

平成 14 年度

厚生労働科学研究費補助金（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 15 年 3 月

主任研究者 渡辺 研

平成 14 年度 研究報告書 目次

<b>1. 総括研究報告書</b>	-----	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
<b>2. 分担研究報告書</b>	-----	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
神戸大学大学院 医学系研究科 教授		南 康博
(発表論文)	-----	22

# 1. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（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、早老モデルからの骨髄幹細胞ならびに間葉系幹細胞活性化に関する知見（渡辺）、Wnt のシグナル伝達調節に関する新規遺伝子の発見（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活性化因子（リガンド）と、受容体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、Wnt、骨芽細胞分化、間葉系細胞、  
幹細胞、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  
神戸大学大学院  
医学系研究科  
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、効果的な骨軟骨組織の機能維持・回復技術の

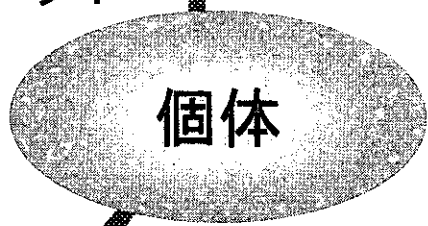
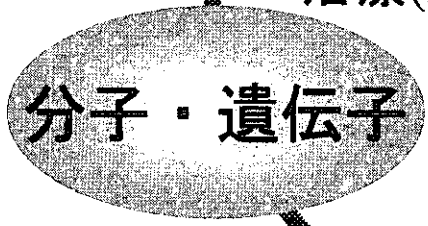
間葉系幹細胞分化  
骨芽細胞分化  
軟骨細胞分化



新規分子Dlxin-1の発見(渡辺)  
新規分子BRA-1/2の発見(澁谷)  
新規分子BIPの発見(澁谷)  
形態形成制御分子Ror1/2の  
シグナル伝達機構の解明(南)  
形態形成制御分子Ror1/2の  
シグナル発生機構の解明(南)

老化・加齢個体からの幹細胞の分析(渡辺)  
早老モデルの骨病態の解析(渡辺)

病態解明と  
治療(創薬)ターゲット  
の開発



細胞増殖・分化  
形態形成シグナル分子  
BMP, Wnt

軟骨疾患モデル  
骨折モデル  
老化・加齢マウス

新規分子BRA-1/2の個体・形態形成における機能解析(澁谷)  
新規分子BIPの個体・形態形成における機能解析(澁谷)  
Wnt形態形成シグナル伝達の負の制御機構の解明(澁谷)  
Ror1/2ノックアウトマウスの解析(南)  
軟骨疾患モデルと骨折モデルと再生過程に関する知見(南)  
Wnt5aノックアウトマウスの解析(南)

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、加齢動物ならびに早老モデルマウスをもちいて、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) ならびに Wnt 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

本項目に関しては、分担研究報告と重複するため、後述の分担研究報告を参照されたい。

(倫理面への配慮)

平成 14 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

渡辺は、早老症モデルマウス (ATMKO) の骨病態について細胞レベルの解析を行った。骨髄細胞より基質接着性により分離した間葉系細胞について、コロニー法 (CFU-F, CFU-OB, CFU-Adip) により評価を行った。ATMKO マウス骨髄由来細胞は、CFU-F 及び CFU-OB いずれにおいても顕著な低値を示したが、頭蓋冠由来骨芽細胞では分化・石灰化に差が見られなかったことから、骨病態は間葉系幹細胞の self-renewal に問題があり、組織再生不良による老化・老年病様病態を呈している可能性が示された。また、Msx2 による多分化能を有する間葉系幹細胞誘導・活性化系を確立した。

一方、Wnt シグナルは多様な生物活性を制御しており、最近、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の因子 LRP5 が、高骨密度家系で変異があることがわかり、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が、骨形成に対して促進的に作用していることが、ヒト遺伝学ならびにマウスの発生工学の実験から明らかにされた (Cell 2002, N Engl J Med 2002)。澁谷は

