

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～ 2010

課題番号：20591775

研究課題名 (和文) GSK3 β による骨軟骨代謝調節機構の解明研究課題名 (英文) Molecular mechanisms of regulation in bone and cartilage metabolism by GSK3 β

研究代表者

筑田 博隆 (CHIKUDA HIROTAKA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30345219

研究成果の概要 (和文)：

様々な生物学的過程において重要な役割を持つインスリン/IGF シグナルや古典的 Wnt シグナルに關与する GSK3 β に着目し、その骨・軟骨における機能と分子メカニズムの解明を目的とした。GSK3 β 遺伝子欠損マウスを用いて生理的条件下、病的条件下での骨・軟骨組織の解析およびマウス由来の骨芽細胞、軟骨細胞、各種細胞株を用いた GSK3 β の機能解析を行い、骨芽細胞分化および軟骨細胞分化にかかわる分子シグナルの詳細を明らかとした。

研究成果の概要 (英文)：

GSK3 β is known to be involved in insulin/IGF signal and canonical Wnt signal, which play important roles in various kinds of biological processes. This study investigated the molecular mechanisms of regulation in bone and metabolism by GSK-3 β . We performed the analyses of skeletal phenotype in GSK3 β deficient mice under physiological or pathological conditions and functional analyses using mouse primary osteoblasts, chondrocytes, and various cell-lines. We elucidated the molecular network around GSK3 β in osteoblast or chondrocyte differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

キーワード：GSK3 β 、Runx2、骨代謝、関節炎

1. 研究開始当初の背景

正常な骨組織は恒常的な骨形成・骨吸収のバランス調節によって維持されている。骨形成は主に骨芽細胞により、骨吸収は破骨細胞により行われているが、近年の分子生物的手法を駆使した研究により、骨芽細胞分化は bone morphogenetic proteins (BMPs)、Wnt、

hedgehog (Hh)やインスリン/insulin-like growth factor-I (IGF-I)といった多くのシグナル伝達系のシグナル分子とRunx2やosterixといった転写因子により空間的・時間的に複雑に制御されていることが判明してきた。

インスリンおよびIGF-Iは様々な細胞の増

殖・分化の調節因子であるが、骨・軟骨代謝においては強力な骨形成促進因子として知られている。ヒトの疾患の中にも、インスリン、IGF-Iが関与することにより骨代謝に異常を来すものが多くある。我々は難病に指定されている脊椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) 患者においてインスリン分泌反応性が亢進していることを報告している (*J Bone Joint Surg (Am)* 83: 1537, 2001)。一方、IGF-Iは骨形成的作用を有するサイトカインとして知られており、ヒトの骨中のIGF-I濃度は加齢とともに減少すること、高齢者において血中IGF-I濃度と骨量の間には正の相関があることが指摘されている。

インスリン/IGF-Iからのシグナルはインスリン受容体基質蛋白 (IRS)-1 および IRS-2 分子を介して PI3K および p38 MAPK 経路などに伝達され、さらに下流の分子が活性化されていく。我々は、IRS-1 ノックアウト (-/-) マウスの骨芽細胞、軟骨細胞においては MAPK 経路は正常であるが、PI3K 経路下流の Akt のリン酸化が障害されていることを報告した (*J Biol Chem* 279: 15314, 2004)。このことより骨・軟骨細胞の機能においては、この経路が重要な役割を果たしていることが示唆される。一方 Wnt は形態形成の誘導因子、細胞の極性決定因子、増殖・分化の調節因子であり、Wnt リガンドがその受容体 Frizzled と共役受容体である low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) や LRP6 に結合し Wnt シグナルが活性化されると、GSK3 β は不活性化される。通常、 β -catenin は GSK3 β によりリン酸化され、その細胞内レベルは負に制御されているが、GSK3 β の不活性化により細胞質に蓄積して核内移行することで標的遺伝子の転写が活性化される。近年この古典的 Wnt 経路は、発生段階のみならず、出生後の骨形成を促進していることが示された。まず LRP5 の機能喪失型変異体は、ヒトにおける骨粗鬆症・偽神経膠腫; osteoporosis-pseudoglioma (OPPG) の原因遺伝子であることが解明された。また、LRP5 ノックアウトマウスでも、骨芽細胞の増殖・分化の障害による骨量低下が示された。逆に、その機能亢進型変異体はヒト、マウスともに骨量増加を呈した。以上より、古典的 Wnt シグナルは骨形成を正に制御していると考えられている。しかしながら一方では、古典的 Wnt シグナルのターゲットである β -catenin の骨特異的ノックアウトマウスでは明らかな表現型はないとの報告もあり、Wnt シグナルが他のシグナルと相互作用しながら骨・軟骨細胞の機能を調節していることが示唆される。

