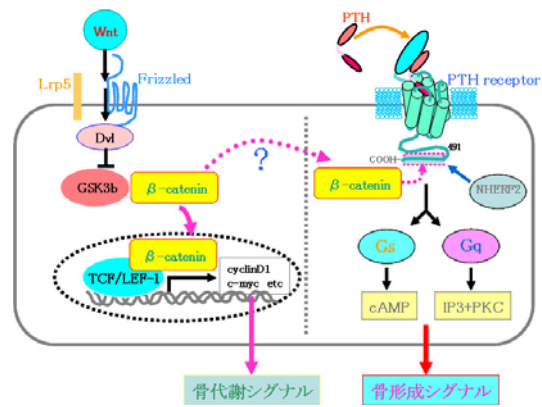
ルモン (PTH) に強力な骨形成促進作用があることが明らかとなり、米国ではヒト組み換え PTH(1-34)が初めての骨形成促進剤として既に FDA の承認を得て臨床の現場で用いられている。しかしながら、この PTH の薬理効果の分子メカニズムについては殆ど解明されていないのが現状であり、より効率的な骨形成促進作用薬の開発へつなげるためにもそのメカニズムの解明が切望されている。

PTH は PTH 受容体に結合後、受容体の細胞内部位に G 蛋白が結合し活性化されることによって細胞内にその主なシグナルを伝えると考えられている。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。しかし PTH の骨組織に対する多彩な作用は、2 種類の G 蛋白を介するシグナルが単に流れるというのみでは説明がつかず、他の分子によっても調整を受けていることが示唆されている。特に PTH 受容体は 7 回膜貫通型の受容体の一つで、受容体細胞内 C 末端が長く、G 蛋白質以外のシグナル分子が結合することが解明されてきている。実際、PTH に結合する新たな蛋白質として

NHERF-2 (Sodium-Hydrogen Exchanger Regulatory Factor-2) が近年同定され、PTH のシグナルを $G_{\alpha q}$ 蛋白へ選択的に伝達させるように受容体と相互作用をしていることが報告された (Mahorn ら、*Nature* 417, 2002)

(図参照)。連携研究者の緒方らは先行研究で、NHERF-2 が同定された方法と同様のイーストツーハイブリッドシステム実験系を用いて PTH 受容体の細胞内 C 末端に結合する新たな蛋白質をいくつか同定しており、その中に骨代謝関連因子として近年注目を浴びている β -カテニンが PTH 受容体に結合することを見出している。 β -カテニンはアルマジロリピートと呼ばれる繰り返しドメイン構造を有する蛋白質でカドヘリンといわれる細胞接着因子と結合すると同時に、多くの細胞骨格因子とも結合し細胞間接着の形成に寄与していると言われている。それらの機能に加え β -カテニンは、主要な骨形成シグナルのひとつである Wnt 伝達系において中心的な働きを担っている。

PTH の骨形成メカニズムについては、主として Runx2 等の転写因子や Wnt シグナルの関与についての散発的な報告が最近見られるようになったが未だ結論には至っていない。



PTH受容体C末端への β カテニンの相互作用と、そのシグナル調節機構

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨形成作用を持つ PTH シグナルとその受容体に結合する β カテニンとの相互作用による骨代謝調節機構の存在およびその作用を解明することである。相互作用による骨形成促進機能が解明されることにより、更にはより効果が強く副作用の少ない PTH 関連骨形成促進剤の開発に結びつけることを考えている。

3. 研究の方法

(1) hPTH-GFP 受容体と C 末端欠損型 PTH 受容体コンストラクトの作成

ヒト PTH 受容体に GFP (Green Fluorescence Protein) を結合させたコンストラクトを組み込んだ発現ベクターを構築した (hPTH-GFP 受容体)。PTH 受容体の細胞内 C 末端は 463 番目から 591 番目までのアミノ酸より構成されている。これら 126 個のアミノ酸のうち C 末端のアミノ酸から 10 アミノ酸ずつ欠失させ GFP を結合させた C 末端変異体-GFP 受容体、および 463 番目のアミノ酸から 10 アミノ酸ずつ欠失させ GFP を結合させた N 末端変異体-GFP 受容体を作成し、発現ベクターに組み込んだ。

