

平成 12 年度

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

研 究 報 告 書

高齢者の骨軟骨疾患の発症病理及び再生医学的治療
に関する研究

平成 12 年 3 月

主任研究者 渡辺 研

平成 12 年度 研究報告書 目次

1. 総括研究報告書	-----	1
高齢者の骨軟骨疾患の発症病理及び再生医学的治療 に関する研究	-----	2
国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 老年病研究部 運動・感覚機能研究室長		渡辺 研
2. 分担研究報告書	-----	7
1)加齢と幹細胞からの骨軟骨組織分化及び再生 に関する研究	-----	8
国立療養所中部病院 長寿医療研究センター 老年病研究部 運動・感覚機能研究室長		渡辺 研
2)骨軟骨組織形態形成における骨形成因子の 作用機構に関する研究	-----	12
東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞生物学 教授		澁谷 浩司
3)骨軟骨形成異常マウスの解析及び骨格系組織の 形成機構に関する研究	-----	18
神戸大学医学部 医動物学講座 教授		南 康博
(発表論文)	-----	21

1. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

高齢者の骨軟骨疾患の発症病理及び再生医学的治療に関する研究

主任研究者 渡辺 研

国立療養所中部病院長寿医療研究センター

老年病研究部 運動・感覚機能研究室長

研究要旨

高齢者の骨軟骨疾患の原因の一つである組織再生不良に着目し、細胞分化とシグナル伝達機能について研究を進めている。本年度では、骨芽細胞分化に関する転写調節機構において、新規分子の発見（渡辺）、骨形成因子（Bone Morphogenetic Protein: BMP）の新しいシグナル伝達・及び調節機構の解明（澁谷）、及び軟骨疾患動物モデルから、病態責任遺伝子であるチロシンキナーゼ受容体のシグナル伝達機構と病態との関わり（南）についての成果があった。

