

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08465

研究課題名(和文) AKAP13を用いた骨代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) AKAP13 influences osteogenesis by integrating Wnt signaling and RhoA activity

研究代表者

小出 尚史(Koide, Hisashi)

千葉大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：30507223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：AKAP13は機械応答刺激や女性ホルモン活性化など様々なシグナリングを統合するタンパクである。これまで細胞実験や動物実験においてAKAP13は骨形成に関与することが証明されている。本研究でcKOマウスでの骨粗鬆症様変化を確認し、細胞実験では、AKAP13はRhoA活性化を介し、Wnt3a誘導性b-カテニンの核内移行を促進し、Lef1遺伝子を制御することで、骨形成連遺伝子発現を制御することが示された。AKAP13は、Rho・Wntシグナルを統合し、骨形成に重要な役割を担うものと考えられた。同遺伝子およびco-factorの解析は、今後、新たな骨形成を介した骨粗鬆症治療薬開発に繋がるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rhoシグナルは骨芽細胞の分化調節に重要であることは論を俟たない。また、臨床レベルでAKAPファミリー分子が骨粗鬆症との関連を示唆する報告を認めるが、我々が世界で初めてAKAPの骨での役割を基礎研究レベルで明らかにした。Rho-GEFのAKAP13は骨形成に作用し、Akap13コンディショナルノックアウトマウスは骨粗鬆症様変化を認め、Akap13はRhoA活性化を介した経路により、Wnt3a誘導性b-カテニンの核内移行やLef1遺伝子を制御し、骨芽細胞の増殖分化を制御している可能性が示唆された。様々なシグナルを統合するAkap13の機能を通じて、骨粗鬆症治療の創薬に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Previous research has suggested the involvement of AKAP13 in the early stages of osteogenesis. Conditional knockout of Akap13 in the bone resulted in osteoporotic changes in mice. Akap13 overexpression in MC3T3-E1 cells increased the nuclear translocation of β -catenin via Wnt3a induction. Akap13 depletion led to significant decreases in Lef1 mRNA expression in MC3T3-E1 cells. Overexpression of Akap13 in MC3T3-E1 cells increased RhoA activity, but this was not observed for the Akap13 mutant lacking the guanine nucleotide exchange factor domain. Overexpression of Akap13 increased Alp mRNA levels. RhoA overexpression in immortalized bone marrow-derived stromal cells resulted in Alp mRNA upregulation in a RhoA induction-dependent manner. Wnt3a-induced β -catenin nuclear translocation was inhibited by Rho inhibitor in Akap13-overexpressed MCT3-E1 cells. Overall, these results suggest that AKAP13 plays an important role in regulating osteogenesis through Wnt signaling pathways.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：骨代謝 骨粗鬆症 骨リモデリング 骨形成 Rhoシグナル Wntシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、本邦で現在約1千万人が診断され、特に閉経後および高齢女性で最も重要な疾患の一つである。現在、我々が本疾患への治療として临床上使用可能な薬剤は、ビスフォスフォネート、SERM、エストロゲン、抗RANKL抗体などといった、主に骨吸収を抑制するものよりなり、骨形成を直接促す薬剤はこれまでのところ副甲状腺ホルモンと Romosozumab のみである。従って、同疾患の骨リモデリングを、骨吸収抑制に偏らずに正常に戻すためにも、骨形成を促進する薬剤の開発が急務であるといえる。これに付随して、メカニカルストレス刺激応答やエストロゲンの骨芽細胞に及ぼす機能などについては未解明な点も多く、骨形成の機序については完全には明らかにされたとは言えないのが現状である。

そこで我々は、これらの問題点に対して、Guanine nucleotide exchange factor (GEF)であり、リガンド依存性にエストロゲンやグルココルチコイド受容体作用を増強するといった、多彩な機能を有する protein kinase A-anchoring protein 13 (AKAP13)を用いて、骨形成作用の新たな制御機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