MAP キナーゼ様分子 NLK が Wnt/ $\beta$ -catenin 経路に対して抑制的に機能することを示してきた。本研究では NLK のさらなる機能解析を行い、予定外胚葉領域に xNLK を発現させると、前頭部の神経マーカー遺伝子 Otx-2 の発現が誘導されることがわかった。また、 $\beta$ -catenin との結合能を持つ HMG 型転写因子である Sox タンパク質に着目し、NLK との機能的相互作用について検討した結果、xSox11 が Chordin により発現誘導されること、xNLK と xSox11 が協調して神経誘導を行うことが示され、また、xNLK と xSox11 が複合体を形成することが確認された。さらに、xSox11 や Chordin による神経マーカー遺伝子の発現誘導は、キナーゼ活性欠損変異型である xNLK-KN の発現によって抑制されることがわかった。

南は、Ror2, Wnt5a ノックアウトマウスの病態解析ならびに分子・細胞レベルの解析から、Ror2 が Wnt5a の受容体として機能し、JNK の活性化を介して PCP 経路に関与することが明らかとなった。また、CKIe による Ror1, Ror2 のチロシン自己リン酸化・チロシンキナーゼ活性化の機序が示された。また、Ror2 がチロシンキナーゼ活性非依存的にアダプター分子 Dlxin-1/NRAGE の細胞内局在を制御

し、Msx2 による転写を調節することが明らかになった。

#### **D. 結論**

加齢マウス同様、骨粗鬆症様病態を示す早老マウスモデルにおいても、組織再生不良による骨形成不全が老化・老年病症状の原因である可能性を示した。正常な骨形成に必須である Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が NLK により抑制的に制御されている事を組織形成系を用いて明らかにした。軟骨形態形成に必須である Ror2 のリガンドが Wnt であることを証明するとともに、Msx2 の転写調節制御のメカニズムを明らかにした。

#### **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

厚生労働科学研究費補助金（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

本年度においては、前年度において行った加齢マウスにおける間葉系細胞の解析をもとに、早老症モデルマウス（ATMKO）の骨病態について細胞レベルの解析を行った。骨髄細胞より基質接着性により分離した間葉系細胞について、コロニー法（CFU-F, CFU-OB, CFU-Adip）により評価を行った。ATMKO マウス骨髄由来細胞は、CFU-F 及び CFU-OB いずれにおいても顕著な低値を示したが、頭蓋冠由来骨芽細胞では分化・石灰化に差が見られなかったことから、骨病態は間葉系幹細胞の self-renewal に問題があり、組織再生不良による老化・老年病様病態を呈していることが見いだされた。

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、その元となる間葉系幹細胞や骨芽細胞分化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。前年度までに、本研究では加齢個体由来の骨髄細胞を用いた研究により、骨芽細胞や筋肉細胞などの幹細胞である間葉系幹細胞が含まれる骨髄間葉系細胞の増殖能が著しく低下している事を見いだしており、本年度では、早老症モデルの一種である ATM (ataxia telangiectasia mutated) のノックアウトマウスの骨病態を解析する事により、加齢による間葉系幹細胞増殖能低下の分子メカニズムの解明