キーワード： BMP, FGF, Wnt, 骨芽細胞分化、間葉系細胞、
骨折モデル、疾患モデル動物

渡辺 研 国立療養所中部病院
長寿医療研究センター
老年病研究部
運動・感覚機能研究室長

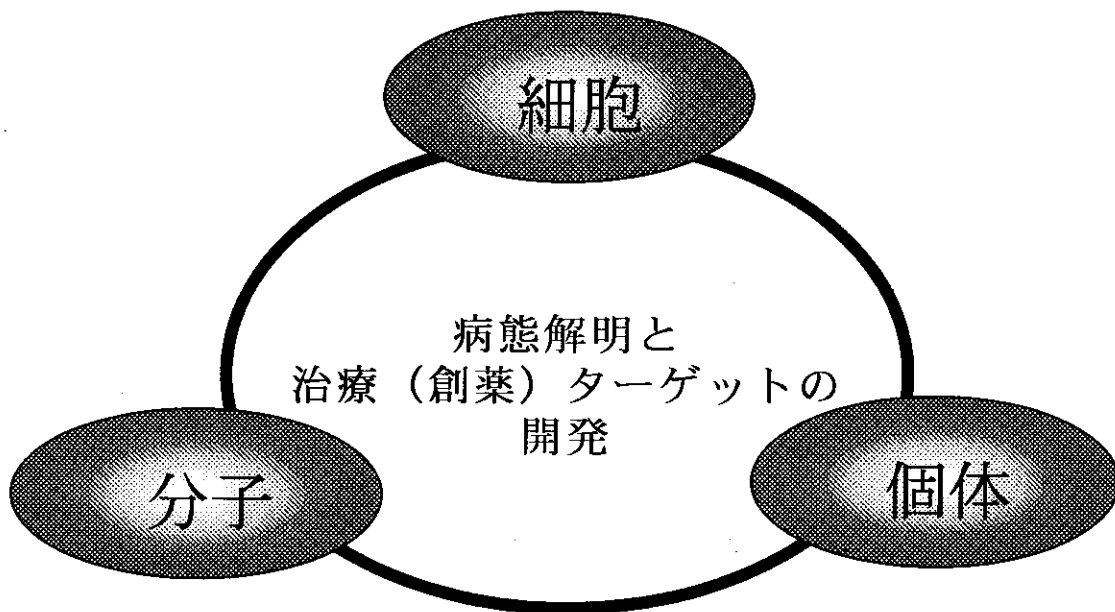
澁谷浩司 東京医科歯科大学
難治疾患研究所
分子細胞生物学
教授

南 康博 神戸大学 医学部
医動物学講座
教授

A. 研究目的

21世紀を迎える現在、我が国はすでに先進各国の中でもいち早く超高齢者社会へと突入しつつある。そういった中で、高齢者の運動能力を著しく阻害する骨軟骨疾患は、「寝たきり」の引き金であり、また、臥床状態の持続はさらに骨軟骨の構造的かつ機能的減衰を助長し、最悪のシナリオを作り出す原因であると考えられる。このような現状で、効果的な

間葉系幹細胞分化
骨芽細胞分化
軟骨細胞分化



細胞分化・形態形成シグナル分子

BMP
FGF
Wnt

軟骨疾患モデルマウス

マウス骨折モデル
老化マウス

骨軟骨組織の機能維持・回復技術の開発により、高齢患者が完全社会復帰とは言わずとも、「寝たきり」から脱却し、家庭生活に復帰できる状態にまで回復させることは、とりもなおさず超高齢者社会において極めて重要な課題の一つであるといえる。本研究では、骨粗鬆症や変形性関節症、ならびに骨折治癒遅延等、高齢者のかかえるさまざまな骨軟骨疾患が、加齢に伴う骨軟骨形成および再生能力の低下を特徴的な病理・病態とする点で共通していることに着目する。また、酵素阻害剤等の機能抑制系が中心である薬物療法の体系において、機能回復・機能賦活化を作用とする治療法の開発は新しいカテゴリーに属し、それだけに網羅的かつ高度な分子メカニズムの理解なくして実用性は望めない。そのため、本研究課題においては、分子レベルの基礎研究に重点を置くことにより、細胞分化から組織再生に至る分子基礎についてできるだけ多くの知見を得ることをめざす。そこで、組織形態形成・再生に関する分子機構の解明を *in vitro* から *in vivo* にわたる研究体制によって進めることにより、高齢者の骨軟骨疾患の病理・病態に対する分子レベルでの理解ならびに組織機能維持・回復に関する知見を得ることを目的とする。渡辺は骨格

系組織構築に必須である骨芽細胞の分化について、分子レベル・細胞レベルについて解析を行うとともに、加齢動物をもちいて、加齢と幹細胞の増殖・分化に関する知見を得ることを目的とする。澁谷は、骨軟骨組織形態形成に必須である骨形成因子 (BMP) のシグナル伝達機構の解明により組織構成細胞分化の分子メカニズムを明らかにする。南は、新規の骨軟骨形態形成疾患モデルならびに骨折モデルの病理・病態解析を行い、組織形態形成に関する情報を得る。骨折モデルを用いた組織修復機構の研究は、組織再生から機能回復を導くといった新しい再生医学の基礎となることが期待される。本研究では、骨軟骨組織維持機構の解明は、予防医学的にも有効であると考えられ、超高齢社会を迎えて、高齢者の生活・医療・福祉に貢献するものと考えられる。

B. 研究方法

①骨芽細胞分化に関する研究

骨芽細胞分化過程において、BMP により発現誘導される転写因子 *Dlx5* の機能調節のメカニズムを知るため、*Dlx5* を囿として、*yeast two hybrid screening* により、*Dlx5* と相互作用する分子群の単離を行った。また、単離したクローンについて、全長

cDNA を単離し、発現ベクターに組み込み、細胞での結合試験および転写実験に用いた。また、cRNA プロンプを作製し、*in situ* hybridization 法により、組織発現部位の検索を行った。