これまでの知見に基づけば、AKAP13は、多数のシグナリングモジュールを統合し、コーディネートするように働くタンパクであり、骨形成の初期の段階、すなわち骨髄間質細胞数に影響を与えるとともに、骨形成に関する骨芽細胞数の決定に関与し、さらに転写レベルで *Runx2* の発現を刺激し、その下流遺伝子を上昇させることにより骨形成を刺激している可能性が示唆され、AKAP13が骨形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった(Koide et al. *J Bone Miner Res.* 2015)。さらには、いくつかのヒトの疾患に関与していることがわかっており、これまで、乳がん、リンパ腫、前立腺がん、結腸直腸がん、アルツハイマー病、高血圧、食道がんでの AKAP13 の関与を示す報告を認める。一方で、AKAPファミリーの1つである AKAP11 が、ヒトのゲノムワイド解析により椎体骨の骨密度に関連することが報告された。以上より、AKAP13の骨での役割の研究が、今後骨代謝の新たな制御機構の解明に非常に重要な意義を持つものと考えられた。

3. 研究の方法

(A) AKAP13骨特異的コンディショナルノックアウト(cKO)マウスの骨分化におけるフェノタイプ解析。

(1)骨特異的 AKAP13cKO マウスの in vivo 表現型解析

我々は、全長 15.9 kbp の AKAP13 の変異 targeting vector を作製し、AKAP13 の GEF 領域を挟むようにして loxp を配置した。サザンプロット法を用いて、ES 細胞に正確に変異 allele が導入されていることを確認した。F1 ヘテロ同士の交配により、AKAP13 の floxed マウスの取得し、さらに Collagen Type1a1 Cre マウスと掛け合わせ osteoblast specific に AKAP13 をノックアウトした cKO マウスの作製に成功した。現在のところ咬合不全を呈していることが明らかにされ、今後更なる表現型の解析を行う。Micro computed tomography(μ CT)を用いた骨の解析を行った。

(2)AKAP13 骨特異的 cKO マウスを用いた培養骨細胞分化の検討

WT/Floxed/Floxed/cKO マウス群間において、大腿骨、脛骨由来の BMSCs の骨芽細胞分化誘導と頭蓋骨からの成熟骨細胞のプライマリーカルチャー、 β -glycerophosphate、ascorbic acid、BMP2 刺激による骨芽細胞分化の誘導態観察とカルシウム沈着の染色による骨芽細胞への分化能の評価、分化マーカーの遺伝子発現プロファイル(Real-Time PCR 法を用いた定量的評価) (Runx2, osterix, ALP, collagen type1a1, osteocalcin, bone sialoprotein)

(B) MC3T3-E1 細胞を用いた AKAP13 誘導遺伝子の同定とその機能解析。

AKAP13 ノックダウン細胞への Wnt シグナルへの影響・in vitro 解析

・骨分化マーカーの変化、カテニン免疫染色、Rho 阻害剤添加、Rho 活性測定

siRNA またはプラスミドベクターを MC3T3-E1 細胞にトランスフェクションし Wnt3a を添加し、24 時間後に蛍光免疫染色を行った。細胞をメタノールで 5 分間固定し、PBS 中の 1% ウシ血清アルブミンを用いて室温で 30 分間ブロッキングした。次に、細胞を PBS 中で 1 : 50 に希釈した Alexa Fluor 594 結合抗マウス抗 β -カテニン抗体で 90 分間インキュベートした。核染色用に 4'-6-Diamidino-2-phenylindole を添加した。スライドを BZ-X810 蛍光顕微鏡で観察し画像を取得した。RhoA 活性化測定: RhoA G-LISA Activation Assay Biochem Kit を用いて RhoA 活性化を測定した。

4 . 研究成果

Akap13 floxed を Col1a1-cre マウスと交配し、骨特異的 Akap13 コンディショナル KO (cK0) マウスを作製した。コントロール(CTRL)マウスと cK0 マウスの間で体重に有意差はなかった。Akcap13^{+/+}-Col1a1cre および Akap13^{f/f}-Col1a1cre マウスの大腿骨の in vivo 骨構造を μ CT イメージングで定量化した。22 週齢雌マウスの大腿骨の μ CT 分析では、特に海綿骨で BMD の低下が認められた。22 週齢の Akap13^{f/f}-Col1a1cre マウスでは、CTRL マウスに比べて体積あたりの骨量、骨梁数、骨梁幅が減少し、それに対応して骨量あたりの骨表面積、骨梁間隙は増大していた。次に、Akcap13 欠損細胞の骨形成分化能について評価した。Akcap13^{f/f}-Col1a1cre マウスの Bone marrow stromal cells (BMSC) は、アリザリンレッド染色による解析にて、骨分化の低下を認めた。

