

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390416

研究課題名（和文）PTH受容体と $\beta$ カテニンの相互作用による骨形成促進機構に関する戦略的研究研究課題名（英文） $\beta$ -catenin regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signals and chondrocyte hypertrophy through binding to the intracellular C-terminal region of the receptor.

研究代表者

緒方 直史（OGATA NAOSHI）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10361495

研究成果の概要（和文）：

副甲状腺ホルモン(PTH)受容体のC末側細胞内ドメインに結合する蛋白質を網羅的に探索したところ、新たな結合蛋白として $\beta$ カテニンを同定した。軟骨様細胞株であるATDC細胞にGFP標識したPTH受容体を強制発現させると、PTH受容体とカテニンとの結合はPTH刺激によって減弱した。PTH受容体の段階的deletion、mutagenesisによって、C末側582-585の4アミノ酸が $\beta$ カテニンの結合に必須であることが示された。PTH刺激後の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は、 $\beta$ カテニンsiRNAおよびPTH受容体( $\Delta$ 582-585)変異体の強制発現によって消失したことから、PTHシグナル伝達に重要であることが明らかとなり、G $\alpha$ s/cAMPを抑制しG $\alpha$ q/Ca<sup>2+</sup>を促進して、そのシグナルを調節している可能性が確認された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the underlying mechanisms of action and functional relevance of  $\beta$ -catenin in chondrocytes, by examining the role of  $\beta$ -catenin as a novel protein that interacts with the intracellular C-terminal portion of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP) receptor type 1 (PTHR-1). The  $\beta$ -catenin-PTHR-1 binding region was determined with deletion and mutagenesis analyses of the PTHR1 C-terminus, using a mammalian two-hybrid assay. Physical interactions between these 2 molecules were examined with an in situ proximity ligation assay and immunostaining. To assess the effects of gain- and loss-of-function of  $\beta$ -catenin, transfection experiments were performed to induce overexpression of the constitutively active form of  $\beta$ -catenin (ca- $\beta$ -catenin) and to block  $\beta$ -catenin activity with small interfering RNA, in cells cotransfected with either wild-type PTHR1 or mutant forms (lacking binding to  $\beta$ -catenin). Activation of the G protein  $\alpha$  subunits G( $\alpha$ s) and G( $\alpha$ q) in the cells was determined by measurement of the intracellular cAMP accumulation and intracellular Ca(2+) concentration, while activation of canonical Wnt pathways was assessed using a TOPflash reporter assay. In differentiated chondrocytes,  $\beta$ -catenin physically interacted and colocalized with the cell membrane-specific region of PTHR-1 (584-589). Binding of  $\beta$ -catenin to PTHR-1 caused suppression of the G( $\alpha$ s)/cAMP pathway and enhancement of the G( $\alpha$ q)/Ca(2+) pathway, without affecting the canonical Wnt pathway. Inhibition of Col10a1 messenger RNA (mRNA) expression by PTH was restored by overexpression of ca- $\beta$ -catenin, even after blockade of the canonical Wnt pathway, and Col10a1 mRNA expression was further decreased by knockout of  $\beta$ -catenin (via the Cre recombinase) in chondrocytes from  $\beta$ -catenin-floxed mice. Mutagenesis analyses to block the binding of  $\beta$ -catenin to PTHR1 caused an inhibition of chondrocyte hypertrophy markers. As a conclusion,  $\beta$ -catenin binds to the PTHR-1 C-tail and switches the downstream signaling pathway from G( $\alpha$ s)/cAMP to G( $\alpha$ q)/Ca(2+), which is a possible mechanism by which chondrocyte hypertrophy may be regulated through the PTH/PTHrP signal independent of the

canonical Wnt pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 5,600,000  | 1,680,000 | 7,280,000  |
| 2010年度 | 3,000,000  | 900,000   | 3,900,000  |
| 2011年度 | 2,400,000  | 720,000   | 3,120,000  |
| 2012年度 | 2,500,000  | 750,000   | 3,250,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 13,500,000 | 4,050,000 | 17,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：細胞・組織、骨軟骨代謝、副甲状腺ホルモン、骨粗鬆症