②BMP シグナルに関する研究

BMP 受容体に結合し、BMP シグナル調節に関わっていると考えられる BRAM1 について、データベース検索によりモデル動物である線虫 (*C. elegans*) の BRAM1 ホモログを単離した。個体レベルでの機能を解析するため、変異体の作製と二重鎖 RNA 阻害実験を行った。

③軟骨組織形態形成に関わる因子に関する研究

受容体型チロシンキナーゼである Ror1 と Ror2 の交配により、ダブルノックアウトマウスの作製を行い、骨軟骨染色など、病理組織学的解析を行った。また、yeast two hybrid screening を行い、Ror シグナルに関わる因子の同定を行った。

(倫理面への配慮)

平成 12 年度の本研究課題では、ヒトあるいはヒト由来の組織を用いた研究を行っていない。また、動物実験は、各所属施設の動物実験施設指針等に則り、組織材料ならびにモデル等、動物愛護上の配慮をもって行った。

C. 研究結果と考察

骨芽細胞分化に関する研究では、骨芽細胞分化および骨芽細胞機能において重要な役割を担う Dlx5 の機能調節因子として、新規分子 Dlxin-1 を単離した。Dlxin-1 は、骨格系ならびに神経系に発現が限局する Dlx5 とは異なり、むしろ広く組織に分布しており、間葉系培養細胞株では、骨髄由来ストローマ細胞 ST2, 筋芽細胞 C2C12, 間葉系未分化細胞 10T1/2, 軟骨細胞 ATDC5, 骨芽細胞 KUSA/A1, 前骨芽細胞 MC3T3-E1 等、調べたほとんどの細胞で発現が認められた。そこで、Dlxin-1 が Dlx5 以外の Dlx/Msx ファミリーの機能調節に関わっている可能性が考えられたため、結合試験により確認したところ、やはり、Dlx7 や Msx2 との結合が検出され、Dlxin-1 は、Dlx/Msx ファミリーのホメオドメイン転写因子のユニバーサルな調節因子である可能性が示唆された。

BMP シグナルに関する研究では、データベース検索の結果、2 種類の BRAM1 の線虫ホモログを単離し、それぞれ、cBRA1 および cBRA2 と命名した。cBRA1-GFP を用いて、組織発現分布を調べたところ、DAF-1 の発現とよく一致することから、線虫 TGF- β シグナルである daf シグナルへ

の関与が示唆された。そこで、cBRA1 null 変異体を作製し、daf シグナル経路に関わる遺伝子群の変異体との二重変異体を作製することにより、表現型から daf/TGF- β シグナルへの関与について検討した。その結果、cBRA1 は、遺伝学的に受容体下流で機能し、Smad の上流でシグナル抑制的に働いていることを見いだした。実際、生化学的にも、受容体 DAF1 と cBRA1 の特異的な結合も確認された。cBRA1 の線虫 daf シグナルでの機能について、in vivo および in vitro で明らかとなった。

軟骨組織形態形成に関わる因子に関する研究では、受容体型チロシンキナーゼである Ror2 のノックアウトマウスを解析し、Ror2 が口腔顎顔面領域の形態形成に重要であることを明らかにした。Ror1/Ror2 のダブルノックアウトマウスを作製、解析し、Ror1/Ror2 が協調的に骨格系の形態形成に重要な役割を担うことが明らかとなった。さらに、骨折の治癒過程で Ror1/Ror2 の発現誘導を見いだし、組織修復・再生における機能があることが推測された。また、未同定であった Ror1/Ror2 のリガンドについての検討で、Ror2 のリガンド候補分子として、Wnt5a を同定した。

D. 結論

骨軟骨形成過程において極めて重要であると考えられている BMP シグナルの下流で骨芽細胞分化に関わる新規転写調節因子を単離するとともに、その BMP シグナルを受容体下流において制御する新規分子群 cBRA1/cBRA2 を見いだした。また、骨格形態形成に必要である Ror1/Ror2 が、BMP シグナル同様、重要であり、また、BMP シグナルとのクロストークが見いだされている Wnt シグナルとの関与について見いだした。

