

高田充歯科基礎医学奨励賞受賞講演

骨芽細胞の分化における PKR の役割について

吉田 賀弥

キーワード: PKR, osteoblast, Runx2, STAT1

Roles of Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase on the Differentiation of Osteoblasts

Kaya YOSHIDA

Abstract: In this study, it was demonstrated that double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) is required for the differentiation of osteoblasts. PKR was expressed on the surface of trabecula in rat tibiae. Dominant-negative mutant PKR cDNA, in which the amino acid lysine at 296 was replaced with arginine and which did not have catalytic activity, was transfected into mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells; thereby establishing cells that stably expressed the PKR mutant gene (PKR-K/R). PKR-K/R mutant cells exhibited up-regulated cell growth and had low alkaline phosphatase (ALP) activity. PKR-K/R mutant cells were not able to form bone nodules *in vitro*. The expression of STAT1 α protein increased in PKR-K/R mutant cells, in which runt-related gene 2 (Runx2)-mediated transcription decreased compared with the levels in control cells. When the expression of STAT1 α protein in PKR mutant cells was suppressed in the presence of STAT1 α siRNA, the activity of Runx2-mediated transcription recovered to the control level. These results indicate that PKR is a stimulator of Runx2 transcription and is a negative modulator of STAT1 α expression. These findings also suggest that PKR plays important roles in the differentiation and calcification of osteoblasts by modulating STAT1 α and/or Runx2 expression.

はじめに

Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) は、ウイルス感染時の免疫応答に関与するセリン・スレオニン蛋白質リン酸化酵素として同定された¹⁾。PKR は 551 アミノ酸からなる分泌型蛋白質で、N 末端に 2 つの dsRNA-binding domain (dsRBD)、C 末端に 1 つの kinase domain を持つ (図 1)。インターフェロン (IFN) によって誘導された PKR は、ウイルス由来の dsRNA と結合すると、kinase domain において自己リン酸化することにより酵素活性を発揮して、基質の 1 つである eIF2 α をリン酸化する。eIF2 α 下流のシグナル伝達経路により感染

した細胞の蛋白質合成は阻害され、感染から宿主が防御される^{2,3)}。

その後の研究により、PKR は IFN 以外の刺激によっても誘導され、複数のシグナル伝達経路を介して、多岐にわたる生命現象を調節することが明らかになった⁴⁾ (表 1)。しかし現在までに PKR と骨代謝の関連についての報告は無い。本稿では我々の研究結果をもとに、PKR が骨芽細胞の分化に及ぼす影響について述べる。

1. 骨組織における PKR の発現

PKR は哺乳類の細胞に恒常的に発現していると報告



図1 PKRの構造
PKRは551アミノ酸から成り、C末端に2個のdsRNA-binding domain (dsRBD)、N末端に1個のkinase domainを有する。

表1 PKRが関与するシグナル伝達経路

| PKRを活性化する因子 | PKRが関与するシグナル伝達経路 | PKRの役割 |
|--|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> double-stranded RNA (dsRNA) lipopolysaccharide (LPS) Cytokines: <ul style="list-style-type: none"> interferons (IFNs) tumor necrosis factor (TNF) interleukin-1 (IL-1) Growth factors: <ul style="list-style-type: none"> platelet-derived growth factor (PDGF) Cell stress <ul style="list-style-type: none"> hydrogen peroxide (H₂O₂) PKR-associated activator (PACT) | <ul style="list-style-type: none"> toll-like receptors (TLRs) interferon regulatory factor-1 (IRF-1) signal transducers and activators of transcription (STAT) mitogen-activated protein kinases (MAPK) activating transcription factor -3 (ATF-3) nuclear factor of kappa B (NF-κB) | <ul style="list-style-type: none"> Anti viral Apoptosis Cell growth Cell differentiation Tumorigenesis |

されているが、これまでに骨組織においてPKRが発現しているという具体的な報告例はない。我々は、研究に先立ちPKRが実際に骨組織に発現しているか否かを調べた。24週令のラット脛骨の凍結組織切片において免疫組織染色を行った結果、PKRは骨端部の骨小柱表面の骨芽細胞に発現していることがわかった(図2)。またウエスタンブロット法により、マウス骨芽細胞株MC3T3-E1細胞やヒト骨肉腫由来細胞株MG63細胞などの株化された培養骨芽細胞にもPKRは発現していた^{5,6)}。