### 1. 研究開始当初の背景

2007年度の厚労省国民生活基礎調査によれば、高齢者の要介護者の増加のみならず、家族間で介護する世帯のうち、高齢者が高齢者を世話する70歳以上の「老老介護」世帯の割合が初めて3割を超えていることが明らかになり、介護を必要としない健康寿命との差の増大、高齢者の要支援、要介護者の増加が問題となっている。要介護となる原因の一つに転倒などにより生じる骨折が挙げられ、これは骨粗鬆症による骨の脆弱性によるところが大きい。そのため骨粗鬆症の患者数の増大とともに、自立して生活できる年齢である健康寿命を延ばすためにも、骨粗鬆症治療対策が社会的急務となっている。骨粗鬆症による骨の脆弱性は、骨形成と骨吸収のバランスが壊れることで骨量減少を来し生じるが、それに対する骨粗鬆症治療は今まで骨吸収抑制療法がその中心であり、骨形成を促進する薬剤は臨床応用されていなかったが、近年PTHに強力な骨形成促進作用があることが明らかとなり、欧米ではヒト組み換えPTH(1-34)が初めての骨形成促進剤として臨床の現場で用いられようになった。しかしながら、PTHは作用時間によっては骨吸収促進に働くなど多彩な作用を持ち、未だその骨形成作用機序はほとんど解明されていないのが現状であり、より効率的で副作用の少ない骨形成促進作用薬の開発へつなげるためにも、その薬理効果の分子メカニズムの解明が切望されている。PTHはPTH受容体に結合後、受容体の細胞内部位にG蛋白、特にG $\alpha$ sとG $\alpha$ qの2種類が結合し活性化されることによって細胞内にその主なシグナルを伝えている。このG蛋白にはG $\alpha$ sとG $\alpha$ qの2種類があることが知られており、それぞれが独立したシグ

ナル伝達経路を有している。しかしPTHの骨組織に対する多彩な作用は、PTHがPTH受容体に結合後に2種類のG蛋白を介するシグナルが単に流れるというのみでは説明がつかない。また、PTH受容体は7回膜貫通型の受容体の一つで、受容体細胞内C末端が長いことからG蛋白質以外のシグナル分子が結合することが推察されており、実際NHERF-2 (Sodium-Hydrogen Exchanger Regulatory Factor-2)がPTH受容体結合蛋白として同定され、PTHのシグナルをG $\alpha$ q蛋白へ選択的に伝達させるように受容体と相互作用をしていることが報告された。新たに強力な骨代謝関連因子として近年注目を浴びている $\beta$ カテニンが、PTH受容体細胞内C末端に直接結合し、そのシグナルを変えている可能性があることを見だし、 $\beta$ カテニンがPTH受容体に直接結合することで、PTHシグナルを調節していることの可能性を明らかにした。PTHの骨形成シグナルは主にG $\alpha$ s蛋白シグナルを介していると考えられていることから、 $\beta$ カテニンとPTH受容体の相互作用がG $\alpha$ s蛋白シグナルを調節している事実は、PTHの骨形成シグナルに重要な関与があることが示唆される。本研究では、骨形成作用を持つPTHシグナルと、その受容体に結合すると思われる $\beta$ カテニンとの相互作用による骨代謝調節機構の全容を解明することとした。さらにはこれら相互作用による骨形成促進機構を応用した、より効果が強く副作用の少ないPTH関連骨形成促進剤の開発に結びつけることを目指した。

### 2. 研究の目的

副甲状腺ホルモン (PTH) に強力な骨形成作用があることが明らかとなってきたが、そ

の薬理効果の分子メカニズムは未だ十分に解明されていない。これまで我々は骨形成促進作用を持つ副甲状腺ホルモン(PTH)の受容体に、重要な骨代謝関連因子であるβカテニンが直接結合する事を明らかにしてきた。本研究ではその展開研究として、PTH受容体とβカテニンのクロストークのメカニズムを詳細に解明することにより、βカテニンとの相互作用によるPTHの新たな骨形成作用メカニズムの解明を目指し、新規のPTH関連骨形成促進薬の開発に結びつけることを目指した。具体的には以下の研究を計画した(図1)。

- 1) 骨芽細胞におけるβカテニンとの結合によるPTHシグナル伝達調整機構の解析
- 2) 骨芽細胞特異的βカテニン欠損 (conditional β-catenin KO) マウスに対するPTH間欠投与の効果
- 3) 骨芽細胞特異的変異型 PTH 受容体 (conditional ΔC-PPR KO) マウスの作成とその骨組織の解析
- 4) Wnt シグナルと PTH シグナルの相互作用による骨形成促進モデルの作成