E. 健康危険情報

本年度、主任および分担研究者において該当なし。

F. 研究発表

本項目に関しては、分担研究報告と重複するため、分担研究報告および添付した発表論文を参照されたい。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

2. 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

加齢と幹細胞からの骨軟骨組織分化及び再生に関する研究

主任研究者 渡辺 研

国立療養所中部病院長寿医療研究センター

老年病研究部 運動・感覚機能研究室長

研究要旨

骨芽細胞は間葉系幹細胞より、さまざまな因子により誘導される。本研究課題では、骨軟骨細胞分化ならびに再生という点から、骨芽細胞分化に着目し、骨芽細胞分化・機能に重要な働きがあると考えられている転写因子 Dlx5 の機能調節を行う新規分子 Dlxin-1 を単離した。

A. 研究目的

高齢者の骨軟骨疾患、とりわけ骨粗鬆症と変形性関節症は、骨代謝ならびに軟骨代謝異常であり、組織再生不良がその大きな要因と考えられる。このような疾患に対する再生医療を考える場合、ドナー細胞 (Seed) とレシピエントの環境 (Soil) がいかに組織再生に対応しうるかが一つの大きな問題と考えられる。しかしながら、実際は培養条件や BMP 添加などで骨芽細胞誘導がなされているものの、Seed/Soil を考えるとより効果的な誘導条件の情報が必要であり、その元となる骨芽細胞の分子機構をより詳細に解明・記述することが、基

礎研究として重要と考える。本研究では、骨芽細胞分化とそれを誘引するシグナルの分子レベルの基礎研究に重点を置くことにより、分化誘導の分子基礎についてできるだけ多くの知見を得ることをめざしている。本年度においては、BMP 作用により発現誘導され、骨芽細胞分化ならびに骨芽細胞機能と密接な関係のある転写因子 Dlx5 の作用に注目し、研究を行った。

B. 研究方法

Dlx5 の分子機能を明らかにするために、Dlx5 の DNA 結合ドメインを、yeast GAL4 遺伝子の DNA 結合ドメ

イン (GAL4DBD)と入れ替え、Dlx5 の転写に対する影響を、GAL4 認識エレメントを含むレポータ (pG5-luc) により調べた。Dlx5 転写活性化ドメインを bait として、yeast two hybrid screening を行い、転写活性に関わる Dlx5 結合分子の検索を行った。得られたクローンのうち、7 個の独立したクローンがオーバーラップしてコードしている未知遺伝子を Dlx5BP2 として単離した。全長 cDNA は、骨芽細胞より RT-PCR 法及び 5'-RACE 法により単離し、発現ベクターに組み込み実験に供した。発現研究では、ノーザンプロット解析ならびに in situ hybridization 法により解析した。

C. 研究結果

Dlx5 の応答配列 (DlxRE) およびそれに変異を加え反応性をなくした negative control のレポーターを Dlx5 が発現しない P19 細胞に Dlx5 とともに導入したところ、Dlx5 と DlxRE を一緒に加えたときのみ転写活性化が見られた。そこで、Dlx5 の N 末端部分を GAL4DBD との融合タンパクとして発現させると、GAL4DBD 特異的なレポータ pG5-luc の活性化が検出された。この転写活性化領域を bait として、yeast two hybrid screening を行い、新規分子を単離した。この

全長 cDNA を単離し、塩基配列を決定したところ、775 アミノ酸からなる ORF を含んでいることがわかり、Dlx5 interacting protein から、Dlxin-1 と命名した。Dlxin-1 の中央部分、およそ 150 アミノ酸にわたり、WQXPXX という 6 アミノ酸を基調とした繰り返し配列が見いだされ、その部分に最短のクローンが存在したことから、この繰り返し配列が Dlx5 の結合領域であると推測された。ノーザン解析及び in situ hybridization による発現解析では、胎生 7 日齢から胎児期全般に発現が認められ、成体でも脾臓や骨髄を除く、広い組織分布を示した。指の形成過程では、軟骨とともに、指の軟骨の周りを取り囲む間葉系細胞層に強い発現が認められた。結合試験では、Dlx5 のみならず、Dlx7 や Msx2 との結合が検出され、Dlxin-1 それ自身も、homodimer (homomultimer) を形成していることが推測された。内在性 Dlxin-1 発現が低い HT1080 細胞を用い、転写活性化の実験を行ったところ、Dlx5 依存的転写が、Dlxin-1 用量依存的に活性化した。また、Dlx5 結合領域のみを発現させることで、Dlx5 依存的転写活性化が抑制された。

