

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

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

分担研究者 南 康博

神戸大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

骨軟骨形成過程における受容体チロシンキナーゼ Ror2 の役割を明らかにする目的で機能解析を行い、Ror2 が Wnt シグナル伝達において重要な役割を担うカゼインキナーゼ 1e (CK1e)、dishevelled (Dvl) と共役することが明らかとなり、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。また、Ror2 がアダプター分子 Dlxin-1 と会合すること、及び Dlxin-1 及び Dlxin-1 ・転写因子複合体の細胞内局在を制御することが示された。さらに、骨軟骨疾患モデルマウスを用いた遺伝学的解析ならびに分子細胞生物学的解析により、Ror2 が Wnt5a の受容体として機能することが示唆された。

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 Ror2 ノックアウトマウス及び Wnt5a ノックアウトマウスを骨軟骨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 Ror2（及び Ror1）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 Ror2 ノックアウトマウス及び新たに入手した Wnt5a ノックアウトマウスについて、病理組織学的方法による病態解析を行うとともに、分子細胞生物学的的方法により Ror2 と Wnt5a の機能的連関解析を行った。また、Ror2 を bait として用いた yeast two-hybrid スクリーニングにより同定した CK1e、Dvl 及び Dlxin-1 について、in vitro での発現解析実験等により Ror2 とこれらのシグナル伝達分子の構造と機能の連関解析を行った。

(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っている。

C. 研究結果

Ror2 及び Wnt5a ノックアウトマウスの体系的病態解析から、両者が極めて類似した表現型を示すことが見い出され、Ror2 が Wnt5a の受容体として機能することが示唆された。また、実際 Wnt5a と Ror2 が *in vitro* で会合すること、ならびに両者が協調的に働き JNK を活性化することが明らかとなった。また、遺伝子導入・発現実験から哺乳動物細胞において、Ror2 の細胞内領域とりわけ C 末端側 proline-rich ドメインを含む領域が CKIe、Dvl 及び Dlxin-1 と会合することが見出された。さらに、CKIe が Ror2 をセリン・スレオニンリン酸化すること、及び CKIe と Dvl の共存下において Ror2 のチロシン自己リン酸化能が亢進することが明らかとなった。また、Ror2 が Dlxin-1 と選択的に会合し、Dlxin-1 及び Dlxin-1/Msx2 複合体の細胞内局在を調節することが明らかとなった。

D. 考察

本年度の研究により、Ror2 が Wnt5a の受容体として機能すること、また

Ror2 が CKIe、Dvl といった Wnt シグナル伝達において重要な役割を担う制御分子と会合、共役することが明らかとなった。この研究成果から、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るので、今後その分子機構の解明が待たれる。Ror2 と Wnt5a が協調的に働き JNK を活性化することから、Wnt5a/Ror2 は PCP 経路に関与することが予想される。一方、Wnt5a は Ror2 と会合する他の細胞膜貫通型蛋白質へも結合することが示唆されており、Ror2 が Wnt5a の受容体複合体の一成分である可能性についても検討する必要があると考えられる。

E. 結論

Ror2 及び Wnt5a 遺伝子ノックアウトマウスの解析及び分子細胞生物学的解析により、Ror2 が Wnt5a の受容体として機能すること、また Wnt5a/Ror2 が JNK 活性化経路に関与することが示された。また、Ror2 が Wnt シグナル伝達の重要な制御分子である CKIe、Dvl ならびにアダプター分子である Dlxin-1 と共役することが明らかとなった。CKIe が Ror2 をセリン・スレオニンリン酸化すること、及び CKIe と Dvl の協調作用により Ror2 のチロシン自己リン酸化能が亢進することが見出された。ま

た、Ror2 が Dlxin-1 と選択的に会合し、Dlxin-1 及び Dlxin-1/Msx2 複合体の細胞内局在を調節することが明らかとなった。

F. 健康危険状況

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Oishi, I., Iwai, K., Kagohashi, Y., Fujimoto, H., Kariya, K., Kataoka, T., Sawa, H., Okano, H., Otani, H., Yamamura, H., and Minami, Y.: Critical role of a *C. elegans* homolog of Cds1/Chk2-related kinase, Ce-CDS-1, in meiotic recombination. **Mol. Cell. Biol.**, 21: 1329-1335, 2001.