GSK3 β は、糖代謝にかかわるセリン/スレオニンキナーゼとして同定されたが、現在では腫瘍形成、細胞生存や器官形成といった多くの異なった生物学的過程に関与していることが明らかとなっている。なかでもインスリン/IGF シグナル経路と古典的 Wnt 経路との両者において重要な役割を果たしている分子であり、これらの骨形成的シグナル経路をいずれも抑制的に制御することにより、骨形成を負に制御している可能性が考えられる。

骨・軟骨の分化や代謝において実際に GSK3 β が重要な役割を果たしていることを確認するために、Ontario Cancer Institute / Princess Margaret Hospital の James R. Woodgett 博士より GSK3 β のヘテロノックアウト (GSK3 β +/-) マウスの供与を受けて骨格系の解析を既に開始している (ホモノックアウト (GSK3 β -/-) マウスは胎生致死のため解析不可能)。また、我々が研究してきた複数の遺伝子改変マウスと、この GSK3 β +/- を交配してその骨を解析したところ、一部のマウスとの交配によって表現型が著明に変わることも確認しており、GSK3 β が骨・軟骨代謝において重要な役割を果たしている他の分子と相互作用してその機能を調節している可能性も示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この GSK3 β の骨・軟骨代謝における役割とその分子メカニズムを解明し、各種骨軟骨病態への関与を検討することである。

3. 研究の方法

GSK3 β +/- マウスを用いて骨軟骨組織における表現型を解析し、その解析に基づいた in vitro, ex vivo の実験から GSK3 β の骨・軟骨代謝に関するシグナルネットワークの解明を行う。具体的には、以下の3項目について検討した。

- 1) 生理的条件下での GSK3 β +/- マウスの骨・軟骨組織の解析
- 2) 病的条件下での GSK3 β +/- マウスの骨・軟骨組織の解析
- 3) 骨芽細胞、軟骨細胞における GSK3 β の上流および下流のシグナル分子の同定

4. 研究成果

- 1) 生理的条件下での GSK3 β +/- マウスの骨軟骨組織の解析

GSK3 β +/- マウスおよびそれぞれの同胞野生型マウス (WT) における長管骨および椎体について放射線学的解析を行い、その形状、大きさにおいては明らかな差を認めなかったものの、海綿骨量の有意な上昇を認めた

(図 1)。

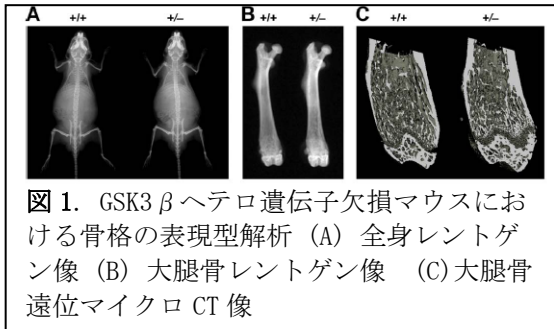


図 1. GSK3 β ヘテロ遺伝子欠損マウスにおける骨格の表現型解析 (A) 全身レントゲン像 (B) 大腿骨レントゲン像 (C) 大腿骨遠位マイクロCT像

組織学的解析では、骨芽細胞、軟骨細胞での発現を確認し、特に軟骨細胞では前肥大層から肥大層にかけての発現が確認された。また、骨形態計測では GSK3 β +/-マウスにおいて静的・動的骨形成マーカーおよび骨吸収マーカーの上昇を認め高代謝回転型の骨量増加が明らかとなった。成長板軟骨における表現型については GSK3 β +/-と WT マウス間で明らかな差を認めなかった。