(2) hPTH-GFP 受容体と β カテニンのタンパク結合部位の同定

hPTH-GFP 受容体と β カテニンのタンパク結合部位を検出するために (1) で作成したベクターを用いて CheckMate™ / Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System (Promega) を行った。これは、2 つのタンパク質あるいはドメイン同士の相互作用を確認あるいは評価するためのシステムであり、タンパク結合部位を C 末に絞った後に、C 末端のアミノ酸

1つずつ欠失させた変異体ベクターもしくはアミノ酸置換変異体ベクターによるβカテニンとの結合を解析した。

さらに内在性タンパク質の二分子間相互作用や組織内、細胞内での局在を検出するためにDuolink(Olink)を用いて解析した。

(3) βカテニンによる PTH シグナル伝達調整機構の解析

βカテニンは細胞内においてユビキチン化を受け、シグナルが無い場合には常に分解されている。このユビキチン化を受ける部位に変異を加えることで恒常活性型βカテニンを発現するベクターを作成した。hPTH-GFP受容体もしくはC末端変異体-hPTH-GFP受容体、恒常活性型βカテニンのレンチウイルスを作成し、細胞に導入した。その細胞を用いて、PTH刺激により活性化される細胞内サイクリックAMP(cAMP)およびカルシウム反応性を測定し、受容体とβカテニンによるPTHシグナルへの影響を検討した。

(4) Wnt シグナルと PTH シグナルの相互作用による骨形成促進モデルの作成

骨形成促進作用をもつことが知られているGsシグナル(cAMPの反応性上昇)の活性が確認されるβカテニンとhPTH-GFP受容体変異体の組み合わせを検索したのちに、in vitroで骨形成シグナルマーカーが発現上昇するかを現在検討中である。

4. 研究成果

(1) hPTH-GFP受容体とC末端欠損型PTH受容体コンストラクトの作成

ヒトPTH受容体にGFP(Green Fluorescence Protein)を結合させたもの、C末端のアミノ酸から10アミノ酸ずつ欠失させGFPを結合させたC末端変異体-GFP受容体、恒常活性型βカテニン、野生型βカテニンを組み込んだ発現ベクターを作成し、レンチウイルスベクターに組み替えた。発現と機能確認はそれぞれ、ルシフェラーゼアッセイ、リアルタイムRT-PCRもしくはウエスタンブロッティングで行い、細胞で強制発現していることを確認した。

(2) hPTH-GFP受容体とβカテニンのタンパク結合部位の同定

Mammalian Two-Hybrid System hPTH-GFP受容体のC末10アミノ酸に

βカテニンが特異的に結合していることが示唆された。10アミノ酸のうち、いずれのア

ミノ酸がβカテニンの結合に必須であるかを1アミノ酸ずつ置換した変異体を作成し、解析し、hPTH受容体のC末の或る1つのアミノ酸がβカテニンとの結合に必須であることが示唆された。内在性hPTH受容体と内在性βカテニンのタンパク質の相互作用と共局在を示すためにDuolink(PLA法)を用いて、解析の結果、胎児成長板の前肥大軟骨層でこの2つの分子が共局在しており、タンパク相互作用していることが示唆された。PTH刺激による相互作用の変化は現在解析中である。

(3) βカテニンによる PTH シグナル伝達調整機構の解析

βカテニンがhPTH受容体のC末に結合することによって、PTH刺激に反応する下流のシグナルであるGsもしくはGqシグナルの変化があるかを細胞内cAMP、カルシウム反応性を測定した結果、βカテニンが結合することによって、Gqシグナル優位になることが示唆された。さらに(2)で同定したhPTH受容体のβカテニン結合必須部位を欠損させた変異体を用いた解析で再確認している。

(4) Wnt シグナルと PTH シグナルの相互作用による骨形成促進モデルの作成

βカテニン結合もしくは非結合型PTH受容体により骨形成性作用をもつPTHシグナル(Gsシグナル)の下流分子の発現量の変化が見られた遺伝子を同定するためにgene chip microarrayを用いて行う予定である。発現が有意な遺伝子についてアデノウイルス発現ベクターを作成し、骨芽細胞に遺伝子導入した後、PTH刺激による骨形成促進作用が見られるか検討する。促進作用が見られた場合その恒常活性型を作成し、PTHのより効果的な骨形成促進モデルを作成する予定である。

