

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17017

研究課題名(和文) Srcファミリー分子Hck活性化による軟骨細胞の増殖・分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of growth and differentiation control mechanism of chondrocytes by activation of Src family molecule Hck

研究代表者

松裏 恵子 (MATSUURA, Keiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・特任研究員

研究者番号：20770423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Runx2は、軟骨細胞の増殖と成熟に必要である。当研究室で、Runx2ノックアウト(ko)マウス由来の初期培養軟骨細胞にRunx2を導入、Runx2の標的遺伝子を探索し、誘導される遺伝子の1つとして造血細胞キナーゼHckが同定された。一方で、Srcキナーゼファミリー間で一部機能的な重複があることは知られているが、Hckが軟骨性四肢骨格で特異的に高発現している。この選択的な遺伝子発現とその生理学的な意義を理解するには、軟骨細胞増殖・分化の相関の分子背景を明らかにすることが必要である。本研究では、Hckのノックダウンシステムを用い、軟骨細胞の増殖・分化に対するHckの関与について解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨肉腫の病因および変形性関節症の骨棘形成におけるRunx2の標的遺伝子の関与を解明する必要がある。本研究の成果により、Hckは軟骨性骨格、特に胎児の四肢骨格で高度に発現し、その発現はRunx2によって制御されていることを強く示唆している。未熟な軟骨細胞におけるSpp1の発現は、Hckを介した炎症性シグナル伝達の活性化によって引き起こされた可能性が高い。Runx2は変形性関節症の病因に関与しており、機械的損傷によって誘発される炎症プロセスは心的外傷後変形性関節症の発症につながるため、Hckは変形性関節症の発症、特に骨棘形成にも関与している可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Runx2 is required for chondrocyte proliferation and maturation. In our laboratory, we introduced Runx2 into early cultured chondrocytes derived from Runx2 knockout (ko) mice, searched for the target gene of Runx2, and identified hematopoietic cell kinase Hck as one of the induced genes. On the other hand, although it is known that there is a partial functional overlap between the Src kinase family, Hck is specifically expressed in the cartilaginous limb skeleton. To understand this selective gene expression and its physiological significance, it is necessary to clarify the molecular background of the correlation between chondrocyte proliferation and differentiation. In this study, we analyzed the involvement of Hck in the proliferation and differentiation of chondrocytes using the Hck knockdown system.

研究分野：常態系口腔科学

キーワード：Hck Runx2 軟骨増殖 Wnt hedgehog

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Runx2/Cbfa1 下流遺伝子の一つである HCK は、該 Hck 遺伝子によりコードされるポリペプチドが 526 アミノ酸からなり、Hematopoietic cell kinase であり、血球系細胞で機能することが知られている。また、HCK タンパク質は、Src チロシンキナーゼファミリーに属する (Int J Biochem Cell Biol. 1995; 27(6): p551-63)。SH2/SH3 ドメインを持ちリン酸化によって活性化される。また、塩化水銀でも活性化される (Eur J Biochem. 2000, 267(24): p7201-8)。

HCK と骨及び/又は関節疾患の関連については、現在までのところ知られていない。HCK タンパク質は、細胞増殖や免疫反応での重要なシグナル伝達因子であって、gp130 (IL-6R や LIFR のシグナル伝達コンポーネント)からのシグナルで活性化される (Mol Cell Biol. 2001, 21(23):p8068-81)。HCK タンパク質は、Ras GAP や STAT5 などをリン酸化し、免疫グロブリンレセプターのシグナル伝達にも関与する (J Biol Chem. 1995, 16;270(24):14718-24; EMBO J. 2002, 1;21(21):p5766-74)。HCK タンパク質は、LAMA84 細胞において、imatinib mesylate で発現上昇及び/又は活性化される (Blood 2004, 15;104(2):p509-18)。また、HCK タンパク質は、骨髄腫などを増殖させる (Exp Hematol. 1997, 25(13):p1367-77)。これは、変形性関節炎の病態に、軟骨分化が関与している可能性を持つ。

2. 研究の目的

本研究では、活性型 Hck 発現の軟骨細胞の増殖・分化に対する作用及びそのシグナル経路を明らかにするとともに、活性型 Hck 発現により間葉系細胞に II 型コラーゲン、オステオポンチン、Mmp13 が同時発現する分子機序を明らかにする。

Hck が軟骨細胞で発現していることは確認しており、生理的にも軟骨細胞増殖・分化に関与している可能性がある。また、Src ファミリー内に機能重複があり、複数の Src ファミリー分子が軟骨細胞増殖・分化に関与している可能性もある。Runx2 は、軟骨細胞の後期分化を促進させるとともに、Ihh を誘導し軟骨細胞の増殖を促進する (Genes Dev. 2004, 18: 952)。従って、Runx2 による軟骨細胞の増殖促進作用に、Hck も関与している可能性がある。Hck は Mmp13 を誘導し、Runx2 も Mmp13 を誘導し変形性関節症の原因遺伝子である (Arthritis Rheum. 2006, 54: 2492)。従って、変形性関節症の発症・増悪にも、Runx2 による Hck の誘導が関与している可能性がある。