の糸口を得る事を目的とする。また、このような幹細胞の骨芽細胞分化、脱分化を一遺伝子導入により調節する開発する。

## B. 研究方法

1. 加齢動物からの骨髓細胞の解析  
ATM (ataxia telangiectasia mutated) のヘテロ接合体(+/-)同士の交配より、野生型(WT)、ヘテロ型(He)、ノックアウト(KO)の産仔を得て、新生児の頭骸冠ならびに尾部より、それぞれ骨芽細胞ならびに線維芽細胞を調製し、解析に用いた。また、ATMKO マウスより骨髓を取り出し、6ウェルプレートにウェルあたり  $1.5 \times 10^7$  細胞 (CFU-F) もしくは  $2.5 \times 10^7$  細胞 (CFU-OB, CFU-Adip) を撒きこみ、15%FCS 及び 1 mM Asc-2-P を含む Phenol Red-free  $\alpha$ MEM 培地 (CFU-OB) もしくは 15%FCS 及び DMI (dexamethazone/ methylisobutylxanthine/ insulin) を含む Phenol Red-free  $\alpha$ MEM 培地 (CFU-Adip) で培養した。培地は5日毎に交換し、培養10日目に alkaline phosphate 活性染色 (CFU-F) を行い、ALP 陽性コロニー数をカウントした。一方、培養28日目に Alizarin Red 染色を行い、陽性コロニー数をカウントし、骨芽細胞分化指標 CFU-OB とした。また、脂肪細

胞分化指標である CFU-Adip は、oil red-O 染色し、油滴染色コロニーをカウントした。

## 2. 骨芽細胞分化に関する研究

前年度までに確立した Msx2 活性制御系をマウス骨芽細胞株 KUSA-A1 細胞に導入し、脱分化を観察するとともに誘導後、24 時間、48 時間後の RNA を調製した。また、同様に ERTM の系を、骨芽細胞分化に必須である Zn 型転写因子 Osterix (Osx) に応用し、骨芽細胞分化における Osx 下流分子についてマイクロアレイ法を用いて探索を行った。

(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行っていない。また動物実験は長寿医療研究センター動物実験指針に基づいて行っている。

## C. 研究結果

ATMKO の骨量 (BV/TV) は、すでに10週齢マウスにおいて、雌雄とも KO 群で低値を示し、その傾向は14週齢マウスにおいてより顕著であった。また、対照群において10週齢から14週齢における骨量の増加があるにもかかわらず、KO 群ではむしろ減少方向であり、加齢による骨量減少が観察された。すでに骨量に差のあった10週齢脛骨の骨形態計測の結果、KO 群では、骨形成指標や骨吸収指標

において顕著な低下が検出された。そこで、骨髄細胞を用いた破骨細胞形成能及び CFU-F を調べたところ、KO 群では *in vitro* での破骨細胞形成能の低下はみられなかったが、CFU-F が著しく低下していた。また、ATMKO マウス頭蓋冠より調製した骨芽細胞では分化異常が認められなかった。CFU-OB ならびに CFU-Adip も顕著な低下を示した。

間葉系分化細胞の脱分化誘導活性をもつ Msx2 の活性誘導系により、マウス骨芽細胞株 KUSA-A1 細胞において、前年度の本研究課題において作製した Msx2ER の系を用いて、Tamoxifen(Tmx)依存的に脱分化を誘導する事が可能となった。また、骨芽細胞分化に必須である転写因子 Osterix (Osx)も同様に LPCXER カセットに挿入し(OsxER)、マウス筋芽細胞 C2C12 に導入した。OsxER 導入 C2C12 細胞は、BMP 非存在下においても、Tmx 添加により、骨芽細胞特異的マーカーである Osteocalcin 遺伝子の発現が上昇した。

#### D. 考察

早老モデルの一つである ATMKO の骨病態（骨低形成）の解析から、骨芽細胞の分化異常というよりはむしろ、骨芽細胞ならびに脂肪細胞等の共通の幹細胞である間葉系幹細胞の

増殖低下が骨形成不全の原因となっている可能性が示された。

また、一遺伝子導入による骨芽細胞分化・脱分化調節系の開発では、Tmx 添加による Msx2 ならびに Osx の活性制御を前年度開発した LPCXER カセットにより達成できた。一遺伝子導入ならびに活性制御の意義は、再生医療において *ex vivo* 的遺伝子治療との融合を考える上で、幹細胞ならずとも分化細胞を用いて、骨芽細胞などに転換させる可能性を示す事が出来た。今後、個体由来初代培養細胞などでの効果について検討を行って行く予定である。

