

平成 31 年 4 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10910

研究課題名(和文) 内軟骨性骨化における後縦靭帯骨化症関連遺伝子STK38Lの役割と標的分子の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of STK38L, the OPLL-associated gene, and research of its target genes in endochondral ossification.

研究代表者

梶 博則 (Kakoi, Hironori)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：50423728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Stk38lのノックダウンを行なった結果、骨芽細胞分化commitは抑制されたが、軟骨細胞分化は促進した。ATDC5軟骨細胞の分化誘導によってSTK38L発現は増加した。後縦靭帯骨化症(OPLL)臨床サンプルにおけるSTK38Lの発現は、免疫組織化学染色の結果、軟骨様変性靭帯に発現を認めたが、正常靭帯部に発現を認めなかった。STK38Lノックダウンすると、cell growthは抑制された。軟骨細胞が分化成熟して骨化へ移行するためには、細胞分裂を止めて肥大軟骨になる必要があるが、STK38Lはここを阻害する事でOPLL形成に負に働いている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎後縦靭帯骨化症(OPLL)は、精力的な原因究明研究の努力に関わらず、今だに有力な予防・治療につながる原因が不明な難病である。本研究は、ゲノムワイド関連解析(GWAS)の結果からSTK38L遺伝子を原因候補とし、その機能について、特にOPLLの形成過程のモデルとされる内軟骨性骨化過程を想定した培養細胞実験系を用いて解析した。その結果から、STK38LはOPLL形成には抑制的に働く事が示唆され、従って本タンパクのリン酸化蛋白としての機能を促進、あるいは抑制するものを抑制、さらには標的基質蛋白を同定してその機能を高めることで、治療法が見つかる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：siRNA knockdown of STK38L in mesenchymal cell lines resulted in inhibition of osteoblast commitment and promotion of chondrocyte differentiation. Expression of STK38L was increased in ATDC5 chondrocyte upon stimulation of differentiation. We performed immunohistochemistry of STK38L on clinical samples of ossification of posterior longitudinal ligament (OPLL) to find the positive signal in chondrocytic cells of degenerated ligament, whereas normal ligament cells showed no signals. The cell growth was inhibited by loss of STK38L. These results suggest that STK38L play a negative role in formation of OPLL by keeping chondrocytic cells in the proliferating state, which should block maturation of chondrocytes into hypertrophic chondrocytes and subsequent ossification process.

研究分野：肩関節外科

キーワード：STK38L 後縦靭帯骨化症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

脊柱靭帯骨化症の中でも OPLL は高位脊髄麻痺を来す難病で、発症率は日本人を含むアジア人は 4 % 前後、かつ同胞間相対発症危険率は 10 倍と遺伝学的背景が強い common disease である。これまで当教室は *COL11A2* 遺伝子を OPLL 原因候補遺伝子として同定[Koga H, *et al*, *Am J Hum Genet*, 1998:平成 11 年度日本整形外科学会・奨励賞受賞]し、その 1 塩基多型(SNP)のハプロタイプに性差がある事(Maeda S, *et al*, *J Hum Genet*, 2001)、この SNP が実際に mRNA の構造変化(表現型)につながる事(Maeda S, *et al*, *J Bone Miner Res*, 2001:平成 13 年度日本軟骨代謝学会・学会賞受賞)を明らかにして来た。しかしその後のゲノム・シーケンシング・テクノロジーの進歩により多検体の全ゲノムを短時間で解析する事が可能となり、近年我々は厚生労働省「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班」による、1,130 名の OPLL 患者サンプルを用いたゲノムワイド関連解析(Genome Wide Association Study: GWAS)事業に参加した。その結果 6 つの原因感受性遺伝子座が同定された(Nakajima M, *et al*, *Nat Genet*, 2014)。しかし原因遺伝子座同定=原因遺伝子同定ではなく、現時点で原因遺伝子は一つとして決定されていない。

## 2. 研究の目的

我々はこれら遺伝子座に含まれる遺伝子の中から、遺伝子発現データベース FANTOM5 にて骨芽細胞に発現が強い事が予想された遺伝子、*STK38L*(serine/threonine kinase 38 like)を靭帯骨化(骨形成)過程に重要な候補遺伝子として着目した。*STK38L* のノックアウト(KO)マウスの報告はなく、その骨格における機能は不明である。一方で OPLL 変化は主に内軟骨性骨化過程を伴う事から変形性関節症(OA)の病態とも共通項が多い。本研究代表者と研究分担者は、先行研究[基盤研究(C)/課題番号 25462376]において、OA 変化に特徴的な内軟骨性骨化過程の新たな制御因子 *Smpd3* を同定した(Kakoi H, Maeda S, *et al*, *J Biol Chem* 289: 8135-8150, 2014)が、この *STK38L* 蛋白も骨芽細胞のみならず、マウス軟骨細胞系にも十分発現している事を確認しており、骨芽細胞による膜性骨化に加えて、内軟骨性骨化においても重要な働きを担っている可能性が高い。従って *STK38L* が骨・軟骨代謝学及びその関連疾患(骨粗鬆症や OA など)に与える影響も十分に予想される為、本研究は *STK38L* の OPLL 病因との関係に加えて、軟骨・骨分化における機能を主な研究対象として、*in vitro* と *in vivo* の解析をもって検証したい。すなわち、本研究は厚生労働科学研究委託「後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究」の枠を超える大部分の基礎的機能解析をも目的として、OPLL 研究とシームレスに協調的に効率良く *STK38L* の機能の全体像を把握し、関連疾患分野にフィードバックしたい。