D. 考察

Dlx5 は、骨芽細胞分化および骨芽細胞機能に重要な働きがあるとの報告があるものの、その分子機能においては不明であった。本研究で、Dlx5 自体は、転写活性可能を有す転写因子であることが明らかとなった。しかしながら、Dlx5 KO マウスの表現型が最近報告され、骨芽細胞後期分化マーカーでもあるオステオカルシンの発現が上昇していたことから、Dlx5 は、オステオカルシン遺伝子発現に対して負の制御を行っている可能性が示された。現段階で、Dlx5 が直接、オステオカルシン遺伝子プロモータに作用して転写抑制しているかどうか不明であるが、本研究での知見から、おそらく、Dlx5 とオステオカルシン遺伝子発現には、その抑制に関わる分子の存在や Dlx5 欠損による二次的関与の可能性が考えられた。新規分子 Dlxin-1 は、Dlx5 発現部位だけでなく広く存在することや、Dlx7 や Msx2 など他のホメオドメインタンパクとの結合が見られたことから、この Dlx/Msx ファミリーにユニバーサルな調節因子であることが示唆された。現在、この Dlxin-1 の機能について、KO マウス作製により検討を進めている。

E. 結論

本年度の研究より、永らく不明であった Dlx5 の分子機能に関して、Dlx5 自体は転写活性化能を有す転写因子であることが明らかとなった。また、その転写活性化に関わる新規分子 Dlxin-1 を単離した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Kanematsu, T. Sato, H. Takai, K. Watanabe, K. Ikeda, and Y. Yamada. Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells. *J. Bone Miner. Res.* (2000) 15:1321-1329

K. Hagihara, K. Watanabe, J. Chun, and Y. Yamaguchi. Glypican-4 is an heparan sulfate proteoglycan expressed in neural precursor cells. *Dev. Dyn.* (2000) 219:353-367

S. Inouye, K. Watanabe, H. Nakamura, and O. Shimomura. Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilorostri*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase. *FEBS*

Lett. (2000) **481**:19-25.

Y. Masuda, A. Sasaki, H. Shibuya, N. Ueno, K. Ikeda, and K. Watanabe.

Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J. Biol. Chem.* (2001) **276**:5331-5338.

A. Sasaki, Y. Masuda, Y. Ohta, K. Ikeda, and K. Watanabe. Filamin associates to Smads and regulates the receptor mediated signaling. *J. Biol. Chem.* (2001) **276** *in press*

T. Sato, T. Shibata, K. Ikeda, K. Watanabe. Generation of bone resorbing osteoclasts from B220-positive cells: Its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. *J. Bone Miner. Res.* (2001) **16** *in press*

2. 学会発表

佐々木文、増田芳子、池田恭治、渡辺 研 Dlx5 結合タンパク (Dlxin-1) と RING フィンガータンパクの相互作用 第 23 回日本分子生物学会年会 平成 12 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

骨軟骨組織形態形成における骨形成因子の作用機構に関する研究

分担研究者 澁谷 浩司 東京医科歯科大学難治疾患研究所教授

研究要旨

これまで我々は骨形成因子（BMP）のレセプターに結合する因子としてヒト BRAM1 を単離してきた。本年度は、その線虫ホモログ（cBRA1）を単離し遺伝学的解析を行った結果、線虫の TGF- β シグナル（daf シグナル）経路において cBRA1 はレセプターの下流で、かつ Smad の上流で抑制因子として機能していることを明らかにした。さらに cBRA1 のファミリーである cBRA2 を単離し、解析を進め、この分子は線虫のもう一つの TGF- β シグナルである sma シグナルに関与することを明らかとした。

