



Title	内軟骨性骨形成過程におけるプロテインキナーゼ Yank1の役割の解明
Author(s)	吉川, 浩史
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/72257">https://doi.org/10.18910/72257</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 吉 川 浩 史 )

論文題名 内軟骨性骨形成過程におけるプロテインキナーゼYank1の役割の解明

## 論文内容の要旨

脊椎動物の骨格は、膜性骨形成と内軟骨性骨形成の二つの様式により形成される。膜性骨形成は骨芽細胞によって直接的に骨が形成される過程であり、頭蓋骨などを形成する。一方、内軟骨性骨形成は軟骨細胞が段階的に分化し、骨組織へと置換される複雑なステップを経る過程であり、四肢骨や脳頭蓋底を含む大部分の骨格を形成する。内軟骨性骨形成では、まず未分化間葉系細胞が凝集して軟骨細胞へと分化する。さらに増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞へと成熟し、この間、様々な軟骨基質を産生、分泌する。その後、軟骨基質の石灰化と分解、軟骨細胞のアポトーシスが起き、生じた間隙に血管が侵入し、骨芽細胞が骨組織を形成し軟骨組織を置換する。この内軟骨性骨形成の過程は様々なサイトカインやシグナル伝達分子により複雑に制御されており、そのいずれかのステップに障害が生じると、軟骨無形成症やStickler症候群などの軟骨疾患が発症する。これまでの研究から、骨形成因子BMP2が、内軟骨性骨形成において未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化、軟骨細胞の分化・成熟、軟骨基質の石灰化、骨芽細胞の分化促進など、重要かつ多彩な役割を果たしていることが示されている。BMP2の細胞内シグナル伝達は、主にSmad経路により制御されていることが明らかにされている。BMP2が受容体に結合すると、Smad1、Smad5あるいはSmad8がリン酸化され、Smad4と複合体を形成し、核内へ移行して標的遺伝子の転写を制御する。また、近年のマウスゲネティクスを活用した研究成果から、内軟骨性骨形成の初期段階ではSox9が、成熟段階では転写因子Runx2およびOsterixが必須的役割を果たしていることが明らかにされている。このように内軟骨性骨形成が時空間的に緻密な制御を受けていることを考慮すると、未知の分子が関与している可能性がある。そこで本研究では、内軟骨性骨形成に関わる新規遺伝子の同定とその役割の解明を目的とした。

まず、BMP2処理ならびに非処理した肢芽細胞を用いてMicroarray解析を行い、BMP2にて発現上昇する新規分子を探索した。その結果、新規プロテインキナーゼYank1の発現が、著明に上昇することが見出された。またRT-qPCR解析においてもBMP2によるYank1の発現誘導効果を確認した。Yank1はセリンスレオニンキナーゼの一つであり、これまで機能解析は殆どなされてきていない。Yank1が内軟骨性骨形成過程のどの細胞に関係しているかを探索するためにマウス未分化間葉系細胞株C3H10T1/2、マウス筋芽細胞株C2C12、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞を用いてYank1の発現誘導を検討した。その結果、株化細胞であるC3H10T1/2細胞とC2C12細胞ではBMP2の非存在下および存在下に拘わらずYank1の発現は認められなかった。一方、肢芽細胞と骨芽細胞においてはYank1の発現を認め、BMP2により顕著に促進されることを確認した。したがって、Yank1の発現制御には、軟骨細胞および骨芽細胞に特異的な因子が関与している可能性が示唆された。なお、胎生11.5から15.5日齢の成長過程の肢芽細胞において、Yank1はほぼ一定に発現することが示された。BMP2によるYank1の発現制御機構を検討した結果、Yank1の発現はBMP/Smad経路により発現制御されることが示された。また、BMP2の下流で機能する転写因子Runx2、Osterix、およびMsx2とYank1の発現制御機構との関連を検索したが、これらの過剰発現ではYank1は発現誘導されなかった。したがってYank1の発現誘導には、Runx2、OsterixあるいはMsx2は不十分であるか、他の転写因子が関与していると考えられた。生体におけるYank1の機能解析を行うため、CRISPR/Cas9ゲノム編集法を用いてYank1遺伝子の第2エキソンの開始コドン直下に、終止コドンを含む一本鎖オリゴDNAを挿入し、Yank1 KOマウスを作製した。Yank1 KOマウスの骨格標本を作製し、Yank1の骨格形成への関与を検討した。その結果、全身の骨格の形態および大きさ、四肢骨や手指、肋骨、鎖骨、頭蓋骨の軟骨組織の形成ならびに骨組織の石灰化の程度に関して明確な表現型は認めなかった。また、Yank1 KOマウスの脛骨組織を病理組織学的に検索し、さらに詳細に内軟骨性骨形成過程におけるYank1の関与を検討したが、軟骨細胞の分化、成熟、および一次骨化中心の石灰化の程度に関して明確な表現型を確認できなかった。Yank1 KOマウスにおいて明確な表現型が観察されなかった原因として、他の分子による代償的作用の可能性が推察された。Yank1と高いホモロジーを有し、同じファミリーに属する分子の候補としてYank2が存在する。胎生12.5日齢ICRマウスの生体組織におけるYank2の発現をRT-qPCRにて検索したところ、肢芽組織および脳組織に、Yank2の高い発現を認めた。しかしながら、Yank2の発現は、Yank1のようにBMP2による発現誘導は受けなかった。したがってYank2が、Yank1の機能を代償している可能性が示唆されるが、肢芽組織におけるYank1とYank2の発現制御機構には大きな違いがあると考えられた。

以上の結果より、肢芽細胞においてBMP2にて新規プロテインキナーゼYank1の発現が顕著に誘導され、その発現はSmadシグナル経路を介して制御されることが示された。また、BMP2は肢芽細胞および骨芽細胞特異的に存在する他の因子と協調してYank1の発現を誘導し、軟骨細胞および骨芽細胞の分化に関与している可能性が示唆された。今後、Yank1およびYank2のダブルKOマウスを作製し、その解析が必要であると思われる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 吉 川 浩 史 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	西村 理行
	副 査	教 授	田熊 一敬
	副 査	准教授	伊藤 祥作
	副 査	講 師	佐藤 淳
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究は、内軟骨性骨形成の制御を理解するために、<b>Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)</b> の下流で機能する新規分子の同定とその機能解析を目的として行ったものである。</p> <p>その結果、肢芽細胞に <b>BMP2</b> を作用させ、遺伝子発現プロファイルを検索し、プロテインキナーゼ <b>Yank1</b> の発現が顕著に増加することを見出した。また <b>BMP2</b> による <b>Yank1</b> の発現誘導は、<b>Smad</b> 経路を介していることが明らかとなった。<b>Cas9</b> ゲノム編集法を用いて <b>Yank1</b> 遺伝子欠損マウスを作製しその表現型を解析したが、骨格系には明確な表現型を認めなかった。肢芽組織においては、<b>Yank1</b> と同じファミリーに属する <b>Yank2</b> が高発現しているので、<b>Yank2</b> が <b>Yank1</b> の機能を代償している可能性が示唆された。</p> <p>以上の知見は、<b>BMP2</b> シグナルに関与する新たなシグナル分子の存在と内軟骨性骨形成の理解に新たな指針を提示するものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものである。</p>			