#### E. 結論

早老モデルマウスにおける骨粗鬆症様骨病態は、骨形成の顕著な低下によるものであり、それは、間葉系幹細胞の増殖低下がもたらす組織再生不良が原因である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

M. Watanuki, A. Sakai, T. Sakata, H. Tsurukami, M. Miwa, Y. Uchida, K. Watanabe, K. Ikeda, & T. Nakamura. Role of inducible nitric oxide synthase in skeletal adaptation to

acute increases in mechanical loading.  
*J Bone Miner Res* (2002) 17:1015-1025

A. Sasaki, Y. Masuda, K. Iwai, K. Ikeda, & K. Watanabe. A RING finger protein Praja1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Neccin family protein, Dlxin-1. *J. Biol. Chem.* (2002) 277:22541-22546

M.E. Williams, P. Strickland, K. Watanabe, & L. Hinck UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE. *J. Biol. Chem.* (2003) 278 *in press*

## 2. 学会発表等

菱谷彰徳、伊東昌子、池田恭治、渡辺 研 Ataxia Telangiectasia

Mutated (Atm) ノックアウトマウスにおける骨形成の低下をともなう骨量減少 日本骨代謝学会第20回年会 岡山 平成14年 7月25日～27日

A. Hishiya, M. Ito, K. Ikeda, K. Watanabe Decreased bone formation in ataxia telangiectasia mutated (ATM) knockout mice. The 24th annual meeting Am Soc Bone Miner Res September 20-24, 2002, San Antonio, TX.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(ア) 特許取得

なし

(イ) 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（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

Wnt シグナルは多様な生物活性を制御している。我々は MAP キナーゼ様分子 NLK が Wnt/ $\beta$ -catenin 経路に対して抑制的に機能することを示してきた。本研究では NLK のさらなる機能解析を行い、予定外胚葉領域に xNLK を発現させると、前頭部の神経マーカー遺伝子 Otx-2 の発現が誘導されることがわかった。また、 $\beta$ -catenin との結合能を持つ HMG 型転写因子である Sox タンパク質に着目し、NLK との機能的相互作用について検討した結果、xSox11 が Chordin により発現誘導されること、xNLK と xSox11 が協調して神経誘導を行うことが示され、また、xNLK と xSox11 が複合体を形成することが確認された。さらに、xSox11 や Chordin による神経マーカー遺伝子の発現誘導は、キナーゼ活性欠損変異型である xNLK-KN の発現によって抑制されることがわかった。以上の結果は、NLK が Sox11 と協調して、神経形成において機能するという新たな機能を示している。

A. 研究目的

Wnt ファミリーに属する因子は生体内において様々な生理活性を発揮しており、Wnt シグナルには GSK3- $\beta$ , APC, Axin,  $\beta$ -catenin 等の因子の関与が知られている。これまで、我々は MAPKKK である TAK1 が MAPK 様分子である NLK (*nemo-like kinase*) を活性化し、これが  $\beta$ -catenin /TCF 複合体の DNA 結合能を抑制す

ることによって、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路に対して抑制的に機能することが明かにしてきた。しかし、NLK を活性化する機構や、生体内における NLK の機能については不明な点が多い。そこで本研究では Wnt シグナルに関与する NLK の生体内での役割を、より分子レベルでの解析を目指し研究を進めた。すなわち NLK と相互作用する新たな分子を単離し、

Wnt シグナルでの機能を明らかにしていく。そして、これらシグナル伝達分子の解析からより詳細なシグナル伝達機構が明らかにされ、これにより Wnt シグナルの制御機構の全体像を見だし、生体内における役割を解明することを目的とした。

## B. 研究方法

Xenopus NLK (xNLK) mRNA の発現が、神経胚から初期尾芽胚において、眼、前頭部を含む神経領域に観察されたことから、xNLK が神経誘導に関与する可能性が考えられた為、Xenopus を用いた実験を行った。

