

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09518

研究課題名(和文)軟骨細胞分化、組織形成に関わる新規プロテインキナーゼの探索とシグナル機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of signal molecules of protein kinases involved in chondrocyte differentiation and cartilage formation

研究代表者

高畑 佳史 (Takahata, Yoshifumi)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：60635845

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)：内軟骨形成は未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化が正常に進行することで形成される。生理活性物質である骨形成因子BMPは強く骨や軟骨形成促進作用があるが、BMPで誘導される下流のシグナル分子やその伝達機構の詳細は分かっていない。本研究ではBMPで誘導されるキナーゼ関連分子を網羅的に探索し、軟骨細胞分化に重要な遺伝子としてセリンスレオニンプロテインキナーゼ32a(Stk32a)を新たに同定した。さらにStk32aの軟骨形成に対する影響を明らかにするために、培養軟骨細胞や遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析によってStk32aが軟骨細胞分化の制御に関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨・軟骨分化に関わるシグナル分子であるBmpやTGF- β は共通の受容体を介し上流のシグナルを共有するにも拘らず、骨・軟骨分化能に対する役割は異なっている。その違いを生み出しているのは下流に存在するシグナル分子が異なることが予想されるが、骨・軟骨誘導作用を特異的に決定づけるシグナル伝達機構の解明は進展していない。創薬的観点から既存の受容体をターゲットとした薬剤の探索は新規性の限界に達しており、今後は特定の分子標的薬と特定の疾患への有効性が注目を浴びている。本研究で明らかとなったシグナル分子の詳細により骨・軟骨再生や臨床的に重要な多くの骨疾患の治療に有用な知見を与える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Endochondral ossification is required for the progress of chondrocyte differentiation. Bmp2 is well known for the strong induction of bone and chondrocyte formation, however function of the signal molecules induced by Bmp, which is essential for chondrocyte differentiation, are unknown. In this study, we identified the novel serine threonine protein kinases 32a (Stk32a) as an important gene for chondrocyte differentiation. Furthermore, in order to clarify the effect of Stk32a on chondrocyte formation, we studied the Stk32a gene function using by chondrocyte cell culture system and gene targeted knockout mice. Through these analyses, we revealed that Stk32a might be involved in regulation of chondrocyte differentiation.

研究分野：骨代謝領域

キーワード：軟骨細胞 シグナル伝達 骨形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体を構築するまでの発生、成長段階、および生命活動において遭遇する損傷や病態による組織欠損の修復には、体性幹細胞が重要な役割を果たしている。間葉系幹細胞は、自己複製能と骨、軟骨、脂肪、骨格筋、腱、靭帯などの間葉系組織への多分化能を有する体性幹細胞である。1999年にヒト骨髄由来間葉系幹細胞が単離、培養可能であり、適切な培養条件により骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞へと分化することが確認された。(Pittenger et al, *Science*. 1999)。骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、筋芽細胞は共通の未分化間葉系細胞から分化することが、広く知られており、全く異なるファミリーに属する転写因子が未分化間葉系細胞の分化決定を支配している。1997年、ショウジョウバエの体節形成遺伝子の一つ runt にホモロジーを持つ runt-related transcription factor2 (Runx2)が骨芽細胞の分化を支配する遺伝子の一つとして登場した (Komori et al *Cell*. 1997)。さらに軟骨細胞への分化には high mobility group (HMG)の転写因子 Sox9 が必須であることが示された (Bi et al, *Nat Genet*. 1999)。Sox9 転写因子は軟骨細胞特異的遺伝子の発現を調節し、軟骨細胞独特の性質や機能を獲得する。その転写因子の発現や転写活性を制御するものとして、BMP や FGF、Wnt などの分泌タンパク質が同定され、調節機構の解明が行われている (Chen et al *Front Biosci*. 2004)。

(2) 細胞内シグナル伝達機構におけるリン酸化カスケードは、サイトカインなどの刺激により各種プロテインキナーゼが活性化され細胞が下流に情報を伝える有力なシステムである。Bmp による刺激は Smad 分子のリン酸化に関与し、骨・軟骨誘導作用があることは以前から分かっていたが、その下流に存在する骨・軟骨細胞分化を決定づけるシグナル分子についてはほとんどわかっていない。したがって、効率的な骨・軟骨分化を導入するためには、分化を決定する特異的シグナルを分子レベル、さらには個体レベルで理解する必要があり、そのためにはリン酸化シグナルで重要なプロテインキナーゼの同定と機能解析を行う必要がある。

