

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006 ~ 2008

課題番号：18591654

研究課題名（和文）

CDK6 を中心とした細胞死制御機構の解析

研究課題名（英文）

The analysis of the cell death control by CDK6

研究代表者

原 慶宏 (HARA NOBUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00422296

研究成果の概要：骨・軟骨細胞の分化、増殖を調整する細胞周期関連分子 CDK6 に注目し、軟骨細胞及び骨芽細胞に特異的に CDK6 を強制発現させる遺伝子改変マウスを作成し解析した。CDK6 と Cyclin D1 を同時に発現させると、細胞増殖が促進されると同時に、癌抑制遺伝子である p53 依存的にアポトーシスが誘導されることを発見した。更に骨芽細胞で CDK6 が誘導したアポトーシスは、Bcl-2 の導入で救済され、骨量が著名に増加した。骨増殖症のモデルマウスになる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000	0	1,700,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

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：

CDK6、Cyclin D1、p53、軟骨細胞、骨芽細胞、アポトーシス、

1. 研究開始当初の背景

間葉系細胞から骨・軟骨細胞への分化調節機構に関しては、サイトカイン、シグナル分子、転写因子に関する研究が主流であり、細胞周期関連分子に関する研究は殆ど行われてい

ない。間葉系細胞から骨・軟骨細胞への分化調節機構に関しては、骨・軟骨細胞の分化における分子メカニズムの解明を目指した新しい切り口として、細胞周期関連分子による制御機構の検討を我々が世界に先駆けて行

ってきた。細胞周期関連分子であるすべてのサイクリン、CDK、および CKI の内で、CDK6 のみが骨芽細胞および軟骨細胞の分化にとともに強力に発現制御を受けていること、CDK6 の過剰発現がこれらの細胞の分化を抑制すること、この抑制作用は増殖促進作用とは独立したものであることは、CDK6 が骨軟骨分化調節作用を有すること強く示唆するものと考えられた。

2 . 研究の目的

本研究は、細胞周期関連分子が骨・軟骨細胞の分化を生体内においても制御している可能性に注目して始まった。生体内に於ける、CDK6 の骨軟骨分化調節作用を検討する為に、軟骨細胞に特異的に発現する II 型コラーゲンプロモーター (*Col2a1* promoter)、骨芽細胞に特異的に発現する I 型コラーゲンプロモーター (*Col1a1* promoter) の 2 種類のプロモーターを用いた遺伝子改変マウス CDK6 Tg を作成し、安定的に導入遺伝子を発現する系統を各々複数樹立した。さらに、CDK6 と CDK6 の制御サブユニットである CyclinD1、アポトーシス抑制分子である Bcl-2 を導入した CyclinD1 Tg、Bcl-2 Tg を作成した。それぞれを交配することで、CDK6 と CyclinD1 を同時に過剰発現させた CDK6/Cyclin D1 Tg や、さらに Bcl-2 も同時に発現させた CDK6/Cyclin D1/Bcl-2 Tg を作成した。II 型コラーゲンプロモーター-CDK6/Cyclin D1 Tg マウスでは、軟骨細胞における分化の抑制、G1/S 期移行促進、アポトーシス誘導が観察された。そこで、CDK6 が誘導する、分化、増殖、細胞死についてのネットワーク機構を明らかにすることを目的とした。

3 . 研究の方法

軟骨細胞及び骨芽細胞に特異的に発現するプロモーターの下流に、マウス由来の CDK6、Cyclin D1、Bcl-2 全翻訳領域を含む DNA 断

片を挿入したベクターを作成し、C57BL/6 と C3H の F1 交雑マウス (B6CH3 F1) から得られた前核期受精卵にそれぞれの DNA 断片を注入後、卵を偽妊マウスの卵管膨大部に移植し、それぞれの仔を得た。導入遺伝子の確認はサザンブロット解析で、導入遺伝子の発現はノーザンブロット解析により判定した。発現量の違う複数の系統を樹立して、交配を行い、CDK6/Cyclin D1 Tg、CDK6/Cyclin/Bcl-2 D1 Tg を作成した。さらに、Tg と p53+/+ を交配し、p53-/-、CDK6/Cyclin D1 Tg を作成した。

Tg マウスについて、BrdU 染色、フローサイトメトリー (FACS)、TUNEL 染色、in situ hybridization 法を用いた解析を行った。CDK6 が誘導するアポトーシスの下流のシグナルの同定や、電子顕微鏡レベルでの形態学的観察を行った。