Fujimoto, H., Tanaka, Y., Liu, Z-J., Yagita, H., Okumura, K., Kosugi, A., Morinobu, A., Umehara, H., Yamamura, H., and Minami, Y.: Down-regulation of $\alpha 6$ integrin, an antioncogene product, by functional cooperation of H-Ras and c-Myc. **Genes to Cells** 6: 337-343, 2001.

Huang, J-Y., Umehara, H., Inoue, H., Tabassam, F. H., Okazaki, T., Kono, T., Minami, Y., Tanaka, Y., and Domae, N.: Differential interaction of Cbl with Grb2 and Crk in CD2-

mediated NK cell activation. **Molecular Immunol** 37: 1057-1065, 2001.

Matsuda, T., Nomi, M., Ikeya, M., Kani, S., Oishi, I., Terashima, T., Takada, S., and Minami, Y.: Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development. **Mech. Dev.** 105: 153-156, 2001.

Umehara, H., Goda, S., Imai, T., Nagano, Y., Minami, Y., Tanaka, Y., Okazaki, T., Bloom, E. T., and Domae, N.: Fractalkine, a CX3C-chemokine, functions predominantly as an adhesion molecule in monocytic cell line THP-1 cells. **Immunology and Cell Biol.** 79: 298-302, 2001.

Susilowati, R., Jusuf, A. A., Sakagami, H., Kikawa, S., Kondo, H., Minami, Y., and Terashima, T.: Distribution of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase I beta 2 in the central nervous system of the rat. **Brain Res.** 911: 1-11, 2001.

Nomi, M., Oishi, I., Kani, S., Suzuki, H., Matsuda, T., Yoda, A., Kitamura, M., Itoh, K., Takeuchi, S., Takeda, K., Akira, S., Ikeya, M., Takada, S., and

Minami, Y.: Loss of mRor1 enhances the heart and skeletal abnormalities in mRor2 deficient mice: redundant and pleiotropic functions of mRor1 and mRor2 receptor tyrosine kinases. **Mol. Cell. Biol.** 21: 8329-8335, 2001.

Umehara, H., Inoue, H., Huang, J-Y., Kono, T., Minami, Y., Tanaka, Y., Okazaki, T., Mimori, T., Bloom, E. T., and Domae, N.: Role for adapter proteins in costimulatory signals of CD2 and IL-2 on NK cell activation. **Molecular Immunol.** 38: 587-596, 2001.

Iwai, K., Oishi, I., Xu, X-Z., Minami, Y., and Yamamura, H.: Physical interaction of Dmnc protein and mRNA with Orb protein: implication in the regulated localization of Orb by Dmnc during oogenesis and embryogenesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 290: 225-229, 2002.

Iida, T., Mine, S., Fujimoto, H., Suzuki, K., Minami, Y., and Tanaka,

Y.: Hypoxia-inducible factor-1a induces cell cycle arrest of endothelial cells. **Genes to Cells**, 2002, *in press*.

2. 学会発表

受容体型チロシンキナーゼ Ror2 によるアダプター分子 Dlxin-1 及び転写因子 Msx2 の細胞内動態・機能の制御機構、松田 武、大石 勲、可児修一、鈴木泰明、佐々木文、渡辺 研、南 康博、第 24 回日本分子生物学会年会 平成 13 年 12 月

特発性大腿骨頭壊死症における Hypoxia-inducible factor (HIF)-1a の関与と血管内皮細胞における HIF-1a 遺伝子導入によるアポトーシスの誘導、第 19 回日本骨代謝学会 平成 13 年 8 月 (優秀ポスター賞受賞)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
該当なし。

20010252

以降 P.23-P.157は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
下記の資料をご参照ください。

Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling.

Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, Ikeda K, Watanabe K.

J Biol Chem. 2001 May 25;276(21):17871-7. Epub 2001 Feb 26.

Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220+ cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency.

Sato T, Shibata T, Ikeda K, Watanabe K.

J Bone Miner Res. 2001 Dec;16(12):2215-21.