2. 研究の目的

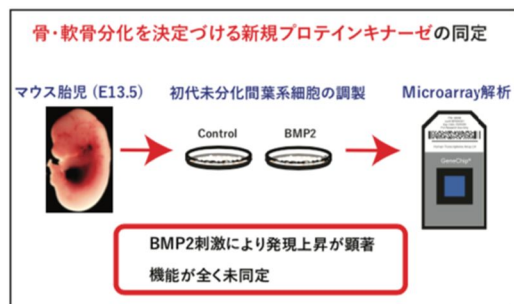
本研究では、まず骨・軟骨細胞の分化に重要な新規プロテインキナーゼを同定し、骨・軟骨細胞分化を制御するシグナルの詳細を分子レベル、さらには個体レベルで明らかにする。次に得られた知見に基づき、骨・軟骨形成を促進するプロテインキナーゼの活性化に関わる化合物、あるいはプロテインキナーゼの発現上昇に関わる遺伝子を決定する。そして得られた知見に基づいて、分子標的となりうるキナーゼ、リン酸化タンパク質を制御する因子を絞り込み、骨・軟骨分化を決定づけるシグナル伝達機構の詳細を明らかにする。最終的には、同定したプロテインキナーゼを標的とした効率的な骨・軟骨組織再生に向けた基盤的技術開発に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞・軟骨細胞分化を制御する新規プロテインキナーゼの同定

骨・軟骨細胞分化に関与する新規プロテインキナーゼの同定と機能解析を行う。未分化間葉系細胞を多く含み、多分化能を有する胎生 13 日目のマウス肢芽細胞を用いて、Bmp を処理することで発現の上昇するプロテインキナーゼを Affimetrix 社の Genechip を用いたマイクロアレイにより遺伝子発現解析を行う。その際、絞り込みの条件として Bmp によって発現上昇が顕著かつ機

能が全く未知であるものを検索し、同定したプロテインキナーゼの骨・軟骨分化に対する影響を検討する。細胞レベルの解析を行うためには、肢芽細胞に対して同定したプロテインキナーゼを過剰発現、または遺伝子ノックダウン後、骨・軟骨誘導培地にて ALP 染色、石灰化能の指標である Alizarin red 染色、軟骨基質を染色する Alcian blue 染色を行い、各細胞への分化能を検討する。



(2) 新規プロテインキナーゼの標的タンパク質の同定

次に同定したプロテインキナーゼの基質タンパク質を同定するため、3xFlag-tag を同定したプロテインキナーゼの N 末端に挿入した発現ベクターを作成し、肢芽細胞にレトロウイルスを用いて過剰発現させる。その後、回収したタンパク質の Lysate を抗 Flag 抗体を用いて精製を行い、プロテインキナーゼに結合するタンパク質を SDS-PAGE 後に質量分析装置 Orbitrap にてプロテオミクス解析を行い、基質の候補をスクリーニングし、シグナル伝達に必要なリン酸化タンパク質の同定を試みる

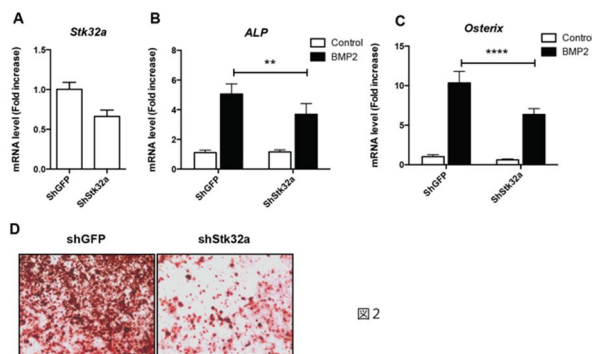
(3) マウス個体レベルでの新規プロテインキナーゼの機能解析

CRISPR/Cas9 を用いてプロテインキナーゼおよびその基質タンパク質を標的とした遺伝子ノックアウトマウスを作製し、軟骨形成を評価する。遺伝子の開始コドンの直下に、Stop コドンを含む短い 1 本鎖 DNA (ssODN) をノックインしたノックアウトマウスを作製し、個体レベルでの評価を行う。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞・軟骨細胞分化を制御するセリンスレオニンキナーゼ 32a の同定

上述した研究方法(1)に従って新規プロテインキナーゼの同定を行った。その結果 Bmp によって顕著に発現上昇し、機能が未知である遺伝子としてセリンスレオニンキナーゼ 32a (Stk32a) 遺伝子に着目した。Stk32a 遺伝子をマウス肢芽細胞に対して過剰発現させ、各種骨関連遺伝子の発現を指標に軟骨細胞分化能を検討したが、Stk32a の過剰発現による影響は見られなかった。一方、Stk32a の遺伝子ノックダウンにより ALP と Osterix の発現が低下することが明らかとなった。さらに骨・軟骨誘導培地にて石灰化能について検討した結果、Stk32a をノックダウンした細胞で著明な石灰化の抑制が観察された。(図 2)



(2) Stk32a 遺伝子ノックアウトマウスの骨表現系の解析

上述した研究方法(3)に従って、Stk32a の遺伝子ノックアウトマウスを CRISPR/Cas9 法にて作製した。Stk32a の機能を生体レベルにおいて解析を行うために、骨格標本を作成し骨表現系について野生型マウスと比較検討を行った。その結果、Stk32a ノックアウトマウスの骨表現系は上腕骨の内軟骨骨形成の軽微な遅延が観察されたが、その他の骨組織ではほとんど野生型との違いを見出すことができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura Riko, Hata Kenji, Takahata Yoshifumi, Murakami Tomohiko, Nakamura Eriko, Ohkawa Maki, Ruengsinpinya Lerdluck	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of Signal Transduction Pathways and Transcription Factors in Cartilage and Joint Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1340 ~ 1340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21041340	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------