### 3. 研究の方法

- 1) 骨芽細胞におけるβカテニンとの結合によるPTHシグナル伝達調整機構の解析、および骨芽細胞の増殖・分化への検討
  - ① 骨芽細胞におけるβカテニンと PTH 受容体との結合の確認；強制発現系と内在性での骨芽細胞におけるPTH受容体とβカテニンの結合の確認を行う。ヒト PTH 受容体に GFP (Green Fluorescence Protein) を結合させたコンストラクト (hPTH-GFP 受容体)、βカテニン結合部位を欠損させた変異型 PTH 受容体受容体およびβカテニンに rhodamine 蛋白を結合させたコンストラクト (βカテニン-rho) を組み込んだ発現ベクターを、未分化の MC3T3E1 細胞に導入し、蛍光顕微鏡で細胞膜上に緑色発色する PTH 受容体および赤色発色するβカテニンの発現を確認する。またこれら骨芽細胞に PTH 刺激を加え、蛍光共焦点顕微鏡を用いてその局在をリアルタイムで検討する。同時に内在性タンパク質での結合の確認も行う。分化誘導した MC3T3E1 細胞に PTH 刺激後、膜たんぱく質を分離回収、PTH 受容体特異的抗体およびβカテニン抗体を用いて、免疫沈降法およびウェスタンブロッティング法により蛋白-蛋白結合を確認する。MC3T3E1 細胞における PTH 刺激による内在性受容体と内在性βカテニンの結合の変化を検討する。
  - ② 恒常型活性型βカテニンおよびβカテニン siRNA 導入による PTH シグナルの検討；恒常活性型βカテニンアデノウイルスおよびβカテニン siRNA を導入した MC3T3E1 細胞を用いて、PTH 刺激により活性化される細胞内サイクリック AMP (cAMP) およびイノシトール

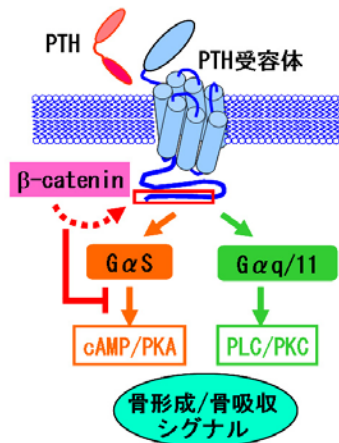


図1. βカテニンとPTH受容体C末端との相互作用によるシグナル調節

の影響を検討する。また同時にβカテニン結合部位欠損型 PTH 受容体による PTH 下流シグナルへの検討も行う。

- ③ 変異型 PTH 受容体による骨芽細胞の増殖・分化への影響；βカテニン結合部位欠損 PTH 受容体を有するレトロウイルスベクターを用いて MC3T3E1 細胞における同蛋白の恒常発現細胞株を樹立し、変異型 PTH 受容体恒常発現型 MC3T3E1 細胞株における増殖能・分化能を検討する。1) 骨芽細胞株の増殖能は [3H]-thymidine 取込能により、2) 骨芽細胞分化能・基質合成能・石灰化能をそれぞれ ALP 活性、Alizarin red 染色、von Kossa 染色によって評価し、変異型遺伝子非導入細胞をコントロールとして比較検討する。同時に、変異型 PTH 受容体恒常発現型 MC3T3E1 細胞株に PTH を間歇的および持続的に投与し、PTH 投与による骨芽細胞株の増殖能・分化能の比較検討を行う。

- ④ βカテニン依存性 PTH シグナル下流分子の同定；変異型 PTH 受容体導入細胞と非導入対象細胞に対して PTH 投与後の mRNA の比較を gene chip microarray を用いて行う予定である。9000 遺伝子を搭載した gene chip を使い、2.5 倍以上で発現増加、0.4 倍以下で発現減少という基準で行う。これにより、PTH シグナルの下流分子で、受容体へのβカテニン非結合により発現調節を受ける遺伝子の同定を試みる。

- 2) 骨芽細胞特異的βカテニン欠損 (conditional β-catenin KO) マウスに対する PTH 間欠投与の効果の検討

βカテニン遺伝子を flox で挟み込んだマウスは既に Karsenty 博士の研究室で作成され、東京大学ティッシュエンジニアリング部に供与されている。この flox マウスを、現在保有する骨芽細胞特異的に Cre を発現する I 型コラーゲン-Cre マウスと交配させて、骨芽細胞特異的βカテニン conditional KO マウスを作成する。Conditional β-catenin KO マウス作成後、PTH の間歇的皮下注射を行い、

ル三リン酸 (IP3) の蓄積量を測定する。これにより、骨芽細胞におけるβカテニンの gain of function および loss of function による PTH 下流シグナルである G α s、G α q