2. 骨芽細胞の増殖や分化に及ぼすPKRの影響

骨芽細胞におけるPKRの役割を検討するために、PKRの機能を欠失したモデルを確立する必要がある。そこで我々は、PKRのkinase domain内の296番目のリジンを変換したPKRのcDNAを、MC3T3-E1細胞に導入しドミナントネガティブに発現するPKR変異細胞株(PKR K/R)を樹立した。PKR変異細胞株では、PKRが自己リン酸化せず、PKRの酵素活性が失活していた⁷⁾。

PKRは細胞増殖を調節するという報告がある^{8,9)}。骨芽細胞の増殖に対するPKRの影響を検討するために、MC3T3-E1細胞とPKR変異細胞の細胞数を経時的に計測した。MC3T3-E1細胞は播種6日目にコンフルエントに達したのに対し、PKR変異細胞はMC3T3-E1細胞と比較して有意に細胞数が増加し、播種5日目にコンフルエントに達した。MC3T3-E1細胞は分化に伴い、紡錘型

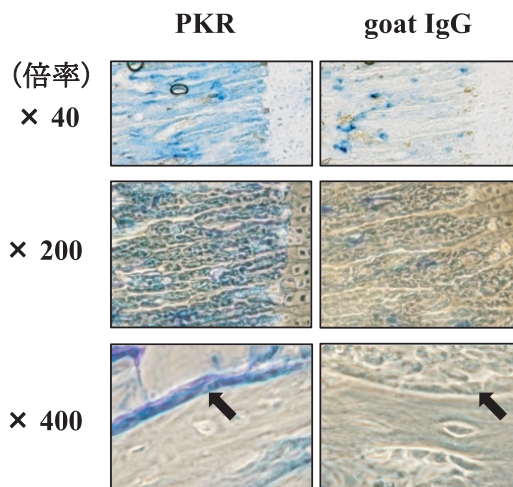


図2 ラット脛骨骨端部におけるPKRの発現
24週令のFisher 344 ratの脛骨を固定・脱灰した後、厚さ7μmの凍結切片を作成した。抗PKR抗体を用いて、ABC法によりPKR蛋白質の発現を検出した。左図において骨小柱周辺の骨芽細胞(矢印)にPKR蛋白質が発現していた。ネガティブコントロールとしてgoat IgGを用いた染色像を右図に示す。

から敷石型へと形態を変える¹⁰⁾。PKR変異細胞はコンフルエントに達しても小型で、不規則な紡錘型の形態を示した(図3)。MC3T3-E1細胞は、コラーゲンの集積や、骨芽細胞の分化マーカーの一つであるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性が抑制されている場合、この

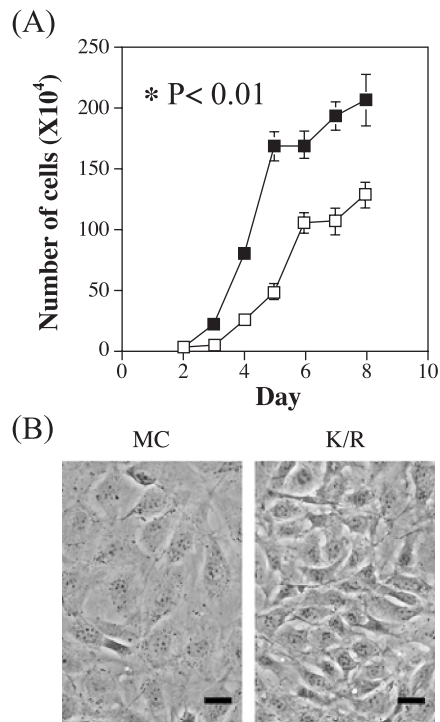


図3 PKR 変異細胞における増殖の亢進と形態変化
A, MC3T3-E1 細胞 (MC, □), PKR 変異細胞 (K/R, ■) を6000 cells/ 35 mm culture dish の濃度で播種した後, 各培養日数時に細胞数を計測した。PKR 変異細胞では細胞増殖が亢進していた。B, PKR 変異細胞は小さく, 不規則な紡錘型の形態を示した。黒バーは10 μ m を示す。(ref. 7より改変)

ような紡錘型の形態を示す¹¹⁾。したがって以上の所見は, PKR 変異細胞は MC3T3-E1 細胞に比較して増殖が亢進し, 脱分化した状態にあることを示している。この可能性を確かめるために, 両細胞における ALP 活性を測定した。培養5日目において PKR 変異細胞の ALP 活性は, MC3T3-E1 細胞に比較して有意に抑制されていた。この傾向は樹立した全ての PKR 変異細胞株において共通していた (図4A)。