3. 研究の方法

野生型マウスと Hck tg マウス間で、四肢の RNA 発現をマイクロアレイで比較する。細胞増殖および細胞凝集に関与する遺伝子にフォーカスし、野生型マウスと比較し、Hck tg マウスで誘導される遺伝子を同定する。同定した遺伝子は、細胞増殖、凝集、軟骨細胞分化に関して機能解析を行う。

(1) Hck tg マウスの解析

母体に BrdU を注射し、胎生 15.5 日で組織切片を作成、BrdU 染色を行い、増殖細胞を定量する。

Col2a1, *Ihh*, *Col10a1*, *osteopontin* プロローベを用いた *in situ* hybridization を行い、軟骨細胞分化を調べる。

TUNEL 染色によりアポトーシスの頻度を定量する。

(2) *in vitro* での軟骨細胞、骨芽細胞の増殖・分化・アポトーシス

胎生 15.5 日の野生型マウスの四肢より軟骨細胞を採取し、増殖を調べるとともに、マイクロマ

ス培養を行い、軟骨細胞分化をアルシアンブルー染色で評価するとともに、TUNEL 染色によりアポトーシスを検出し、RNA を抽出後、軟骨細胞分化マーカーの発現を調べる。

(3) マイクロアレイ解析による間葉系細胞増殖・凝集に関わる Hck 標的遺伝子の探索

胎生 15.5 日の野生型マウスと *Hck* tg マウスの四肢より RNA を抽出する。これらを野生型マウスと *Hck* tg マウス間で、マイクロアレイ解析で比較する。

野生型マウスと比較して *Hck* tg マウスで 2 倍以上発現増強され、バックグラウンドより 10 倍以上のシグナル強度を示した遺伝子を選択する。選択された遺伝子は、リアルタイム RT-PCR で確認後、アノテーション情報、パスウェイ解析等によりクラス分けする。細胞増殖および細胞凝集にフォーカスし、野生型マウスと *Hck* tg マウス間で、四肢のサンプルで共通して発現増強が見られた遺伝子を優先して機能解析を行う。

4. 研究成果

Hck 軟骨特異的発現トランスジェニックマウス (tg) で間葉系細胞の凝集に及ぼす影響を調べた。軟骨細胞における *Hck* の機能を調査するために、*Col2a1* プロモーター/エンハンサーを使用して、恒常的に活性型の *Hck* (*Hck^{CA}*) を発現するトランスジェニックマウスを作成した。胎生 14.5 日目の *Hck^{CA}* tg は野生型(wt)と比較して、身体が小さく、四肢が太く短く、軟骨組織には分化異常が認められた。また、胎生 16.5 日目の *Hck^{CA}* tg の脛骨で、組織化されていない異常な細胞増殖により、正常な成長軟骨板が形成されず、長軸方向への成長が異常であった。さらに、胎生 18.5 日目の *Hck^{CA}* tg は wt と比較して、身体が小さく、腹部が突き出ており、四肢が太く短かった。それに加えて、鼻と上顎の間が分裂しており、鼻と上顎の融合過程が阻害されていた。骨格染色ではアリザリンレッドで染色される石灰化組織が減少、アルシアンブルーで染色される細胞外マトリックスが増加していることが明らかになった。HE 染色像においてはこのマウスの軟骨細胞は未熟であり、その周辺で間葉系細胞の侵入、増殖が認められた。内軟骨性骨で近位-遠位軸の方向性が失われており、異常な形状を示した。成長版は組織化されておらず、関節は癒合していた。*Col2a1* を発現する軟骨細胞は減少しており、骨は正常な過程を経ずに間葉系細胞の侵入と増殖を伴って形成されていた。BrdU 陽性の *Hck^{CA}* tg 軟骨細胞数が wt に比べ、有意に増加していた。一方、TUNEL 法ではアポトーシス陽性細胞数に明らかな差は認められなかった。さらに、*Hck* siRNA 導入細胞では、初代軟骨細胞での細胞増殖が抑えられた。*Hck^{CA}* tg からの後肢 RNA を使用したマイクロアレイおよびリアルタイム RT-PCR 分析では、Wnt (Wnt10b、Tcf7、Lef1、Dkk1) および hedgehog (Ihh、Ptch1、Gli1) シグナル伝達経路遺伝子が上昇することを見いだした。これらの結果は、Runx2 によって発現が制御される *Hck* が軟骨細胞で高発現し、*Hck^{CA}* が Wnt および hedgehog シグナル伝達経路を活性化し、アポトーシスを増加せず、軟骨細胞の増殖を促進することが示された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Viviane K S Kawata Matsuura, Carolina Andrea Yoshida, Hisato Komori, Chiharu Sakane, Kei Yamana, Qing Jiang, Toshihisa Komori	4. 巻 21
2. 論文標題 Expression of a Constitutively Active Form of Hck in Chondrocytes Activates Wnt and Hedgehog Signaling Pathways, and Induces Chondrocyte Proliferation in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21082682	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

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