4 . 研究成果

軟骨細胞に発現させた CDK6/Cyclin D1 Tg では、著明な四肢短縮を呈し、出生直後に呼吸不全で全例死亡した。CDK6/Cyclin D1 Tg の軟骨細胞は、分化の抑制、BrdU 取り込み陽性増殖細胞の増加、FACS にて細胞周期の G1/S 移行促進とアポトーシスの著明な亢進した。これらは、CDK6、cyclinD1 単独の過剰発現では見られなかった。p53-/-、CDK6/Cyclin D1 Tg でアポトーシスが救済されたことから、CDK6/Cyclin D1 が誘導したアポトーシスは、p53 に依存していることが明らかとなった。しかし、BrdU 取り込み細胞増加にも関わらず、軟骨細胞数の増加や、四肢の長さはほぼ正常であった。p53-/-、CDK6/Cyclin D1 Tg では、細胞分裂に障害がり、分裂破局状態であることが推測された。透過電子顕微鏡にて軟骨細胞特有のアポトーシスとは異なる像が観察された。CDK6 の下流シグナルは、特定するには至っておらず現在も解析中である。骨芽細胞に発現させた CDK6/Cyclin D1 Tg に

においても、BrdU 取り込み陽性増殖細胞の増加、とアポトーシスの著明な増加を認めた。軟骨細胞の Tg に比して、表現型は緩徐であり、若干の骨量減少を認めた。骨芽細胞の分化障害は顕著でなかった。しかし、CDK6/Cyclin D1/Bcl-2 Tg は、著明な骨量増加を認めた。In situ hybridization 法で Ⅱ型コラーゲン陽性の細胞が著明に増加しており、骨芽細胞が増加していることが証明された。通常骨に単層で張り付くように存在する骨芽細胞が、骨髄腔側に多重に折り重なって、腫瘍性に増殖している像を呈した。CDK6/Cyclin D1/Bcl-2 Tg は生後 6 カ月以上経過すると、皮質骨が著明に肥厚し、骨幹で骨髄腔がほとんどなくなるほどの個体も観察された。骨芽細胞の Tg を用いた研究は、個体数を確保することに多大な時間と労力を要し、現在も継続して解析中である。

骨量が増加する疾患は、骨吸収の障害と骨増殖の亢進に大きく分けられる。骨吸収の障害では、吸収されない海綿骨が増加していくが、骨増加症では、皮質骨が著名に肥厚していく。骨増殖の亢進する疾患として、TGF-beta の異常が人の疾患で明らかになっているが、病態解明や、治療法を解明するためのモデル動物は、確立されていない。CDK6/Cyclin D1/Bcl-2 Tg が有用なツールになる可能性を秘めている。

本研究において、CDK6 は、間葉系細胞の分化、増殖、アポトーシスの中心的役割を担っていることが示唆された。骨芽細胞における CDK6 が誘導したアポトーシスの抑制は、結果として骨増殖を呈し、骨増殖症のモデルマウスとして利用できる可能性を見出した。CDK6 を中心とした細胞増殖、細胞死制御機構の分子ネットワークを解明することにより、骨軟骨再生医療や、骨代謝疾患の治療に応用することを目標に研究を継続していきたいと考

えている。

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 10 件)

1. Takahashi T., Ogasawara T., Asawa Y., Mori Y., Uchinuma E., Takato T. and Hoshi K.: Three dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. *Tissue Engineering* **13**, 1583-1592, 2007. (査読あり)
2. Liu G., Kawaguchi H., Ogasawara T., Asawa Y., Kishimoto J.I., Takahashi T., Chung U.I., Yamaoka H., Asato H., Nakamura K., Takato T. and Hoshi K.: Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. *J Biol Chem* **282**, 20407-20415, 2007. (査読あり)
3. Chikazu D., Tomizuka K., Ogasawara T., Saijo H., Koizumi T., Mori Y., Yonehara Y., Susami T. and Takato T.: Cyclooxygenase-2 Activity is essential for the Osseointegration of Dental Implants. *Int J Oral Maxillofac Surg* **36**, 441-446, 2007. (査読あり)
4. Tanaka, Y., Ogasawara, T., Asawa, Y., Yamaoka, H., Nishizawa, S., Mori, Y., Takato, T. and Hoshi, K.: Growth factor contents of autologous human sera prepared by different production methods and their biological effects on chondrocytes. *Cell Biol Int*, **32**, 505-514, 2008. (査読あり)
5. Ohba, S., Kawaguchi, H., Kugimiya, F.,