MC3T3-E1 細胞は分化すると *in vitro* で石灰化する能力を持つ細胞株である¹⁰⁾。我々は PKR が, MC3T3-E1 細胞における石灰化に影響を与えるかどうかを検討した。MC3T3-E1 細胞を25日間培養すると多数の骨様結節が形成され, von Kossa 染色を行うと茶褐色のスポットとして観察された。このような骨様結節は, 全ての PKR 変異細胞株において観察されなかった (図4B)。以上の結果から, PKR 変異細胞は骨芽細胞としての分化能が低く石灰化に至らないことが明らかになった。よって我々は, PKR は骨芽細胞の分化に必須な因子であると結論した⁷⁾。

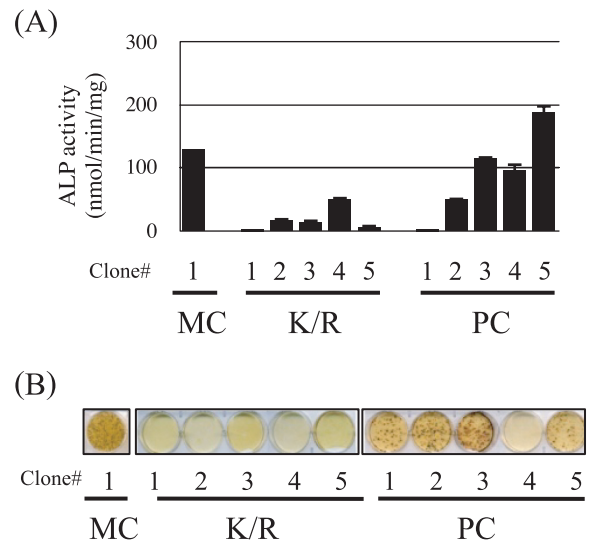


図4 PKR 変異細胞における ALP 活性と骨様結節形成
A, MC3T3-E1 細胞 (MC), PKR 変異細胞 (K/R) を5日間培養し, ALP 活性を測定した。PKR 変異細胞はすべての株において ALP 活性が抑制されていた。PC は MC3T3-E1 細胞に空ベクター (pcDNA3.1) を導入したネガティブコントロール群である。B, MC3T3-E1 細胞 (MC), PKR 変異細胞 (K/R), 空ベクター導入群 (NC) を25日間培養し, von Kossa 染色を行った。PKR 変異細胞はすべての株において石灰化しなかった。

3. PKR による骨芽細胞分化抑制機構における Runx2 の関与

Runt-related gene 2 (Runx2) は, runt domain transcription family のメンバーで, osteoblast-specific *cis*-acting element 2 (OSE2) サイトに結合する転写因子である。osteocalcin や *type 1 collagen*, *bone sialoprotein* などの主要な骨芽細胞特異的な遺伝子のプロモーター領域に結合することや^{12, 13)}, ノックアウトマウスで骨形成が完全に欠失することより, Runx2 は骨芽細胞の分化に必須の因子であると言われている^{14, 15)}。

我々は, Runx2 が PKR による骨芽細胞分化抑制機構に関与している可能性について検討した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に Runx2 の結合サイト (3× OSE2) を含むベクターを構築し, ルシフェラーゼアッセイにより Runx2 の転写活性を測定した。PKR 変異細胞では, MC3T3-E1 細胞に比較して有意にルシフェラーゼ活性が抑制されていた (図6B)。

4. PKR による骨芽細胞分化抑制機構における STAT1 の関与

Signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1) はサイトカインや成長因子受容体の下流で働

く転写因子である¹⁶⁾。STAT1は Janus kinases (JAKs) により活性化されると STAT1 自身や STAT3 と 2 量体を形成し、核へ移行し DNA と結合して遺伝子発現を調節する^{17, 18)}。STAT1ノックアウトマウスにおいて骨量や骨の石灰化度が上昇することより、STAT1 は骨形成において抑制的に働く^{19, 20)}。