## 3. 研究の方法

### 1)間葉系細胞の分化決定と成熟過程における *STK38L* の機能解析

- A) 靭帯細胞のモデルとして線維芽細胞 NIH3T3、前駆軟骨細胞に C3H10T1/2、分化決定後軟骨細胞に ATDC5、前駆骨芽細胞として骨髄ストローマ細胞 ST-2、分化決定後骨芽細胞に MC3T3-E1(clone 4)を準備した。siRNA は Dharmacon 社の同一遺伝子標的に対する独立した 4 種類の siRNA カクテルを使用し、既に一部の細胞でその十分なノックダウン効率を RNA レベルと表現型で確認した。
- B) 過剰発現系は、*STK38L* 発現プラスミドは既に入手していた。

分化の方向と程度の評価は、それぞれの分化マーカーを qRT-PCR にて評価した。具体的には、線維芽細胞は *Col1a1* や *Col3a1* 等、軟骨細胞は、*Sox9*, *Col2a1*, *Acan*, *Col10a1*, *Mmp13* 等、MSC 様細胞への脱分化には CD44, Endoglin, Nucleostemin, STRO-1 等、骨芽細胞分化は *Runx2*, *Sp7*, *Col1a1*, *Alpl*, *Bsp*, Osteocalcin 等が検討項目となった。また、軟骨細胞分化は、monolayer culture に加えて micromass culture を駆使して 3D 環境も再現し、アルシアン・ブルー染色で軟骨基質を、成熟石灰化は von Kossa 染色でも検出した。骨芽細胞分化は、ALP 染色で初期分化を、後期基質石灰化を von Kossa 染色で評価した。基質染色でマーカー発現との整合性を常にモニタリングすると共に、分化過程における *Stk38l* 自体の発現変化も追跡した。

## 2) ヒト OPLL 組織における STK38L の発現動態

- A) OPLL 組織および他の靭帯骨化コントロールとしての OYL 組織を、当施設整形外科脊椎グループ(研究分担者：河村)を中心にサンプリングした。
- B) 組織切片に対して STK38L の免疫組織化学染色を行う。LSBio 社の抗体は入手済みで、既にウエスタン・プロットと免疫染色に使える事を確認していた。

## 3) STK38L のリン酸化標的分子の検索と同定

Intavis 社の CelluSpots-serine/threonine kinase substrate peptide array を用いて、serine/threonine kinase である *Stk38l* の標的ペプチド・モチーフを網羅的に検索し、リン酸化標的分子を同定した。検出システムはウエスタン・プロットと同じ ECL 発光系であり、特別な解析ソフト不要なので、当研究室既存のシステムで対応可能であった。マウス骨芽細胞株・軟骨細胞株を用いた。

## 4 . 研究成果

靭帯細胞のモデルとして線維芽細胞 NIH3T3、前駆軟骨細胞に C3H10T1/2、分化決定後軟骨細胞に ATDC5、前駆骨芽細胞として骨髄ストローマ細胞 ST-2、分化決定後骨芽細胞に MC3T3-E1(clone 4) に対して、*Stk38l* siRNA を作用させ、それぞれの分化系における変化を解析した。分化の方向と程度の評価は、それぞれの分化マーカーを主に qRT-PCR で評価した。具体的には、線維芽細胞は *Col1a1* や *Col3a1* 等、軟骨細胞は、*Sox9*, *Col2a1*, *Acan*, *Col10a1*, *Mmp13* 等、MSC 様細胞への脱分化には CD44, Endoglin, Nucleostemin, STRO-1 等、骨芽細胞分化は *Runx2*, *Sp7*, *Col1a1*, *Alpl*, *Bsp*, Osteocalcin 等を検討した。また、軟骨細胞分化は、monolayer culture と micromass culture を用いて、アルシアン・ブルー染色で軟骨基質を、成熟石灰化は von Kossa 染色でも検出した。骨芽細胞分化は、ALP 染色で初期分化を、後期基質石灰化を von Kossa 染色で評価した。基質染色でマーカー発現との整合性を常にモニタリングすると共に、分化過程における *Stk38l* 自体の発現変化も追跡した。