- Ogasawara, T., Kawamura, N., Saito, T., Ikeda, T., Fujii, K., Miyajima, T., Kuramochi, A., Miyashita, T., Oda, H., Nakamura, K., Takato, T. and Chung, U.I. : Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev Cell* **14**, 689-699, 2008. (査読あり)
6. Kawasaki, Y., Kugimiya, F., Chikuda, H., Kamekura, S., Ikeda, T., Kawamura, N., Saito, T., Shinoda, Y., Higashikawa, A., Yano, F., Ogasawara, T., Ogata, N., Hoshi, K., Hofmann, F., Woodgett, J.R., Nakamura, K., Chung, U.I. and Kawaguchi, H. : Phosphorylation of GSK-3 β by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic differentiation of murine chondrocytes. *J Clin Invest* **118**, 2506-15, 2008. (査読あり)
7. Hirata M, Kugimiya F, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Fukai A, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: C/EBP promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57Kip2. *PLoS ONE* **4(2)**, e4543, 2009. (査読あり)
8. Asawa, Y., Ogasawara, T., Takahashi, T., Yamaoka, H., Nishizawa, S., Matsudaira, K., Mori, Y., Takato, T. and Hoshi, K.: Aptitude of Auricular and Nasoseptal Chondrocytes Cultured under a Monolayer or Three-Dimensional Condition for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*, 1109-18, 2009. (査読あり)
9. Liu G., Iwata K., Ogasawara T., Watanabe J., Fukazawa K., Ishihara K., Asawa Y., Fujihara Y., Chung U.I., Moro T., Takatori Y., Takato T. Nakamura K., Kawaguchi H., and Hoshi K.: Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. *J Biomed Mater Res A in press* (査読あり)
10. Ogasawara T., Ohba S., Fujihara Y., Takahashi T., Liu G., Chikazu D., Suenaga H., Chung U.I., Yoda T., Mori Y., Susami T., Takato T., and Hoshi K. : Effects of transforming growth factor (TGF) β 1 in combination with fibroblast growth factor (FGF) -2 and insulin-like growth factor (IGF) -1 on chondrocytes proliferation culture for the cartilage regenerative medicine *Asian J Oral Maxillofac Surg in press* (査読あり)
- [学会発表](計9件)
1. 星和人, 劉光耀, 小笠原徹, 浅輪幸世, 高橋嗣明, 鄭雄一, 高戸毅, 中村耕三, 川口浩 自家軟骨細胞から大量永久軟骨再生のための最適シグナル条件の系統的・網羅的検索 第24回日本骨代謝学会学術集会 2006年7月6日-8日 東京
2. 小笠原 徹, 川口 浩, 岡山 博人, 高戸 毅, 星 和人: 細胞周期分子による骨再生医療のための基礎的検討.

- 第6回 日本再生医療学会総会 2007年3月13-14日 横浜
3. 浅輪 幸世, 小笠原 徹, 高戸 毅, 星 和人: ヒト軟骨細胞の継代培養に伴う表面抗原の変化とその生物学的意義. 第6回 日本再生医療学会総会 2007年3月13-14日 横浜
 4. 西澤 悟, 山岡 尚世, 小笠原 徹, 浅輪 幸世, 山岡 桂子, 高戸 毅, 星 和人: 軟骨細胞脱分化現象におけるFGFファミリーの役割. 第6回 日本再生医療学会総会 2007年3月13-14日 横浜
 5. 小笠原 徹, 川口 浩, 高戸 毅, 星 和人: 間葉系細胞の分化多能性維持機構におけるNanogの役割. 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
 6. Hoshi K, Liu G, Ogasawara T., Asawa Y, Takahashi T, Yamaoka H, Chung U, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H. Optimal combination of soluble factors for Tissue Engineering of permanent cartilage with high quality and quantity from autologous human chondrocytes. Twenty Eighth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research September 15-19, 2006 Pennsylvania Convention Center Philadelphia, Pennsylvania, USA
 7. Ogasawara T., Hoshi K., Kawaguchi H., Ohba S., Chikazu D., Fujihara Y., Suenaga H., Mori Y., Susami T., Okayama H., Takato T.: Application of cell cycle factors to bone regeneration. Tissue Engineering International & Regenerative Medicine

- Society Asia Pacific Chapter Meeting 2007, December 3-5, 2007, Tokyo, Japan
8. Asawa Y., Ogasawara T., Takato T., Hoshi K.: Changes in surface epitopes of human chondrocytes during a long-term culture and their biological significances. Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society Asia Pacific Chapter Meeting 2007, December 3-5, 2007, Tokyo, Japan
 9. Nishizawa S., Yamaoka H., Ogasawara T., Asawa Y., Yamaoka K., Takato T., Hoshi K.: Cytological roles of the FGF family in the chondrocyte redifferentiation. Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society Asia Pacific Chapter Meeting 2007, December 3-5, 2007, Tokyo, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 慶宏 (HARA NOBUHIRO)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号: 00422296

(2) 研究分担者

平成18年度
 深井 厚 (FUKAI ATSUSHI)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号: 20422298

平成18年度~20年度
 河野 博隆 (KAWANO HIROTAKA)
 東京大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号: 20345218

平成18年度~20年度
 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

(3) 連携研究者

なし