STAT は PKR と同様に IFN により誘導され活性化されること¹⁶⁾、PKR は STAT1 と結合し STAT1 の DNA への結合を阻害すること¹⁷⁾ が報告されている。また、LPS により活性化される STAT1 依存性炎症シグナル伝達経路に PKR が必須であるという報告もある¹⁸⁾。これらの所見は、PKR が STAT1/ JAK 経路を調節し得る可能性を示唆している。さらに、STAT1 が Runx2 と結合し Runx の転写活性を抑制するという報告もある²¹⁾ ことから、我々は PKR が STAT1 や Runx2 を介した経路で骨芽細胞の分化を調節するか否かを検討した。5日間培養した MC3T3-E1 細胞および PKR 変異細胞から蛋白質を調製しウエスタンブロットを行った結果、PKR 変異細胞における STAT1 蛋白質の発現が有意に亢進していることがわかった。STAT1 とホモダイマーを形成し DNA に結合すると言われている STAT3 蛋白質の発現量に差はなかった (図 5)。さらに我々は、STAT1 蛋白質の発現亢進が、PKR 変異細胞における骨芽細胞の分化抑制に関与しているかを検討した。PKR 変異細胞における STAT1 蛋白質の発現を抑制するために、STAT1 遺伝子に対する RNA interference (siRNA) を行った。合成した RNA によって、PKR 変異細胞における STAT1 蛋白質の発現は十分に抑制された (図 6 A)。PKR 変異細胞における Runx2 の転写活性は、siRNA 処理により STAT1 蛋白質の発現を抑制すると、MC3T3-E1 細胞と同程度にまで回復した (図 6 B)。以上の結果は、PKR が STAT1 を介して Runx2 の転写活性を調節することで骨芽細胞の分化に関与している可能性を示している。

ま と め

我々の研究の結果より、PKR が骨芽細胞の分化に必要な因子であることが示された。PKR は広範な生理現象をつかさどるが、特に免疫や炎症の過程において中心的に働くと言われている。したがって PKR は、関節性リウマチや歯周炎などの病的な背景を持つ骨代謝を調節する可能性が高く、PKR による骨芽細胞の分化調節機構を解明することが、このような疾患のより深い理解につながると期待できる。本研究により、骨芽細胞において PKR が、STAT1 や Runx2 などの転写因子と協調して機能していることが示唆された。今後 PKR が STAT1 の発現や機能を調節する機序や、PKR が Runx2 以外の骨代謝関連因子の動向に与える影響などをより詳細に究明する予定である。

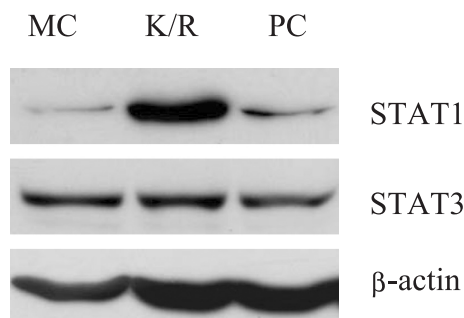


図 5 PKR 変異細胞における STAT 蛋白質の発現
培養 5 日目の MC3T3-E1 細胞 (MC)、PKR 変異細胞 (K/R)、空ベクター導入群 (NC) から蛋白質を調整し、ウエスタンブロット法を行った。PKR 変異細胞では STAT1 蛋白質の発現が亢進していた。STAT3 蛋白質の発現に差は認められなかった。

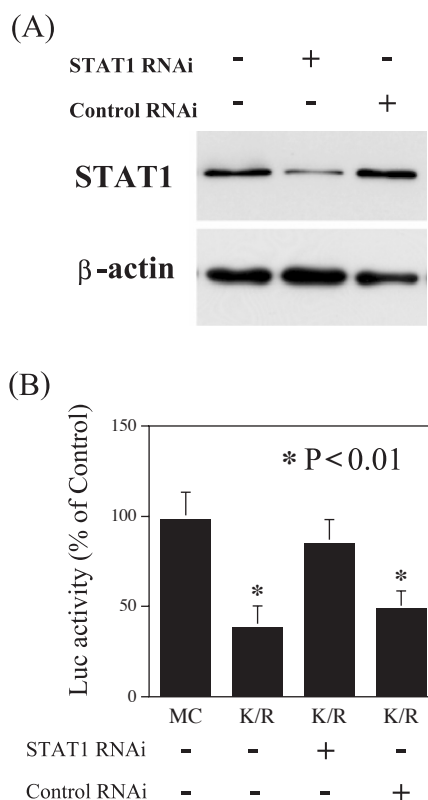


図 6 Runx2 の転写活性に及ぼす STAT1 の影響
A, 培養 5 日目の PKR 変異細胞 (K/R) において、STAT1 siRNA 処理を行った。特異的に STAT1 蛋白質の発現が抑制された。GC 含有比が同等の scrambled RNA をコントロール RNA として用いた。B, siRNA により STAT1 蛋白質の発現を抑制すると、PKR 変異細胞 (K/R) における Runx2 の転写活性は、MC3T3-E1 細胞 (MC) におけるそれと同程度にまで回復した。(ref. 7より改変)