(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

アフリカツメガエル胚の胞胚期の予定外胚葉領域（アニマルキャップ）は、切り取って単独で培養すると表皮へと分化する。アフリカツメガエル初期胚の 2 細胞期の動物極側に xNLK mRNA を顕微注入し、アニマルキャップを切り取って培養したところ、全般的な神経マーカー遺伝子である N-CAM の発現が誘導された。

この発現誘導は、コントロールのアニマルキャップにおいては見られなかった。さらに、xNLK の発現によって前頭部神経のマーカー遺伝子である Otx-2 の発現も誘導された。一方、中脳のマーカー遺伝子である En-2、後脳のマーカー遺伝子である Krox20、脊髄のマーカー遺伝子である HoxB9 の発現は誘導されなかった。このことから、xNLK は前方神経マーカー遺伝子の発現を特異的に誘導できることが示唆された。

Sox ファミリーは、DNA 結合に必要な HMG 領域を含む Sry 関連転写因子である。特に、Sox2、SoxD 等のいくつかの Sox タンパク質は、オーガナイザーから分泌されるタンパク質である Chordin によって発現を誘導され、アフリカツメガエル初期発生の神経誘導に必須であると考えられている。一方、アフリカツメガエルの前後軸に沿った神経の部域化において、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は後方化シグナルとして重要な役割を果たすと考えられている。mNLK が TCF と結合してリン酸化することによって Wnt シグナル伝達経路を抑制すること、また、Sox タンパク質が  $\beta$ -catenin と結合し、 $\beta$ -catenin/TCF 複合体による Wnt シグナル伝達経路を抑制することなどから、Sox11 タンパク質が NLK、 $\beta$ -catenin、TCF の周辺におい

て機能する可能性が考えられた。そこで、Sox11 が xNLK と協調して神経発生に関与している可能性について検証した。

アフリカツメガエルの Sox11 (xSox11) mRNA の発現部位を Whole-mount *in situ* hybridization によって調べたところ、未受精卵から胞胚期にかけて胚全体に広く存在し、神経胚頃から神経領域に限局しはじめ、尾芽胚においては、眼、頭部神経呈を含んだ神経領域で検出された。このような発現パターンは xNLK と非常によく似たものであった。

次に、xSox11 が神経誘導に関与するか確認する為、アニマルキャップアッセイを行った。その結果、xSox11 を予定外胚葉域に発現させると、前方神経マーカー遺伝子である Otx-2、En-2、そして全般的な神経マーカー遺伝子である N-CAM の発現が誘導された。また、xSox11 による神経マーカー遺伝子 Otx-2、En-2 の発現誘導は、xNLK を共発現させることによってさらに増進され、xNLK-KN の共発現によっては強く抑制された。これらの結果から、xNLK が xSox11 の前方神経誘導に関与することが示された。一方、Sox2 や SoxD も神経誘導を引き起こすことが知られている。これらを発現させることによって誘導された神経マーカー遺伝子の

発現に対しては、xNLK を共発現しても影響は見られなかった。

また、Sox2 や SoxD などの Sox 遺伝子の発現が、神経誘導因子である Chordin に誘導されることが知られていることから、xSox11、xNLK も Chordin に発現を誘導されることによって、神経誘導を引き起こす可能性が考えられた。そこで、RT-PCR 法を用い、Chordin を発現させたアニマルキャップにおける xSox11、xNLK の mRNA の発現を検証した。その結果、xNLK の発現は Chordin には誘導されなかったが、xSox11 は、Sox2 や SoxD と同様に、Chordin によって発現を強く誘導されることがわかった。さらに、Chordin による神経誘導に対する xNLK の効果について検証したところ、アニマルキャップにおいて、Chordin によって誘導される前方神経マーカー遺伝子 Otx-2 の発現が、xNLK-KN によって強く抑制されることがわかった。従って、xNLK は Chordin による神経誘導に関与すると考えられた。以上の結果から、xNLK が、Chordin によって発現誘導される xSox11 と協調して、前方神経誘導に機能する可能性が示された。xSox11 は、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の構成因子である TCF と同じく、HMG 型の転写因子である。培養細胞系の実験により、mNLK と TCF が複合体