Cloning and characterization of a rat ortholog of MMP-23 (matrix metalloproteinase-23), a unique type of membrane-anchored matrix metalloproteinase and conditioned switching of its expression during the ovarian follicular development.

Ohnishi J, Ohnishi E, Jin M, Hirano W, Nakane D, Matsui H, Kimura A, Sawa H, Nakayama K, Shibuya H, Nagashima K, Takahashi T.

Mol Endocrinol. 2001 May;15(5):747-64.

A DAF-1-binding protein BRA-1 is a negative regulator of DAF-7 TGF-beta signaling.

Morita K, Shimizu M, Shibuya H, Ueno N.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 22;98(11):6284-8. Epub 2001 May 15.

BIP, a BRAM-interacting protein involved in TGF-beta signalling, regulates body length in Caenorhabditis elegans.

Sugawara K, Morita K, Ueno N, Shibuya H.

Genes Cells. 2001 Jul;6(7):599-606.

20010252

Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5.

Shirakabe K, Terasawa K, Miyama K, Shibuya H, Nishida E.
Genes Cells. 2001 Oct;6(10):851-6.

Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7.

Yanagisawa M, Nakashima K, Takeda K, Ochiai W, Takizawa T, Ueno M, Takizawa M, Shibuya H, Taga T.
Genes Cells. 2001 Dec;6(12):1091-9.

Critical role of Caenorhabditis elegans homologs of Cds1 (Chk2)-related kinases in meiotic recombination.

Oishi I, Iwai K, Kagohashi Y, Fujimoto H, Kariya K, Kataoka T, Sawa H, Okano H, Otani H, Yamamura H, Minami Y.
Mol Cell Biol. 2001 Feb;21(4):1329-35.

Down-regulation of alpha6 integrin, an anti-oncogene product, by functional cooperation of H-Ras and c-Myc.

Fujimoto H, Tanaka Y, Liu ZJ, Yagita H, Okumura K, Kosugi A, Morinobu A, Umehara H, Yamamura H, Minami Y. Genes Cells. 2001 Apr;6(4):337-43.

Differential interaction of Cbl with Grb2 and CrkL in CD2-mediated NK cell activation.

Huang JY, Umehara H, Inoue H, Tabassam FH, Okazaki T, Kono T, Minami Y, Tanaka Y, Domae N.
Mol Immunol. 2000 Dec;37(17):1057-65.

Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development.

Matsuda T, Nomi M, Ikeya M, Kani S, Oishi I, Terashima T, Takada S, Minami Y.
Mech Dev. 2001 Jul;105(1-2):153-6.

20010252

Fractalkine, a CX3C-chemokine, functions predominantly as an adhesion molecule in monocytic cell line THP-1.

Umehara H, Goda S, Imai T, Nagano Y, Minami Y, Tanaka Y, Okazaki T, Bloom ET, Domae N. *Immunol Cell Biol.* 2001 Jun;79(3):298-302.

Distribution of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I beta 2 in the central nervous system of the rat.

Rina-Susilowati, Jusuf AA, Sakagami H, Kikkawa S, Kondo H, Minami Y, Terashima T. *Brain Res.* 2001 Aug 17;911(1):1-11.

Loss of mRor1 enhances the heart and skeletal abnormalities in mRor2-deficient mice: redundant and pleiotropic functions of mRor1 and mRor2 receptor tyrosine kinases.

Nomi M, Oishi I, Kani S, Suzuki H, Matsuda T, Yoda A, Kitamura M, Itoh K, Takeuchi S, Takeda K, Akira S, Ikeya M, Takada S, Minami Y. *Mol Cell Biol.* 2001 Dec;21(24):8329-35.

Role for adapter proteins in costimulatory signals of CD2 and IL-2 on NK cell activation.

Umehara H, Inoue H, Huang J, Kono T, Minami Y, Tanaka Y, Okazaki T, Mimori T, Bloom ET, Domae N. *Mol Immunol.* 2002 Jan;38(8):587-96.

Physical interactions of Dmnk with Orb: implications in the regulated localization of Orb by Dmnk during oogenesis and embryogenesis.

Iwai K, Oishi I, Xu XZ, Minami Y, Yamamura H. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 11;290(1):225-9.