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導・御高閲を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔組織学分野の羽地達次教授に厚く御礼申し上げます。また研究を遂行するにあたり、御助言や御協力を頂きました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔組織学分野の岡村裕彦助教、歯周歯内治療学分野の美原智恵助教に深く感謝致します。数々の御支援を頂いた徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔組織学分野ならびに徳島大学歯学部口腔保健学科の諸先生方、教室員の方々に感謝致します。

参考文献

- 1) Metz DH and Esteban M: Interferon inhibits viral protein synthesis in L cells infected with vaccinia virus. *Nature* 238, 385-388 (1972)
- 2) Hovanessian AG: The double stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon: dsRNA-PK. *J Interferon Res* 9, 641-647 (1989)
- 3) de Haro C, Méndez R and Santoyo J: The eIF-2 α kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J* 10, 1378-1387 (1996)
- 4) García MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C and Esteban M: Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1032-1060 (2006)
- 5) Morimoto H, Okamura H, Yoshida K, Kitamura S and Haneji T: Okadaic acid induces apoptosis through double-stranded RNA-dependent protein kinase/eukaryotic initiation factor-2 α pathway in human osteoblastic MG63 cells. *J Biochem* 136, 433-438 (2004)
- 6) Morimoto H, Ozaki A, Okamura H, Yoshida K, Kitamura S and Haneji T: Okadaic acid induces tyrosine phosphorylation of I κ B α that mediated by PKR pathway in human osteoblastic MG63 cells. *Mol Cell Biochem* 276, 211-217 (2005)
- 7) Yoshida K, Okamura H, Amorim BR, Ozaki A, Tanaka H, Morimoto H and Haneji T: Double-stranded RNA-dependent protein kinase is required for bone calcification in MC3T3-E1 cells in vitro. *Exp Cell Res* 311, 117-125 (2005)
- 8) Chong KL, Feng L, Schappert K, Meurs E, Donahue TF, Friesen J D, Hovanessian AG and Williams BR: Human p68 kinase exhibits growth suppression in yeast and homology to the translational regulator GCN2. *EMBO J* 11, 1553-1562 (1992)
- 9) Meurs EF, Galabru J, Barber GN, Katze MG and Hovanessian AG: Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 232-236 (1993)
- 10) Sudo H, Kodama H, Amagai Y, Yamamoto S and Kasai S: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96, 191-198 (1983)
- 11) Horiguchi Y, Nakai T and Kume K: Effects of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin on the structure and function of osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *Infect Immun* 59, 1112-1116 (1991)
- 12) Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL and Stein GS: Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 14, 1-41 (2004)
- 13) Schinke T and Karsenty G: Characterization of Osf1, an osteoblast-specific transcription factor binding to a critical cis-acting element in the mouse Osteocalcin promoters. *J Biol Chem* 274, 30182-30189 (1999)
- 14) Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL and Karsenty G: Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754 (1997)
- 15) Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S and Kishimoto T: Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764 (1997)
- 16) Darnell JE Jr: STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635 (1997)
- 17) Ramana CVN, Grammatikakis N, Chernov M, Nguyen H, Goh KC, Williams BR and Stark GR: Regulation of c-myc expression by IFN- γ through Stat1-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 19, 263-272 (2000)
- 18) Lee JH, Park EJ, Kim OS, Kim HY, Joe EH and Jou I: Double-stranded RNA-activated protein kinase is required for LPS-induced activation of STAT1 inflammatory signaling in rat brain glial cells. *Glia* 50, 66-79 (2005)
- 19) Schindler C: Cytokines and JAK-STAT signalling. *Exp Cell Res* 253, 7-14 (1999)
- 20) Chen W, Daines MO and Hershey G: Turning off signal transducer and activator of transcription (STAT): the negative regulation of STAT signalling. *J Allergy Clin Immunol* 114, 476-489 (2004)
- 21) Kim S, Koga T, Isobe M, Kern BE, Yokochi T, Chin YE, Karsenty G, Taniguchi T and Takayanagi H: Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Gene Dev* 17, 1979-1991 (2003)