シグナルへの

PTH の骨組織に対する骨同化作用が認められるか検討する。具体的には8週齢、雄のコンディショナル KO マウスおよびその同胞 WT マウスに対して、一日一回の PTH 皮下注射 (80  $\mu$ g/kg 体重) を毎日、4 週間行い、その効果を大腿骨、脊椎 (L2-L5) の骨密度の変化を経時的に測定し比較する。骨密度は長幹骨では分割して測定し、骨幹端部・骨幹部における海綿骨・皮質骨それぞれについての比較検討もおこなう。また、マイクロ CT による 3 次元レベルでの微細形態学的検討を行い、量的解析のみならず、皮質骨・海綿骨の菲薄化、骨梁連続性等の質的変化の検討も行う。組織学的解析としては、4 週間の投与終了後に各骨組織を取り出し、標本作製し、骨芽細胞、破骨細胞に特異的な組織染色法 (ALP 染色、TRAP 染色等)、更にはカルセイン二重標識、Villanueva-Goldner 染色を用いた骨組織形態計測を行い、骨代謝動態を定量化する。また、PTH 投与、非投与での各マウスの骨および骨髄組織より mRNA を抽出し、 $\beta$  カテニンが発現していない状態での既に知られている PTH 下流のシグナル分子あるいは骨代謝関連分子の動態を検討する。

### 3) 骨芽細胞特異的変異型 PTH 受容体 (conditional $\Delta$ C-PPR KO) マウスの作成とその骨組織の解析

$\beta$  カテニン結合部位を欠損している PTH 受容体 (PPR) の *in vivo* での機能を解析するためには、同結合部位を欠損した PTH 受容体 ( $\Delta$ C-PPR) を発現する従来のノックインマウスを作成する必要がある。しかし、ノックインマウスは全身でその変異型受容体を発現するため、胎生期での異常などにより生まれにくい可能性があり、また骨芽細胞における  $\Delta$ C-PPR の機能を解析する事が出来ない。しかし、最新の Cre/loxP システムを用いることで、骨芽細胞特異的に  $\Delta$ C-PPR を発現するノックインマウスの作成が可能となった。マウス PTH 受容体に  $\beta$  カテニンが結合する部位は既に C 末端 582-587 アミノ酸であることがこれまでの検討で明らかとなっている。この部位を含む PPR の C 末端 550-585 アミノ酸をコードしているのはエクソン 6 である。最新の遺伝子組換え技術を応用し、このエクソン 6 を LoxP とネオマイシン遺伝子で挟み込むターゲティングベクターを構築し (図 3)、マウス ES 細胞に組み込んだ後、PPR エクソン 6 を LoxP で挟み込んだ遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (floxed マウス) を作成する。その後 Cre/loxP システムを用いて、骨芽細胞特異的に Cre を発現する I 型コラーゲン-Cre マウスと交配させることで、従来のノックインマウスと同様に骨芽細胞特異的に PTH 受容体の C 末端を欠損させるマウス (conditional  $\Delta$ C-PPR KO マウス) を作成することが可能である。これによって作出された

それぞれの floxed マウスを、現在保有する骨

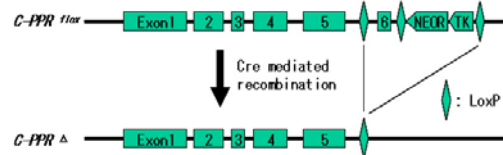


図3. C-PPR floxedコンストラクトの作成

芽細胞特異的に Cre を発現する I 型コラーゲン-Cre マウスと交配させて、conditional  $\Delta$ C-PPR KO マウスを作成する。初年度は、作成された conditional KO マウスが骨芽細胞特異的に遺伝子欠損を起こしているかを、既存の ROSA マウスと掛け合わせて作った新生児を用いて確認する。骨組織特異性を確認した後、conditional KO マウス、WT マウスの各週齢における長官骨の X 線撮影を行い、全体の骨密度を測定する。長管骨については長軸分面での骨密度を測定することにより骨幹端部・骨幹部における海綿骨・皮質骨それぞれについての比較検討をおこなう。また、マイクロ CT による 3 次元レベルでの微細形態学的検討を行い、皮質骨・海綿骨の菲薄化、骨梁連続性等の質的検討も行う。組織学的解析としては、骨芽細胞、破骨細胞に特異的な組織染色法 (ALP 染色、TRAP 染色等)、更にはカルセイン二重標識、Villanueva-Goldner 染色を用いた骨組織形態計測を行い、骨代謝動態を定量化する。同時に、組織学的検討においては、骨芽細胞の分化マーカーを用いて各々免疫組織染色、*in situ* hybridization の手法を用いて、骨芽細胞の分化の程度の検討を行い、 $\beta$  カテニンが結合しない変異型 PTH 受容体の骨芽細胞特異的な強制発現による骨代謝への影響を *in vivo* で調べる。また、3) と同様の手法で、conditional  $\Delta$ C-PPR KO マウスに PTH の間歇的皮下注射を行い、PTH の骨組織に対する骨同化作用が認められるか検討する