A. 研究目的

TGF- β ファミリーに属する増殖因子は、細胞の増殖・分化・形態形成など様々な細胞機能の調節因子である。多くの増殖因子は細胞内にシグナルを伝えた後、何らかのメカニズムによってそのシグナルは抑制されることが知られており、TGF- β ファミリーはその多様な生理作用からシグナルの on/off に緻密な制御機構が存在すると考えられている。特にそのシグナル前後での抑制機構を知ることは重要な課題となっている。

また TGF- β ファミリーの多様な生理作用からこれらが多くの疾患発症に

関与していることが示されており、TGF- β シグナル伝達の分子機構を解明することが重要課題となっている。本研究は生物の発生や分化、細胞移動、形態形成に関与する細胞外因子、細胞接着因子等のシグナル伝達因子、転写因子も含めた発生生物学的、分子生物学的な分子機構の解明に結びつくものであり、これら分子の異常という視点から疾患の原因を考察することにおいて重要であり、社会的意義は計り知れない。

これまでに我々は骨形成因子（BMP）のレセプターに結合する因子としてヒト BRAM1 を単離した。しかしながら、BRAM1 の分子機能は不明であ

った。そこで本研究では BRAM1 の線虫相同遺伝子 cBRA1、2 を単離し、解析を進め、このシグナル機構を明らかにし、BMP シグナル伝達機構の詳細な解明を目的とする。

B. 研究方法

データベースよりヒト BRAM1 の線虫相同遺伝子を見出し、cBRA1、2 遺伝子を得た。それぞれの GFP 融合遺伝子を構築し、発現領域を観察した。また、TC-1 を用いた遺伝子破壊法により cBRA1 変異株を得、線虫 TGF- β シグナルである daf シグナルや sma シグナルに属する変異株との二重変異株を作製した。さらに cBRA1、2 遺伝子に対して二重鎖 RNA 阻害実験 (dsRNAi) を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトあるいはヒト由来の組織等を用いた研究は現在のところ行っていない。また動物実験は東京医科歯科大学動物実験指針に基づいて行っている。

C. 研究結果

線虫では DAF-7 をリガンドとする daf シグナル伝達経路が耐性幼虫への移行を調節しており、DBL-1 をリガンドとする sma シグナル伝達経路が主に体長を調節していることが明らかになっている。cBRA1-GFP の発現は

神経系の組織で強く、タイプ I レセプターである DAF-1 に酷似していたことから daf シグナル伝達経路への関与が示唆された。そこで Tc-1 を用いた遺伝子破壊法により cBRA1 Null 変異株を作製し、daf-1, daf-7 等の daf シグナル伝達経路に属する変異株との二重変異株を作製し、耐性幼虫形成率を測定したところ、有意にその割合が減少し、cBRA1 はレセプターの下流で、かつ Smad の上流で抑制因子として機能していることを明らかにした。また cBRA1 はタイプ I レセプターである DAF1 と特異的に結合することも確認された。

cBRA2 は cBRA1 のアミノ酸配列と 53% の相同性を持ち、特に C 末端において保存されていた。cBRA2-GFP は咽頭筋および腸細胞において強く発現していた。cBRA2 の二重鎖 RNA 阻害実験 (dsRNAi) を行った結果、Lon(long) の表現型を示した。また cBRA2 および cBRA1 の二重鎖 RNA 阻害実験を行ったところ、さらに強い Lon の表現型を示した。さらに cBRA2 はタイプ I レセプターである SMA6 と特異的に結合することも確認された。