を形成することが知られていることから、xNLK と xSox11 も結合する可能性が考えられた。そこで、N 末端側に Flag-tag を付加した xNLK (Flag-xNLK) と T7-tag を付加した xSox11 (T7-xSox11) を構築し、ヒト 293 細胞に発現させ、免疫沈降法を用いて検討した。抗 Flag 抗体で免疫沈降した後、これを抗 T7 抗体で immunoblotting した結果、Flag-xNLK を用いて免疫沈降した細胞抽出液において、T7-xSox11 が検出された。以上の結果から、xSox11 と xNLK が複合体を形成して、前方神経系の誘導において協調して機能する可能性が示された。

#### D. 考察

アフリカツメガエルのアニマルキャップに、オーガナイザーから分泌される Noggin、Chordin、Follistatin といった神経誘導因子を発現させると、前方神経の分化が引き起こされることが知られている。また、Sox 遺伝子ファミリーは、Chordin によってその発現が制御されていることが知られている。本研究によって、Chordin により xSox11 の発現が誘導されることが示され、また、アニマルキャップに Chordin を発現させることによって誘導された前方神経マーカー遺伝子の発現が、xNLK のキ

ナーゼ不活性型 (xNLK-KN) の共発現によって抑制されることがわかった。これらのことから、xNLK は、Chordin が外胚葉を前方神経へと分化誘導する際、Chordin によって発現誘導される xSox11 と協調して神経誘導に関与すると考えられた。xNLK は、HMG 型転写因子である TCF と結合してリン酸化することにより、TCF の転写活性を調節することが知られている。従って、xNLK が HMG 型転写因子である xSox11 と結合し、xSox11 をリン酸化することによって転写活性の制御をしている可能性も考えられる。xNLK/xSox11 複合体によって、どのような標的遺伝子の発現が制御されるのか、また、これらの上流を担うシグナル因子は何なのか、NLK と Sox あるいは TCF の複合体がシグナル伝達系にどのような効果を持つか等、解明すべき点はまだ残されている。

#### E. 結論

*In situ* hybridization の結果、xNLK mRNA が神経領域に局在していたこと、また、アニマルキャップに xNLK を発現させると、前方神経マーカー遺伝子の発現が誘導されたことから、xNLK が神経誘導能を持つと考えられた。さらに、HMG 型転写因子であり、 $\beta$ -catenin との結合能を有する Sox

ファミリータンパク質のひとつである xSox11 が、xNLK と協調して神経誘導を引き起こすことがわかった。

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hyodo-Miura, J., Urushiyama, S., Nagai, S., Nishita, M., Ueno N. and Shibuya, H. (2002). Involvement of NLK and Sox11 in neural induction in *Xenopus* development. **Genes Cells** 7, 487-496.

Komatsu, Y., Shibuya, H., Takeda, N., Ninomiya-Tsuji, J., Yasui, T., Miyado, K., Sekimoto, T., Ueno, N., Matsumoto, K. and Yamada, G. (2002). Targeted disruption of the *Tab1* gene causes embryonic lethality and defects in cardiovascular and lung morphogenesis. **Mech. Dev.** 119, 239-249.

Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, RT., Ninomiya-Tsuji, J. and Matsumoto, K. (2003). The TAK1-NLK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Functions in the Wnt-5a/Ca<sup>2+</sup> Pathway To

Antagonize Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. **Mol Cell Biol.** 23, 131-139.

Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K. and Kato, S. (2003). Cytokines suppress adipogenesis and PPAR- $\gamma$  function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. **Nat. Cell Biol.** 5, 224-230.

