

主論文の要旨

R-spondin 2 facilitates differentiation of proliferating chondrocytes into hypertrophic chondrocytes by enhancing Wnt/ β -catenin signaling in endochondral ossification

R-spondin2 は内軟骨骨化において Wnt/ β -catenin シグナル経路を活性化することで肥大層へむかう増殖層での軟骨細胞の分化を促進する

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻

運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

竹上 靖彦

【諸言】

内軟骨骨化は胎生期の骨格形成に不可欠の過程である。膜性骨化と異なり内軟骨骨化では軟骨細胞が主要な役割を担う。内軟骨骨化の過程は、1)休止層、2)増殖層、3)肥大層、4)石灰化層、5)骨芽細胞による骨化層の5つに分類される。軟骨細胞は成長軟骨板において増殖・分化して休止層、増殖層、肥大層を形成し、最終的にアポトーシス細胞死をして骨芽細胞に置換される。それゆえに軟骨細胞の分化異常はヒト、マウスでの骨・軟骨疾患の原因となる。

軟骨細胞の分化は、転写因子や細胞外基質によって制御されている。特に増殖層においては主たる転写因子であるSox9が軟骨の分化早期に認められる。分化に伴って、Type 2 collagenやAggrecanなどの細胞外基質が生成される。肥大層ではType 10 collagenの分泌が促進され、分化の最終段階ではRunx2の発現が認められる。

軟骨細胞の分化はWntシグナル経路などのいくつかのシグナル経路によっても制御されていることが知られている。WntリガンドはそのレセプターであるFrizzledやLRP5/6に結合することでWntシグナル経路を活性化する。現在までにWntリガンドは細胞内の3つの経路、canonical(古典的)経路であるWnt/ β -cateninシグナル経路、non-canonical経路であるWnt/PCPシグナル経路とWnt/ Ca^{2+} シグナル経路を活性化することが知られている。軟骨細胞においては、軟骨の転写因子であるSox9とWnt/ β -cateninシグナル経路が拮抗的に働くことが知られている。加えて、Wnt/ β -cateninシグナル経路は軟骨細胞の分化を促し、骨化に誘導するように働くこともわかっている。これに対して、non-canonical経路については、Wnt5aがWnt/PCPシグナル経路を通じてType 2 collagenの発現量を制御することが報告されていることを除き、軟骨細胞での働きは明らかとなっていない。

R-spondin (以下Rspoと表記) は4つのドメインを持つタンパクで、Wnt/ β -cateninシグナル経路を活性化することが知られている。Rspoは細胞膜のレセプターであるLGR (Leucine-rich-repeat containing G protein-coupled receptors) 4-6とRNF43(ring finger protein 43)、またはその相同体であるZNRF3(zinc and ring finger 3)と結合し三量体として機能する。RNF43/ZNRF3は単体だとFrizzledやLRPの特異的なE3ユビキチンリガーゼとしてこれらWntリガンドのレセプターを分解する。しかしRspoタンパク質がLGRとRNF43/ZNRF3と三量体を形成すると、RNF43/ZNRF3のリガーゼ活性が低下することによりWntリガンドのレセプターの分解が妨げられ、結果的にWntシグナル経路が活性化することがわかっている。

Rspo2 は生体内において骨格の発達、骨格系の病態に関わっていることが示唆されていた。Rspo2 ノックアウトマウスは肺の低形成のために出生直後に呼吸不全で致死となるが、それ以外に頭蓋変形、四肢の変形を呈することが知られていた。また変形性関節症患者から採取した骨細胞ではコントロール群に比較してRspo2の発現が減少しており、 β -cateninの発現の減少が認められていた。一方、Rspo2は日本人を対象としたGenome-wide association studyで後縦靭帯骨化症の原因遺伝子の候補のひとつであると報告されている。さらにRspo2は*in situ* hybridizationで成長軟骨板において発

現が認められている。以上の事より成長軟骨板の軟骨細胞での機能が予測されていたが、その詳細な解析はなされていなかった。そこで本研究では内軟骨骨化における Rspo2 の機能を解析した。

【対象および方法】

Rspo2 ノックアウトマウスの胎仔を用いて脛骨成長軟骨部に対して、Type 2 collagen、Sox9、Type 10 collagen、 β -catenin の抗体を用いそれぞれ免疫染色を行った。

また、Rspo2 ノックアウトマウスの大腿、上腕などから採取した成長軟骨部を粉碎し、これを Type 2 collagen、Sox9、Type 10 collagen、 β -catenin の抗体を用いて Western blotting を行い成長軟骨部での各タンパク量を定量した。

マウス軟骨細胞株 ATDC5 細胞はインシュリン、トランスフェリン、セレンウムの混合液で処理すると内軟骨骨化における軟骨細胞と同様に段階を踏んで分化することが知られている。各段階に分化したこの細胞を精製したリコンビナントのヒト Rspo2 タンパク質(rhRspo2)で処理し、軟骨形成関連遺伝子、Rspo2 とそのレセプターの遺伝子発現を定量的 PCR 法で、細胞外マトリックス形成をアルシアンブルー染色で評価した。Rspo2 の遺伝子発現をノックダウンするため、Rspo2 に対する ShRNA をレンチウイルス由来で ATDC5 に導入し、軟骨関連遺伝子の発現量を定量的 PCR 法、アルシアンブルー染色にて検討した。続いて Rspo2 タンパク質を処理した ATDC5 に Wnt/ β -catenin シグナル経路に特異的な阻害薬である Quercetin、Wnt/PCP シグナル経路に特異的な阻害薬である SP600125、Wnt/ Ca^{2+} シグナル経路に特異的な阻害剤である KN93 を同時に処理し、軟骨関連遺伝子の発現変化を検討した。