D. 考察

cBRA1 および cBRA2 はヒト BRAM1 と特に C 末端側で保存されていた。

この領域は zinc finger モチーフを含み、レセプターとの結合に必要であると考えられた。cBRA1 Null 変異株と daf-1, daf-7 等の daf シグナル伝達経路に属する変異株との二重変異株の実験より、耐性幼虫形成率の割合が減少したことから、cBRA1 は DAF7 TGF- β シグナル伝達経路において抑制因子として働くと考えられる。また、cBRA2 の二重鎖 RNA 阻害実験を行ったところ、Lon(long)の表現型を示したことから cBRA2 は線虫の体長を調節する DBL1 TGF- β シグナル伝達経路において抑制因子として働く可能性が示唆された。さらに cBRA2 および cBRA1 の二重鎖 RNA 阻害実験を行ったところ、より強い Lon の表現型を示したことは cBRA1 も DBL1 TGF- β シグナル伝達経路において抑制因子として働く可能性を示唆している。現在、cBRA2 遺伝子欠損変異株の単離を行っており、今後、より詳細な解析を進めていきたいと考えている。

E. 結論

骨形成因子 (BMP) のレセプターに結合する因子ヒト BRAM1 の線虫ホモログ (cBRA1) を単離し遺伝学的解析を行った結果、線虫の TGF- β シグナル (daf シグナル) 経路において cBRA1 はレセプターの下流で、かつ

Smad の上流で抑制因子として機能していることを明らかにした。さらに cBRA1 のファミリーである cBRA2 を単離し、解析を進め、この分子は線虫のもう一つの TGF- β シグナルである sma シグナルに関与することを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishita, M., Hashimoto, M. K., Ogata, S., Laurent, M. N., Ueno, N., Shibuya, H.* and Cho, K. W. Y. (2000). Interaction between Wnt and TGF- β signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* **403**, 781-785.

Takatsu, Y., Nakamura, M., Stapleton, M., Danos, M. C., Matsumoto, K., O'Connor, M. B., Shibuya, H. and Ueno, N. (2000). TAK1 participates in c-Jun N-terminal kinase signaling during *Drosophila* development. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3015-3026.

Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J. and Matsumoto, K. (2000). TAB2, a novel adaptor

protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol. Cell* 5, 649-658.

Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K. and Taga, T. (2000). BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J. Biol. Chem.* 275, 17647-17652.

Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H. and Akiyama, T. (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel β -catenin-interacting protein. *Genes Dev.* 14, 1741-1749.

Hanafusa, H., Masuyama, N., Kusakabe, M., Shibuya, H. and Nishida, E. (2000). The TGF- β family member *derrière* is involved in regulation of the establishment of left-right asymmetry. *EMBO Rep.* 1, 32-39.

Masuda, Y., Sasaki, A., Shibuya, H., Ueno, N., Ikeda, K. and Watanabe, K. (2001). Dlxin, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its

transcriptional function. *J. Biol. Chem.* 276, 5331-5338.

2. 学会発表

藤田恵理子、神保敦、後藤由希子、澁谷浩司、川畑正博、桃井隆. BMP-4 とレチノイン酸の協調作用による P19EC 細胞の細胞死とカスパーゼ活性化の分子機構 日本癌学会年会 平成 12 年 10 月 4 日

中村勉、多胡賢一、西田満、村田陽二、足達俊吾、大和田進、森下靖雄、澁谷浩司、秋山徹. Wnt シグナル伝達経路の新たな制御因子 ICAT の同定およびその作用機構 日本癌学会年会 平成 12 年 10 月 6 日

田賀哲也、木村直紀、松尾律子、澁谷浩司、中島欽一. BMP2 の TAK1/p38 経路を介したアポトーシス誘導シグナルの Smad6 による阻害機構 日本癌学会大会 平成 12 年 10 月 6 日

澁谷浩司. Wnt シグナルと形態形成機構 日本癌学会年会 平成 12 年 10 月 6 日

山条秀樹、竹田潔、改正恒康、澁谷浩司、宮崎純一、審良静男. TAB2(TAK1 binding protein 2)遺伝子欠損マウスの作製と解析 日本免疫

学会年会 平成 12 年 11 月 15 日

須澤美幸、高田伊知郎、後藤由季子、澁谷浩司、松本邦弘、柳沢純、加藤茂明. NIK からのシグナルと PPAR γ 転写制御機構に及ぼす負のクロストーク 日本分子生物学会年会 平成 12 年 12 月 15 日