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 15件)

- ① Nakajima K, Komiyama Y, Hojo H, Ohba S, Yano F, Nishikawa N, Ihara S, Aburatani H, Takato T, Chung UI: Enhancement of boneformation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 395(4), 2010, pp. 502-508.
- ② Mori Y, Yano F, Shimohata N, Suzuki S,

- Chung UI, Takato T. Trehalose inhibits oral dryness by protecting the cell membrane. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 査読有, 39(9), 2010, pp916-921.
- ③ Mori Y, Ogasawara T, Motoi T, Shimizu Y, Chikazu D, Tamura K, Fukumoto S, Takato T. Tumor-induced osteomalacia associated with a maxillofacial tumor producing fibroblast growth factor 23: report of a case and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 査読有, 109(3), 2010, pp57-63.
- ④ Saijo H, Kanno Y, Mori Y, Chikazu D, Iino M, Takato T. A bone harvesting method involving a surgical template prepared using a three-dimensional model. *Asian. J. Oral. Maxillofac. Surg*. 査読有, 22, 2010, pp20-22.
- ⑤ Saijo H, Mori Y, Kanno Y, Chikazu D, Fujihara H, Ohkubo K, Hikiji H, Iino S, Yonehara Y, Takato T: Evaluation and analysis of bone formation at palate of cleft lip and palate patients after palatoplasty based on computed tomographic scanning and three dimensional data. *Journal of Plastic Surgery & Hand Surgery* 査読有, 44, 2010 pp21-25
- ⑥ 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 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med*. 査読有, 16(6), 2010, pp678-686.
- ⑦ Kimura A, Inose H, Yano F, Fujita K, Ikeda T, Sato S, Iwasaki M, Jinno T, Ae K, Fukumoto S, Takeuchi Y, Itoh H, Imamura T, Kawaguchi H, Chung UI, Martin JF, Iseki S, Shinomiya K, Takeda S. Runx1 and Runx2 cooperate during sternal morphogenesis. *Development*. 査読有, 137(7), 2010 pp1159-67
- ⑧ Hojo H, Yano F, Ohba S, Igawa K, Nakajima K, Komiyama Y, Kan A, Ikeda T, Yonezawa T, Woo JT, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI. Identification of oxytetracycline as a chondrogenic compound using a cell-based screening system. *J Bone Miner Metab*. 査読有, 28(6), 2010 pp627-33.
- ⑨ Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Kugimiya F, Higashikawa A, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis Rheum*. 査読有, 62(3), 2010, pp826-836.
- ⑩ Ogasawara T, Ohba S, Fujihara Y, Takahashi T, Liu G, Chikazu D, Suenaga H, Chung UI, Yoda T, Mori Y, Susami T, Takato T, Hoshi K. Transforming Growth Factor- β 1 in Combination with Fibroblast Growth Factor-2 and Insulin-like Growth Factor-I for Chondrocyte Proliferation Culture and Cartilage Regenerative Medicine. *Asian J Oral Maxillofac Surg*. 査読有, 21, 2009, pp18-26.
- ⑪ Hojo H, Igawa K, Ohba S, Yano F, Nakajima K, Komiyama Y, Ikeda T, Lichtler AC, Woo JT, Yonezawa T, Takato T, Chung UI. Development of high-throughput screening system for osteogenic drugs using a cell-based sensor. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 376(2), 2008, pp375-379.

[学会発表] (計 18 件)

- ① Kanno Y, Takato T, Saijo H, Igawa K, Seto I, Mori Y, Ohkubo K, Sasaki N, Suzuki S, Chung UI. A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. Bernd-Spiessl-Symposium 2010, 2010年6月18日, Basel, Switzerland.
- ② 菅野勇樹, 西條英人, 井川和代, 斎藤健太郎, 瀬戸一郎, 森良之, 高戸毅: カスタムメイド人工骨移植後の骨癒合状態の評価. 第55回日本口腔外科学会総会, 2010年10月16-18日, 幕張メッセリンク, 千葉.
- ③ 菅野勇樹, 西條英人, 斎藤健太郎, 宇波雅人, 大久保和美, 近津大地, 森良之, 高戸毅: 両側顎関節強直症に対し、人工下顎頭を応用した1例. 第64回NPO法人日本口腔科学会学術大会, 2010年6月24-25日, 札幌プリンスホテル, 北海道.
- ④ 森良之, 須佐美隆史, 西條英人, 菅野勇樹, 近津大地, 末永英之, 杉山円, 前田祐二郎, 斎藤健太郎, 飯野光喜, 高戸毅: 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) 患者に対する全身麻酔下での抜歯経験. 第54回日本口腔外科学会総会, 2009年10月9-11日, 札幌コンベンションセンター, 北海道.
- ⑤ 菅野勇樹, 西條英人, 井川和代, 大久保

