

六反田 賢 論文内容の要旨

主 論 文

(Akt Regulates Skeletal Development through GSK3, mTOR, and FoxOs.)
(GSK3, mTOR, FoxOs を介した Akt の骨格形成機構について)
(六反田 賢、藤田 隆司、金谷 直子、吉田 A カロリーナ、小守 寿人、
劉 文廣、水野 明夫、小守 壽文)

(Developmental Biology・2009年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学 専攻
(主任指導教員：水野 明夫教授)

緒 言

Insulin-like growth factor (IGF) はIGF受容体を介しphosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)を活性化、最終的にAktをリン酸化し活性化する。AktはAkt1, 2, 3からなり、近年報告されたAkt1/Akt2ダブルノックアウトマウスに骨化の遅れが認められ、Aktが骨格形成に重要な分子であることが分かった。しかし、Aktが軟骨細胞の分化・増殖・基質産生にどのような機能を持つか、その機能がどのような下流シグナルによって調節されるかは、全く解明されていない。一方、我々は、Runx2とAktが協調し骨格形成を制御することを報告している。

そこで、Aktを介した骨格形成制御のメカニズムを生体レベルで探るため、Col2a1プロモーター・エンハンサーを用い、軟骨特異的な恒常的活性型Aktトランスジェニック(myrAkt tg)マウスおよび機能不活性型Akt(dn-Akt)tgマウスを作製した。

また、これらAktの機能がどのように発揮されるか、Akt下流シグナル(GSK3、mTOR、FoxOs)の機能を、阻害薬およびアデノウイルスを用いてgain of functionとloss of functionの両面から器官培養にて検討を行った。

対象と方法

軟骨細胞特異的 myrAkt tg マウス、dn-Akt tg マウスを作成し、軟骨細胞の分化・増殖・基質産生をそれぞれ in situ hybridization、BrdU ラベル、safranin O 染色により解析した。

Akt の下流には GSK3、mTOR、FoxOs の 3 つの主要経路があり、リン酸化により mTOR を活性化、GSK3 と FoxOs を不活性化している。長管骨、椎体を器官培養し、アデノウイルスや阻害剤を用いてこれら 3 つの主要経路の機能を検討した。

結 果

myrAkt tg マウスでは、野生型マウスと比較し、長管骨の軟骨は大きくなり、石灰化の遅れが認められ、さらに表現型が強度になると、それに加え骨の長さが短くなった。椎体は大きくなったが、長管骨とは異なり石灰化も促進された。一方、dn-Akt tg マウスは長管骨、椎体ともに著しく骨化が遅れた。これより、Akt は細胞分化に対し、促進的な機能を持つことが分かった。

基質産生について、myrAkt tg マウスは野生型と比べ、長管骨、椎体ともに明らかに増加した。対照的に dnAkt tg マウスでは、野生型と比べ基質産生が低下し、これより Akt は基質産生に対し、促進的な機能を持つことが分かった。

細胞増殖について、myrAkt tg マウスは野生型と比べ、椎体と長管骨の静止軟骨細胞層で細胞増殖が促進したが、長管骨の増殖軟骨細胞層では抑制された。一方、dnAkt tg マウスは野生型と比べ、長管骨・椎体ともに細胞増殖は抑制された。これより、Akt は細胞増殖に対し、促進的な機能を持つことが分かった。

これより、Akt の細胞分化、細胞増殖、基質産生に対する生理的機能は、それらを促進するということが明らかとなった。

Akt は、その下流に GSK3、mTOR、Fox0s の 3 つの主要経路があり、リン酸化により mTOR を活性化し GSK3 と Fox0s を不活性化する。それらの野生型マウスの長管骨における発現パターンは、mTOR の下流分子 p70 S6K、Fox03a が軟骨細胞全域に認められ、GSK3 は静止軟骨細胞層で弱く、増殖軟骨細胞層・肥大軟骨細胞層で強く認められた。それらのリン酸化型も同様の発現パターンを示したが、myrAkt tg マウスでは、野生型と比べより強いリン酸化が認められた。これは軟骨において、3 つの主要経路が Akt の下流で機能することを示している。

次に長管骨、椎体を器官培養し、アデノウイルスや阻害剤を用いて 3 つの主要経路の機能について検討した。器官培養の結果、Akt-mTOR 経路が、細胞分化、細胞増殖、基質産生を促進すること、Akt-Fox0 経路が細胞増殖を促進、細胞分化と基質産生を抑制すること、そして、Akt-GSK3 経路が細胞分化、細胞増殖、基質産生を抑制することが明らかとなった。また、GSK3 の椎体での発現は低く、Akt-GSK3 経路は主に長管骨で作用することが明らかになった。

考 察

長管骨、椎体を器官培養した結果と、tg マウスの Akt が細胞分化、細胞増殖、基質産生を促進するという結果をあわせて考えると、以下のようなになる。

- 1 細胞分化と基質産生は、Akt-mTOR 経路が主要な機能を担う
- 2 細胞増殖は、Akt-mTOR と Akt-Fox0 経路が主要な機能を担う
- 3 Akt-GSK3 経路は、主に長管骨で細胞分化、細胞増殖、基質産生を抑制する。