2. 学会発表

三浦純子、山田美里、澁谷浩司：Wnt シグナルに関与する NLK 結合因子 NARF の機能解析。科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業 生物の発生・分化・再生研究領域 第1回公開シンポジウム、2002年5月25日、東京。

漆山誠一 澁谷浩司：Wnt シグナル伝達系に関与するプロテインキナーゼ WAK1 の機能解析。科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業 生物の発生・分化・再生研究領域 第1回公開シンポジウム、2002年5月25日、東京

漆山誠一、久本直毅、山田美里、白壁恭子、辻順、Bruce. Bowerman、澁谷浩司、松本邦弘：WRM-1 and SGG-1 interactors isolated from two-

hybrid screening

第3回 *C. elegans* 日本集会、2002年8月8日、名古屋。

小林由加子、漆山誠一、山田美里、  
澁谷浩司: TIF-1, a E3 ubiquitin ligase, regulates dauer formation in *C. elegans*。第3回 *C. elegans* 日本集会、2002年8月8日、名古屋。

漆山誠一、久本直毅、山田美里、白壁恭子、辻順、安藤恵子、三谷昌平、澁谷浩司、松本邦弘: 線虫 *C. elegans* の Wnt シグナル伝達経路に関するプロテインキナーゼ GAK-1。第25回日本分子生物学会年会、2002年12月11日、横浜。

小林由加子、漆山誠一、山田美里、加藤千佳子、井出寛子、樋口理、秋山徹、澁谷浩司: ユビキチンリガー

ゼ TIF-1 による線虫 *C. elegans* TGF- $\beta$  シグナルの制御。第25回日本分子生物学会年会、2002年12月11日、横浜。

大河原美静、三浦一兵頭純子、白壁恭子、松本邦弘、上野直人、澁谷浩司: Non-canonical Wnt シグナル伝達系における NLK の役割。日本分子生物学会、2002年12月12日、横浜。

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。

厚生労働科学研究費補助金（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  
神戸大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

Ror2, Wnt5a ノックアウトマウスの病態解析ならびに分子・細胞レベルの解析から、Ror2 が Wnt5a の受容体として機能し、JNK の活性化を介して PCP 経路に関与することが明らかとなった。また、CKIeによる Ror1, Ror2 のチロシン自己リン酸化・チロシンキナーゼ活性化の機序が示された。また、Ror2 がチロシンキナーゼ活性非依存的にアダプター分子 Dlxin-1/NRAGE の細胞内局在を制御し、Msx2 による転写を調節することが明らかになった。

A. 研究目的

これまでに受容体型チロシンキナーゼ Ror1, Ror2 及び Wnt5a 遺伝子ノックアウトマウスの解析を行い、これらの分子が骨軟骨系の形成過程において必須の役割を担うことが明らかとなった。本年度の研究においては、上記ノックアウトマウスの更なる病態解析を行うとともに、Ror2, Wnt5a 及び Ror1, Ror2 に共役する分子群（Dlxin-1/NRAGE, CKI $\alpha$ , CKIe 等）に焦点を当てて形態形成におけるシグナル伝達の機構解析を行った。さらに、神経堤細胞特異的 Ror2 遺伝子ノックアウトマウスの作成を行った。

B. 方法

本年度はまず Ror2 及び Wnt5a 遺伝子ノックアウトマウスの詳細な表現型解析を行った。また、Wnt5a, Ror2 及び Frizzleds (Fzs)の物理的・機能的共役について、生化学的・発生生物学的解析により検討した。さらに、Ror2 と会合するアダプター分子 Dlxin-1/NRAGE について、生化学的・細胞生物学的手法により両分子の機能的連関解析を行った。また、Cre/Loxp システム (flox/flox Ror2 マウスと Protein-O/Cre トランスジェニックマウスの交配により)を用いて、神経堤細胞特異的 Ror2 ノックアウトマウスの作成を行った。なお、