- 和美, 近津大地, 森良之, 飯野光喜, 鄭雄一, 高戸毅: カスタムメイド人工骨移植後の移植位置評価. 第 54 回日本口腔外科学会総会, 2009 年 10 月 9-11 日, 札幌コンベンションセンター, 北海道.
- ⑥ 矢野文子, 鄭雄一, 池田敏之, 齋藤琢, 高戸毅, 中村耕三, 川口浩, 緒方直史: β カテニンは軟骨細胞のPTH/PTHrP受容体の細胞内ドメインに直接結合して肥大分化を制御する. 第 27 回日本骨代謝学会, 2009 年 7 月 23-25 日, 大阪国際会議場, 大阪
- ⑦ 小笠原徹, 高戸毅: 細胞周期制御を利用した骨粗鬆症治療法開発のための基礎的検討. 第 9 回 日本抗加齢医学会総会, 2009 年 5 月 28-29 日, ホテル日航東京, 東京.
- ⑧ 菅野勇樹, 西條英人, 藤原久子, 齋藤健太郎, 田中庸子, 杉山円, 前田祐二郎, 飯野光喜, 高戸毅: 上顎洞底挙上術時に洞粘膜の穿孔を合併した 1 例. 第 12 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術集会, 2008 年 12 月 6-7 日, 日本歯科大学, 東京.
- ⑨ 緒方直史, 矢野文子, 鄭雄一, 中村耕三, 川口浩: $G\alpha q$ シグナルは $PKC\delta$ を介して PTH の骨同化作用を抑制する. 第 26 回日本骨代謝学会学術集会, 2008 年 10 月 29-31 日, 大阪国際会議場, 大阪.
- ⑩ 矢野文子, 池田敏之, 齋藤琢, 緒方直史, 木村文子, 竹田秀, 中村耕三, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: 新規低分子化合物チエノインダゾール誘導体は Runx1 と Sox trio を介して永久軟骨再生を誘導する. 第 26 回 日本骨代謝学会学術集会, 2008 年 10 月 29-31 日, 大阪国際会議場, 大阪.
- ⑪ Yano F, Chung UI, Ikeda Y, Kawasaki Y, Kawaguchi H, Tawfeek H, Mahon M. J, Segre G. V, Ogata N: β -catenin Directly Binds to a Specific Intracellular Domain of PTH/PTHrP Receptor and Regulates the Signaling in Chondrocytes during Endochondral Ossification. 30th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2008 年 9 月 12-16 日 Convention Center Montreal, Quebec, Canada.
- ⑫ Ogata N, Yano F, Chung UI, Nwettshureck N., Offermanns S., Segre G. V., Nakamura K., Kawaguchi K.: Inhibitory role of $G\alpha q$ / $PKC\alpha$ signal in the bone anabolic action of PTH. 30th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. 2008 年 9 月 12-16 日 Convention Center

Montreal, Quebec, Canada.

- ⑬ 菅野勇樹, 西條英人, 森良之, 末永英之, 山田陽子, 前田祐二郎, 近津大地, 飯野光喜, 高戸毅: 下顎骨半側切除後のプレート再建に三次元立体モデルによりシミュレーションを施行した 1 例. 第 62 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2008 年 4 月 17-18 日, 福岡国際会議場, 福岡.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

東京大学医学部附属病院顎口腔外科・歯科矯正歯科ホームページ:

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 勇樹 (KANNO YUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 80451813

(2) 研究分担者

小笠原 徹 (OGASAWARA TORU)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20359623

矢野 文子 (YANO FUMIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号: 80529040

(3) 連携研究者

緒方 直史 (OGATA NAOSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究番号: 10361495