ヒト軟骨肉腫細胞である HCS2/8 に rhRspo2 を各濃度で処理し、細胞の Wnt/ β -catenin シグナル経路の活性化状態を、TOPFlash レポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイにて測定した。

【結果】

免疫染色と Western blotting の解析により、Rspo2 ノックアウトマウスの脛骨成長軟骨部では Type 2 collagen と Sox9 のたんぱく質発現量が野生型マウスに比べて増加していた。これに対して β -catenin のたんぱく質発現量は減少していた。Type 10 collagen の発現量は野生型マウスとの違いが認められなかった(Fig. 1A- H)。たんぱく質の発現量に加えて Rspo2 ノックアウトマウスでは増殖層から肥大層にかけて軟骨細胞の配列に乱れが認められた (Fig. S1A)。

次に、各段階に分化した ATDC5 細胞を用いて、軟骨細胞における Rspo2 の作用を経時的に検討した。定量的 PCR 法により ATDC5 細胞の分化過程において Rspo2 は二峰性の遺伝子発現パターンを示すことが認められ、成長軟骨板での発現パターンとの類似性が認められた。Rspo2 のレセプターの遺伝子では Lgr5 発現が Rspo2 発現と同様のパターンを示した(Fig. 2A-F)。rhRspo2 を初期の分化段階で処理すると、Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の標的遺伝子である Axin2 の発現量が増加した(Fig.

3A)。反対に分化初期の rhRspo2 処理により早期軟骨分化マーカーである Sox9、Col2a1、Acan 遺伝子発現は抑制されていた(Fig. 3B-D)。rhRspo2 を後期の分化段階で処理しても軟骨細胞の後期分化マーカーである Runx2 や Col10a1 遺伝子発現量は変化しなかった(Fig. 3E, F)。分化を始めた直後に 14 日間 rhRspo2 を処理しアルシアンブルー染色を行うと、rhRspo2 処理でその染色性が減少することがわかった(Fig. 3G, H)。これに対して、Rspo2 遺伝子に対する ShRNA にて Rspo2 の発現を抑制した場合、早期軟骨分化マーカーの遺伝子発現が上昇し(Fig. 3 I-L)、またアルシアンブルー染色の増加が認められた(Fig. 3 M, N)。また、各シグナル経路に特異的な阻害薬を rhRspo2 と同時に処理し、早期軟骨分化マーカーの遺伝子発現を測定したところ、Rspo2 処理により抑制されていた軟骨分化マーカーが、Quercetin 処理により回復された(Fig. 4A, B)。最終的にヒト軟骨肉腫由来 HCS2/8 株細胞に rhRspo2 を各濃度で処理し、Wnt/ β -catenin シグナル経路の活性化状態を検討したところ、この軟骨様細胞において rhRspo2 は濃度依存的に Wnt/ β -catenin シグナル経路を活性化することがわかった(Fig. S2)。

【考察】

現在までに、Rspo2はそのノックアウトマウスにおいて左下肢の短縮、四肢の手指、足趾の欠損が認められることから、四肢の形成に必要な因子であることが示唆されていた。一方本研究ではRspo2ノックアウトマウスの右下肢、両上肢において明らかな形態異常の所見を認めないにもかかわらず、Type 2 collagen、Sox9発現量が有意に増加していることがわかった。また内軟骨骨化の軟骨細胞と同様に分化するATDC5細胞でも、Rspo2の過剰処理によって早期軟骨分化マーカーの低下が、反対にRspo2発現を抑制することで早期軟骨分化マーカーの上昇が認められた。以上のことから、Rspo2は軟骨細胞の分化過程においてその分化を制御する因子であることがわかった。

Sox9を過剰発現させると成長軟骨板での軟骨細胞の配列に異常が生じる。これはRspo2のノックアウトマウスの所見とほぼ同様の結果であった。また、Col2aのヘテロノックアウトマウスでは、細胞の形態観察に基づく、休止層と増殖層の区別がはっきりとしなくなることが知られているが、Rspo2ノックアウトマウスではこの区別ははっきりとしていた。本研究結果とこれらの知見からRspo2はSox9とCol2aの発現量を抑制することで、増殖層から肥大層の軟骨細胞への分化を促進していると考えられた(Fig. S3)。

ATDC5細胞でのRspo2発現量は分化誘導開始後5日目が最大となっていた。レセプターとしてはLgr5がRspo2と同時期に発現のピークを示した。このことよりLgr5は軟骨細胞でもRspo2のレセプターとして働いている可能性がある。

阻害剤との実験から、Rspo2 は non-canonical 経路である Wnt/PCP シグナル経路、Wnt/ Ca^{2+} シグナル経路ではなく、主に Wnt/ β -catenin シグナル経路を介して軟骨の分化に関与していることが示唆された。事実ヒト軟骨肉腫由来 HCS2/8 株細胞では Rspo2 は Wnt/ β -catenin シグナル経路を活性化していた。 β -catenin ノックアウトマウスでは Type 2 collagen 発現が過剰に認められ、同時に軟骨細胞の配列に異常が生じる。これ

は *Rspo2* ノックアウトマウスの表現型と類似している。以上の事から *Rspo2* は生体内においても *Wnt/β-catenin* シグナル経路を介して軟骨の分化に関わっていることが示唆された。

【結論】

Rspo2 は胎仔期の内軟骨骨化に伴って分化する軟骨細胞において、*Wnt/β-catenin* シグナル経路を活性化することでこの細胞の分化を制御していることがわかった。