マウス各種細胞株を用いて *Stk38l* の siRNA ノックダウンを行なった結果、骨芽細胞分化成熟は亢進した。しかし ST-2 や C3H/10T1/2 などの未分化細胞で検討すると、骨芽細胞への commit は抑制され、軟骨細胞分化は促進した。すなわち STK38L は骨軟骨分化ポテンシャルを有する未分化細胞の分化を骨芽細胞方向にシフトする機能が予測された。後縦靭帯骨化症(OPLL)の病因として、後縦靭帯が肥厚・変性し軟骨細胞様に分化し、内軟骨性骨化に似た形態を取ることも指摘されていることから、STK38L が OPLL 発症初期(軟骨様変性期)には抑制的で、OPLL 形成期(骨芽細胞分化期)には促進的にはたらく事が予測された。STK38L はセリン・スレオニン・キナーゼ(リン

酸化酵素)であるが、骨と軟骨の分化に促進的な骨形成蛋白(BMP)シグナルも受容体および下流伝達因子SMADのセリン残基のリン酸化を介してシグナル伝達が進む事から、STK38Lの分化調節効果は、BMPシグナルを介する可能性を考えた。軟骨細胞ATDC5においてBMP-6刺激によるSmad1/5/8のリン酸化へのsiStk38Lの影響をウエスタン・プロットで解析すると、十分なノックダウンが得られたにも関わらず、Smadのリン酸化レベルは変わらなかった。そこで、STK38LのSMAD以外のリン酸化基質を検索する為に、セリン・スレオニン・キナーゼ基質ペプチド・アレイ(CelluSpots)解析をCOS-7細胞におけるtransient transfectionでの強制発現系で行なった。その結果、tau蛋白のリン酸化レベルの低下を検出した。tauはアルツハイマー病と関連の深い蛋白であるが、骨軟骨細胞分化との関わりは全くなく、さらなる解析が新たな知見を導く可能性が浮上した。

後縦靭帯骨化症(OPLL)臨床サンプルにおけるSTK38Lの発現について、免疫組織化学染色(IHC)による検出が、条件検討の未可能となった。その結果、OPLLは靭帯が変性して内軟骨性骨化様のプロセスを経て骨化に至ることが指摘されているが、STK38Lは、その軟骨様変性靭帯に発現を認めた。一方で、変性のない正常靭帯部の細胞には染色性を認めなかった。このSTK38L陽性細胞は、リン酸化SMAD2/3抗体も陽性という結果になり、後縦靭帯の軟骨様変性にはTGF- $\beta$ シグナルが関わっていること、その時STK38Lも出現することから、なんらかの関連が疑われた。STK38LのIHCの結果から、軟骨変性における役割が強く示唆されたので、in vitro実験としてより軟骨の表現型を反映するATDC5細胞のmicromass culture実験を行なった。その結果、monolayer cultureではSTK38Lの発現は分化誘導前後で変わらなかったが、micromassでは分化誘導によって発現が増加した。この時STK38LのsiRNAノックダウンにより、軽度分化が亢進した。したがって、臨床サンプルのIHCの結果と併せて考えると、STK38Lは靭帯細胞の軟骨変性によって発現が増えて、機能的には軟骨分化を抑えるブレーキ役になっている可能性が示唆された。一方、STK38Lはp21蛋白をリン酸化して不安定化させる事で、細胞周期のG1/S期移行を促進する事が報告されていたので、ノックダウンしてWST assayで確認すると、確かにcell growthは抑制された。軟骨細胞が分化成熟して骨化へ移行するためには、細胞分裂を止めて肥大軟骨になる必要があるので、STK38Lはここを阻害する事でOPLL形成に負に働いている可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕

ホームページ等

<https://www.orthop-kagoshima-u.com/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：前田 真吾

ローマ字氏名：(MAEDA, Shingo)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学総合研究科

職名：特任准教授

研究者番号(8桁): 60353463

研究分担者氏名：河村 一郎

ローマ字氏名：(KAWAMURA, Ichiro)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 90535832

研究分担者氏名：小宮 節郎 (削除：2018年3月29日)

ローマ字氏名：(KOMIYA, Setsuro)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号(8桁): 30178371

研究分担者氏名：富永 博之

ローマ字氏名：(TOMINAGA, Hiroyuki)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：助教

研究者番号(8桁): 20750798

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：松山 金寛

ローマ字氏名：(MATSUYAMA, Kanehiro)

研究協力者氏名：篠原 直弘

ローマ字氏名：(SHINOHARA, Naohiro)

研究協力者氏名：八尋 雄平

ローマ字氏名：(YAHIRO, Yuhei)

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。