次に、Wnt/ β -カテニンシグナル活性化に対する Akap13 の効果が、 β -カテニンの核へのトランスロケーションの増加と関連しているかどうかを検討した。蛍光免疫染色で観察したところ、Akcap13 siRNA を導入した MC3T3-E1 細胞の核では、 β -カテニンレベルが低いことがわかった。Wnt3a 処理細胞では β -カテニンの核内移行が増加したが、Wnt5a 処理細胞では Akap13 siRNA の有無にかかわらず β -カテニンの核内移行は抑制された。逆に、Akcap13 の過剰発現は、 β -カテニンの核内移行を増加させた。Akcap13 の過剰発現の有無にかかわらず、Wnt3a の添加は β -カテニンの核内移行を促進し、Wnt5a の添加は β -カテニンの核内移行を阻害した。

Akap13 の効果をさらに検討するため、MC3T3-E1 細胞において siRNA を用いて Akap13 をノックダウンした。Akcap13 siRNA 処理細胞では、24 時間後に CTRL の場合と比較して、Lef1 の転写レベルの有意な減少が観察された。

骨形成に対する Akap13 の効果をさらに検討するため、野生型 Akap13 または Akap13 変異体構造のベクターを MC3T3-E1 細胞にトランスフェクションした。MC3T3-E1 細胞に発現ベクターをトランスフェクトすると、Akcap13 の過剰発現は RhoA 活性を増加させたが、GEF 陰性変異体は RhoA 活性化に影響を及ぼさなかった。MC3T3-E1 細胞では、Akcap13 の過剰発現に伴い Alp の発現が上昇した。Akcap13 ノックダウンと Rho 阻害剤 C3 による処理により、MC3T3-E1 細胞における RhoA 活性化が低下し、Akcap13 ノックダウンはより強い阻害効果を示した。不死化 Bone marrow stromal cells において RhoA を過剰発現させると Alp の発現が増加したが、Akcap13 ノックダウンによりその効果は減少し、RhoA 過剰発現がある方がより強い効果を示すことが示された。Akcap13 を過剰発現させた MC3T3-E1 細胞では、Wnt3a による β -catenin 核内移行は RhoA 阻害剤の導入により抑制された。

以上のことから、Akcap13 は前骨芽細胞において、Lef1 遺伝子を直接制御し、RhoA 活性化を介して β -カテニン核内輸送経路を増強することがわかった。これらの作用は、骨分化に関わる遺伝子発現に重要であ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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石田 晶子, 中山 哲俊, 永野 秀和, 小出 尚史, 龍野 一郎, 田中 知明, 横手 幸太郎
2. 発表標題 RhoAおよびWntシグナルを介したAKAP13の骨代謝調節機構
3. 学会等名 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田 晶子, 小出尚史
2. 発表標題 AKAP13はWntシグナルとRhoA活性を統合して骨形成に影響を与える
3. 学会等名 千葉医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田 晶子, 中山 哲俊, 小出 尚史, 龍野 一郎, 田中 知明, 横手 幸太郎
2. 発表標題 RhoAおよびWntシグナルを介したAKAP13の骨代謝調節機構
3. 学会等名 日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田 晶子
2. 発表標題 AKAP13の骨代謝調節機構の解明
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 晶子, 中山 哲俊, 樋口 誠一郎, 永野 秀和, 小出 尚史, 龍野 一郎, 田中 知明, 横手 幸太郎
2. 発表標題 「骨代謝機構におけるAKAP13の機能的役割」
3. 学会等名 第91回内分泌学会総会 宮崎
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田晶子、中山、小出、龍野一郎、田中知明、横手幸太郎
2. 発表標題 「骨代謝機構におけるAKAP13の機能的役割」
3. 学会等名 第36回骨代謝学会 長崎
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Ishida, Akitoshi Nakayama, Hisashi Koide, Ichiro Tatsuno, Tomoaki Tanaka, Kotaro Yokote
2. 発表標題 The effects of AKAP13 on osteogenesis by modulation of RhoA and Wnt signaling
3. 学会等名 ENDO 2019 New Orleans, U.S.A. (国際学会)
4. 発表年 2019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	田中 知明 (Tanaka Tomoaki) (50447299)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------