ノックアウトマウス由来の骨芽細胞を単離し、同胞野生型由来の骨芽細胞との増殖・分化・生存能についての比較検討を行った結果、骨芽細胞の増殖・生存については明らかな差を認めなかったが、骨芽細胞の分化においては ALP 活性やアリザリンレッド染色の染色性の亢進およびリアルタイム PCR 上、I 型コラーゲン、オステオカルシンの発現上昇を認めた。さらに、骨芽細胞と造血系細胞の共存培養の結果、破骨細胞形成支持能については、ノックアウトマウス由来の骨芽細胞を用いたもので亢進が認められた。以上のことから、GSK3 β +/-マウスにおける骨量の増加は GSK3 β の骨芽細胞における cell-autonomous な作用が関与していると考えられた。

さらに、軟骨細胞においても同様にノックアウトマウスと同胞野生型のマウスより軟骨細胞を採取培養して、増殖能、分化能、基質産生能について検討を行った。その結果増殖能に明らかな差は認められず、軟骨細胞の分化・基質合成能については、II 型コラーゲンの発現量の軽度低下、X 型コラーゲンの発現量の軽度上昇を認めた。

2) 病的条件下での GSK3 β +/-マウスの骨軟骨組織の解析

尾部懸垂モデルによるメカニカルストレスの変化による骨量変化については、生理的条件下で骨量の増加があったものの、メカニカルストレスの変化に対する明らかな WT マウスとの差は認めなかった。

卵巣摘出モデルによる性ホルモンを介した骨粗鬆症化における GSK3 β の関与についての検討、変形性膝関節症モデルによる軟骨変性における GSK3 β の関与についての検討もおこなったが、GSK3 β 遺伝子欠損マウスと同胞野生型マウスの間では明らかな相違を認めなかった。

3) 骨芽細胞、軟骨細胞における GSK3 β の上流および下流のシグナル分子の同定

GSK3 β の上流シグナルとして知られる、Insulin, IGF シグナルおよび古典的 Wnt シグナルについて GSK3 β の転写活性の変化を確認した。現在のところ明らかな転写活性の変化は確認できず、GSK3 β の転写誘導に関わる因子とこれらシグナルとの関連については明とならなかった。

GSK3 β の下流分子として過去に報告のある各種転写因子群の中で、骨軟骨形成に関与が示唆されている分子について検討を行った。具体的には Runx2 について主に解析を行い、GSK3 β により Runx2 の発現、細胞内局在に変化はないものの、Runx2 のオステオカルシンプロモーターの転写活性が抑制されることを明らかとし、EMSA 法により GSK3 β による Runx2 のリン酸化が Runx2 の DNA 結合能を抑制することが明らかとなった。

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 16 件)

1. Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Kugimiya F, Higashikawa H, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions. *Arthritis Rheum* 62: 826-836, 2010. (査読有)
2. Shinoda Y, Kawaguchi H, Higashikawa A, Hirata M, Miura T, Saito T, Nakamura K, Chung UI, and Ogata N: Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. *J Cell Biochem* 109: 755-763, 2010. (査読有)
3. Kimura A, Inose H, Yano F, Fujita K, Ikeda T, Sato S, Iwasaki M, Jinno T, Ae K, Fukumoto S, Takeuchi Y, Itoh H, Imamura T, Kawaguchi H, Chung UI, Martin JF, Iseki S, Shinomiya K, and Takeda S: Runx1 and Runx2 cooperate during sternum morphogenesis. *Development* 137: 1159-1167, 2010. (査読有)

4. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, and Kawaguchi H: Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* 16: 678-686, 2010. (査読有)
5. Hojo H, Yano F, Ohba S, Igawa K, Nakajima K, Komiyama Y, Kan A, Ikeda T, Yonezawa T, Woo JT, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, and Chung UI: Title: Identification of oxytetracycline as a chondrogenic compound using a cell-based screening system. *J Bone Miner Metab* 28: 627-633, 2010. (査読有)
6. Kawaguchi H, Oka H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Sato K, Matsushita T, and Nakamura K: A local application of recombinant human fibroblast growth factor-2 for tibial shaft fractures: a randomized, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 25: 2459-2467, 2010. (査読有)
7. Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Takeshita K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type x collagen gene. *Arthritis Rheum* 60: 166-178, 2009. (査読有)
8. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: C/EBP β promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57^{Kip2}. *PLoS ONE* 4: e4543, 2009. (査読有)
9. Ushita M, Saito T, Ikeda T, Yano F, Higashikawa A, Ogata N, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Transcriptional induction of SOX9 by NF- κ B family member RelA in chondrogenic cells. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 1065-1075, 2009. (査読有)
10. Kan A, Ikeda T, Saito T, Yano F, Fukai A, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Screening of chondrogenic factors by a real-time fluorescence monitoring cell line ATDC5-C2ER: Identification of sorting nexin 19 as a novel factor. *Arthritis Rheum* 60: 3314-3323, 2009. (査読有)
11. Yamakawa K, Kamekura S, Kawamura N, Saegusa M, Kamei D, Murakami M, Kudo I, Uematsu S, Akira S, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Association of microsomal prostaglandin E synthase 1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis Rheum* 58: 172-183, 2008. (査読有)
12. Tamiya H, Ikeda T, Jung JH, Saito T, Jung YK, Kawaguchi H, Ohba S, Chung UI, and Choi JY: Analysis of the Runx2 promoter in osseous and non-osseous cells and identification of HIF2A as a potent transcriptional activator. *Gene* 416: 53-60, 2008. (査読有)
13. 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 UI: Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev Cell* 14: 689-699, 2008. (査読有)
14. 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 JR, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Phosphorylation of GSK-3 β by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic

differentiation of murine chondrocytes. *J Clin Invest* 118: 2506-2515, 2008. (査読有)

15. Sato S, Kimura A, Ozdemir J, Asou Y, Miyazaki M, Jinno T, Ae K, Liu X, Osaki M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kawaguchi H, Haro H, Shinomiya K, Karsenty G, and Takeda S: The Distinct role of the Runx proteins in chondrocyte differentiation and intervertebral disc degeneration: Findings in murine models and in human disease. *Arthritis Rheum* 58: 2764-2775, 2008. (査読有)
16. Shinoda Y, Ogata N, Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T, Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Krüppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 283: 24682-24689, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

1. Kawaguchi H: Therapeutic target molecules for cartilage degradation in osteoarthritis progression. System Biology and Drug Discovery. 2010. 2. 9 (Seoul, Korea).
2. Kawaguchi H: Molecular backgrounds of cartilage degradation during osteoarthritis progression. 2010 Anti-aging and Well-being International Symposium. 2010. 2. 19 (Daegu, Korea).
3. Kawaguchi H: Endochondral ossification signal: A potential therapeutic target for osteoarthritis. 2010 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2010. 9. 23-26 (Brussels, Belgium).
4. 川崎洋介、釘宮典孝、筑田博隆、池田敏之、齋藤琢、矢野文子、中村耕三、鄭雄一、川口浩: cGMP-dependent kinase II (cGKII)はGSK3 β をリン酸化・不活化することによって軟骨細胞の肥大分化を制御する. 第23回日本軟骨代謝学会. 2010. 4. 2-3 (鹿児島県医師会館、鹿児島島).
5. Kawaguchi H: Molecular backgrounds of cartilage degradation during osteoarthritis development. 第19回国際リウマチシンポジウム. 2010. 4. 22-25 (神戸ポートピアホテル、兵庫).
6. 川口浩: 骨粗鬆症の治療戦略 up-to-date: 骨折予防・骨強度の視点から. 第83回日本整形外科学会学術総会. 2010. 5. 27-30 (東京国際フォーラム、東京).
7. 川口浩: 変形性関節症 up-to-date - その診断、治療、そして分子メカニズム研究の最前線. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会. 2010. 10. 14-15 (国立京都国際会館、京都).
8. Kawaguchi H, Chikuda H, Kawasaki Y, Hofmann F: Cyclic GMP-dependent protein kinase II promotes chondrocyte hypertrophy and skeletal growth. 4th International Conference on cGMP. 2009. 6. 19-21 (Rosensburg, Germany).
9. Kawaguchi H: Transcriptional regulation of cartilage degeneration during osteoarthritis progression. The 2nd International Cartilage and Osteoarthritis Symposium. 2009. 10. 10 (Seoul, Korea).
10. Kawaguchi H: Molecular backgrounds of cartilage degeneration during osteoarthritis progression (Special Lecture: OARSI-KORS Co-sponsored Symposium). The 35th Annual Meeting of the Korean Orthopaedic Research Society. 2009. 10. 14 (Seoul, Korea).
11. 川口浩: 変形性関節症の診断と治療: 最近の進歩 (カトレア教育研修講演: Arthritis診断と治療 最新のトピックス). 第81回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2009. 4. 23-26 (グランドプリンスホテル新高輪、東京).
12. Kawaguchi H: Cartilage degeneration