### 4. 研究成果

酵母 two-hybrid assay を用いて PPR の C 末端細胞内ドメインに結合する蛋白質を網羅的に探索したところ、新たな結合蛋白として  $\beta$  カテニンを同定した。HEK293 細胞および軟骨様細胞株である ATDC 細胞に GFP 標識した PTH 受容体を強制発現させると、PTH 受容体とカテニンとの結合は PTH 刺激によって減弱し、軟骨細胞でも同様の傾向があることを確認した。PTH 受容体の段階的 deletion, mutagenesis によって、C 末側 582-585 の 4 アミノ酸が  $\beta$  カテニンの結合に必須であることが示された。PTH 刺激後の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は、 $\beta$  カテニン siRNA および PTH 受容体 ( $\Delta$ 582-585) 変異体の強制発現によって消失したことから、PTH シグナル伝達に重要であることが明らかとなった。マウス軟骨前駆細胞 ATDC5 培養系に PTH (1-34) を投

与すると、軟骨肥大分化マーカーであるCOL10の転写活性 (luciferase assay) も発現レベル (retal-time RT-PCR) も抑制されたが、これらはいずれも恒常活性型βカテニンの過剰発現で回復した。この回復効果は PTH受容体 (Δ582-585) 変異体導入ATDC細胞においては見られなかった。

結合部位を欠損しているPTH受容体遺伝子をマウスの軟骨細胞に強制発現させるための遺伝子操作マウスの作成準備を開始し、コンストラクトが作成され、いくつかのラインが作成され軟骨での発現を確認したが、発現量が非常に少なく強制発現マウスモデルは作成することは出来なかった。骨芽細胞特異的βカテニン欠損マウスを作製し、骨芽細胞特異的に欠損しているかその発現パターンを解析したが、骨芽細胞での特異的な欠損が確認できず、現在別のラインの骨芽細胞特異的Creを発現するI型コラーゲン-Creマウスとの交配をさせており、発現パターンを解析中である。今後PTH間欠投与の効果を解析していく予定である。

以上よりマウスモデルの作成は進行中であるが、PTH/PTHrPシグナルとして、βカテニンがPTH受容体細胞内ドメインに直接結合し、その下流のGαs/cAMPを抑制しGαq/Ca<sup>2+</sup>を促進して、そのシグナルを調節している可能性が確認された。これらの結果はARTHRITIS & RHEUMATISMに発表した(図4)。

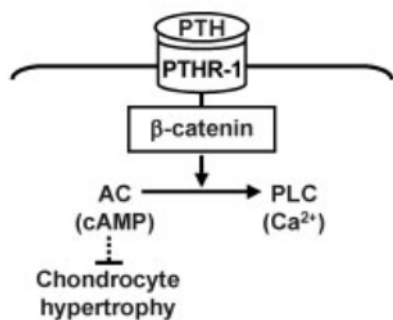


図4

## 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 2件)

1. Ogata N, Shinoda Y, Wettschureck N, Offermanns S, Takeda S, Nakamura K, Segre GV, Chung UI, Kawaguchi H. G alpha(q) signal in osteoblasts is inhibitory to the osteoanabolic action of parathyroid hormone. *J Biol Chem.*

286:13733-40, 2011. 査読有り

2. Yano F, Saito T, Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI, Kawaguchi H. β-catenin regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signals and chondrocyte hypertrophy through binding to the intracellular C-terminal region of the receptor. *Arthritis Rheum.* 65:429-35, 2013. 査読有り

[学会発表] (計 1件)

緒方直史: PTHによる骨形成促進作用の分子メカニズム. 日本骨代謝学会. 2010.7.21、大阪

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)  
○取得状況 (計 0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

緒方 直史 (OGATA NAOSHI)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 10361495

### (2) 研究分担者

筑田 博隆 (CHIKUDA HIROTAKA)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 30345219

矢野 文子 (YANO FUMIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号: 80529040

### (3) 連携研究者

なし