石谷太、辻順、澁谷浩司、久本直毅、松本邦弘. Wnt シグナル伝達系を制御する TAK1-NLK MAP キナーゼカスケード 日本分子生物学会年会 平成 12 年 12 月 15 日

中村勉、多胡賢一、西田満、兵頭純子、村田陽二、足達俊吾、大和田進、森下靖雄、澁谷浩司、秋山徹. Wnt シグナル伝達経路の新たな制御因子 ICAT の同定とその作用 日本分子生物学会年会 平成 12 年 12 月 16 日

漆山誠一、久本直毅、辻順、澁谷浩司、松本邦弘. Wnt シグナル伝達経路に参与する新規プロテインキナーゼ WAK1 日本分子生物学会年会 平成 12 年 12 月 13 日

兵頭純子、松本邦弘、上野直人、澁谷浩司. Wnt シグナル伝達系に関する xNLK のアフリカツメガエルを用いた機能解析 日本分子生物学会

年会 平成 12 年 12 月 13 日

菅原桂、森田清和、上野直人、澁谷浩司. BMP receptor associated molecule (BRAM) と相互作用し C. elegans 体長調節に関わる新規分子 BRAM interacting protein (BIP) の解析 日本分子生物学会年会 平成 12 年 12 月 13 日

門前幸志郎、廣井透雄、久藤純代、澁谷浩司、川畑正博、宮園浩平、石井俊輔、矢崎義雄、永井良三、小室一成. 心筋細胞分化における Smad、TAK1 および ATF-2 の役割 日本分子生物学会年会 平成 12 年 12 月 16 日

小松義広、竹田直樹、安居輝人、宮戸健二、松本邦弘、上野直人、澁谷浩司、山田源. マウス TAB1 遺伝子の単離、発現解析、遺伝子欠損マウスの解析 日本分子生物学会年会 平成 12 年 12 月 16 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
なし。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

骨軟骨形成異常マウスの解析及び骨格系組織の形成機構に関する研究

分担研究者 南 康博 神戸大学医学部教授

研究要旨

Ror1, Ror2 遺伝子ノックアウトマウスの解析により、Ror2 が口腔顎顔面領域の形成過程において重要な役割を担うこと、及び Ror1, Ror2 が協調的に作用することにより正中部の骨軟骨系の形成過程に関わることが明かとなった。さらに、Ror シグナル伝達系と Wnt シグナル伝達系のクロストークの可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々が独自に作製した新規受容体型チロシンキナーゼ Ror1, Ror2 遺伝子ノックアウトマウスを骨軟骨形態形成の疾患モデルとして用い、詳細な病理・病態解析を行うとともに、分子・細胞レベルでの解析を行うことにより、骨軟骨形成過程における Ror1, Ror2 を介するシグナル伝達機構の解析を行う。

B. 研究方法

既に作製した Ror1, Ror2 ノックアウトマウスの交配により、Ror1, Ror2 ダブルノックアウトマウスの作製を行った。これらの一連の変異マウスについて、骨軟骨染色をはじめとする病理組織学的方法により病態解析

を行った。また、yeast two-hybrid 法及び in vitro での発現解析実験により、Ror1, Ror2 と共役するシグナル伝達分子の検索・同定を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は、所属動物実験施設指針等に則り、材料、モデルともに、動物愛護上の配慮をもって行う。

C. 研究結果

Ror2 ノックアウトマウスの解析から、Ror2 が摂食に関わる口腔顎顔面領域の形成に関わることが明らかとなった。また、Ror1, Ror2 ダブルノックアウトマウスの解析から、Ror1, Ror2 が協調的に相互作用し正中部の骨軟骨系、殊に胸骨、恥骨結合部の形成過程において重要な役割を担うこと