during osteoarthritis progression.

第18回国際リウマチシンポジウム。
2009. 4. 23-26 (グランドプリンスホテル新高輪、東京)。

13. 川崎洋介、釘宮典孝、筑田博隆、中村耕三、鄭雄一、川口浩：cGKIIはGSK3 β をリン酸化することによって軟骨細胞の肥大分化を制御する。第82回日本整形外科学会学術総会。2009. 5. 14-17 (福岡国際会議場、福岡)。
14. 川口浩：変形性関節症の治療標的分子へのアプローチ。第82回日本生化学(シンポジウム「運動器形成・再生のための分子基盤」)。2009. 10. 21-24 (神戸国際会議場、兵庫)。
15. Kawaguchi H：Transcriptional regulation of osteoarthritis progression (Symposium: Update on Osteoarthritis: from Bench to Bedside -APLAR-OARSI Co-Sponsored Symposium). The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008). 2008. 9. 23-27 (Yokohama, Japan)。
16. 川口浩、岡敬之、村木重之、阿久根徹、馬淵昭彦、吉村典子、中村耕三：変形性関節症の疫学研究の現状と問題点：ROAD (Research on Osteoarthritis against Disability)プロジェクト (シンポジウム：変形性膝関節症のマネージメント -最新の臨床エビデンスとエキスパートオピニオン-)。第81回日本整形外科学会学術総会。2008. 5. 22-25 (北海道厚生年金会館、北海道)。

[図書] (計6件)

1. 川口浩：関節・軟骨疾患の分子医学：変形性関節症の治療標的分子の探索。BIO CLINICA (特集：骨・軟骨疾患の分子医学) 25 (1)：41-45, 2010。
2. 川口浩：インスリン・IGFと骨。CLINICAL CALCIUM (特集：ホルモンと骨粗鬆症 UPDATE) 19 (7)：1015-1025, 2009。
3. 川口浩：Osteovisual「変形性関節症における軟骨破壊のメカニズム」。Arthritis 16 (3)：149-153, 2009。

4. 川口浩：遺伝子変異マウスによる変形性関節症の病態解明へのアプローチ。The Bone (特集：変形性関節症の基礎と臨床) 23 (1)：35-40, 2009。

5. 川口浩：変形性関節症：研究・診療の現状と問題点。日本老年病学会雑誌(骨粗鬆症と変形性関節症：研究と診療の最前線) 46 (2)：121-127, 2009。

6. 川口浩：変形性関節症の治療標的分子の解明。骨のremodelingにおける Dickkopf-1 の役割。リウマチ科 (特集：変形性関節症の病態と治療 -最近の進歩) 39 (6)：498-505, 2008。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筑田 博隆 (CHIKUDA HIROTAKA)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30345219

(2) 研究分担者

川口 浩 (KAWAGUCHI HIROSHI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：40282660

武田 秀樹 (TAKEDA HIDEKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90456111

(3) 連携研究者

特になし