

最近のトピックス

致死型軟骨無形成症の組織異常と細胞内シグナリング

- 小胞体からのアポトーシスシグナルの可能性 -

Histological alterations and cell signaling of thanatophoric dysplasia : Possible involvement of endoplasmic reticulum-derived signal in apoptosis

新潟大学 大学院医歯学総合研究科

加齢・高齢者歯科学分野¹

顎顔面解剖学分野²

新潟大学 超域研究機構³

那須真樹子^{1,2}, 網塚 憲生^{2,3}, 李 敏啓^{2,3},

野村 修一¹, 前田 健康^{2,3}

Niigata University Graduate School

of Medical and Dental Sciences, Division of

¹Oral Anatomy, and Maxillofacial Surgery, and

²Oral Health in aging and fixed Prothodontics.

³Center for Transdisciplinary Research,

Niigata University, Niigata, Japan.

Makiko Nasu^{1,2}, Norio Amizuka^{2,3}, Minqi Li^{2,3}

Shuichi Nomura¹, Takeyasu Maeda^{2,3}

1. はじめに

先天性骨格病変である軟骨無形成症や骨・軟骨異形成症などは、原因遺伝子が特定されているにもかかわらず、その遺伝子変異部位により症状はさまざまである。軟骨無形成症では、軟骨の低形成ばかりでなくアポトーシスが多数認められること、また、軟骨無形成症を発症させる変異遺伝子が小胞体からのシグナル伝達を行うことが明らかにされつつある。一方、小胞体ストレスはアポトーシス誘導シグナルへと変換されるが、軟骨無形成症を誘導する変異型遺伝子がそれを行っている可能性が強い。ここでは、最近の報告にいくつかの我々の所見を加えながら解説する。

2. 軟骨無形成症とは

軟骨無形成症は、四肢短縮型小人症のうちもっとも頻度が高く1万人～2万5千人に一人といわれている。その代表的症状として低身長があげられ、成人男子の平均

身長が130cm、女性で125cm程度にしかならない。外見的には頭囲が大きく鼻が低いという共通の特徴があり、背骨の彎曲が大きく、お尻が出るというような姿勢になる。その他にも、腰痛・関節痛等の障害、および頸椎や大後頭孔が狭いために起こる水頭症をはじめとする脳神経に関する問題、腰椎の狭窄による歩行困難・排泄障害など、多種の重大な問題が報告されている。この疾患の顎顔面領域に対する影響として、合併症の中耳炎により言語能力が後れる可能性、鼻の周囲や顎が狭いための睡眠時無呼吸症、また、顎骨の発達が悪く、歯並びに影響するという報告がある。軟骨無形成症の病因は長い間不明とされていたが、1994年、線維芽細胞増殖因子受容体III型 (FGFR3) の遺伝子異常により軟骨成長が抑制されることが Shiangら¹⁾と Rousseau ら²⁾により、同時にCellとNatureに報告されている。また、この病気の発症は常染色体優性遺伝の様式をとり、原因遺伝子が重複した場合には致死性となり生存率はかなり低いものになる。

3. 軟骨無形成症の発症の分子病理メカニズム

FGFR3は細胞内の2つのチロシンキナーゼ領域、疎水性アミノ酸からなる膜貫通領域、細胞外の3つの免疫グロブリン様構造 (Ig) から構成される糖タンパクである。健常者の場合、FGFR3は線維芽細胞増殖因子 (FGF) を結合させることで二量体となり、レセプターのチロシンリン酸化ドメインを互いにリン酸化し合うことによりシグナル伝達が起きる。現在までに報告されている24種の FGF との結合特異性は複雑であり、FGF9 との特異性が知られている。軟骨無形成症はFGFR3の膜貫通領域のアミノ酸置換 (G380R) で発症し、変異型レセプターはリガンドが結合しなくても活性化された状態 (恒常活性) となり軟骨抑制を誘導する (図1)。また、軟骨無形成症のうちの致死型軟骨無形成症 (TD: Thanatophoric dysplasia) はさらに2つの型に分類することができる。致死型軟骨無形成症I型 (TD type I: Thanatophoric dysplasia type I) は Ig-like domain 2 と3 との間の変異 (R248C) など数箇所の遺伝子変異が確認されている。一方、致死型軟骨無形成症II型 (TD type II: Thanatophoric dysplasia type II) はチロシンキナーゼ領域の変異 (K650E) で生じることが明らかにされている。また同じアミノ酸部位でも変異がK650Mとなった場合は、発達遅延と黒色棘細胞症を伴う軟骨無形成症 (SADDAN: severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans)

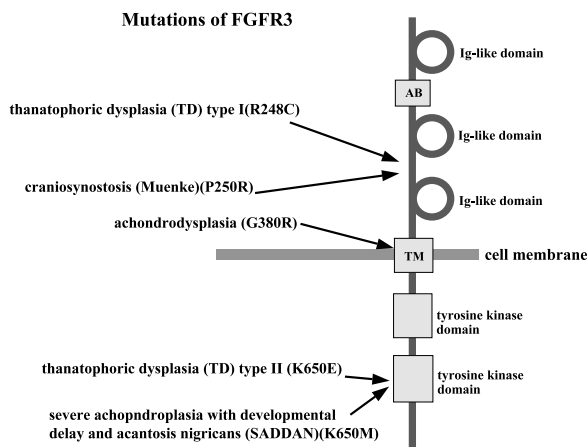


図1：FGFR3における主な変異部位と発症する疾患名を示した図（本文参照）

を発症する。また、TD type IIの場合のシグナル経路については、細胞膜のレセプターに結合したJak（Janus kinase）およびtransducerとactivatorの両方の機能を兼ね備えるstat（signal transducer and activators of transcription）のシグナルがp21WAF1/CIP1により軟骨細胞のcell cycleを強力に抑制することが知られている³⁾。

4．TD typellを発症する変異型FGFR3タンパクの細胞内局在

最近の報告によると、TD typellを発症する変異型FGFR3タンパク（以下、TD II-FGFR3）の細胞内輸送は細胞膜まで輸送されないという^{4,5)}。その説明として野生型FGFR3では完全なリン酸化が起こるのに対し、TD II-FGFR3ではリン酸化が不完全であり、後述するように98Kd、120Kdの分子量を有する未熟なFGFR3タンパクが形成され小胞体の管理機構によって捕らわれてしまうことに起因するらしい。そこで、我々も軟骨細胞であるCFK2細胞を用い、これにTD II-FGFR3 cDNAをtransfectionしたところ、多くが小胞体の一部に塊状にあるいは球状に蓄積される像を確認することができ、その場合にはTD II-FGFR3タンパクは細胞膜まで局在しないことを確認している。

5．小胞体からのシグナル伝達とアポトーシス

そうすると、TD II-FGFR3は小胞体にとどまり、その後どのような動態を示すのであろうか？

それを解説する前に、近年報告されている小胞体からのシグナル伝達、特にアポトーシスとの関連性について

述べたい。細胞内小器官がアポトーシスのセンサーオルガンまたはイニシエーターとして機能することが、近年、明らかにされている⁶⁾。一般的にはアポトーシスにおけるミトコンドリアの役割は大きく、細胞内のアポトーシス誘導シグナルが一度、ミトコンドリアに集約されてから、シトクロームCの流出にはじまりカパーゼ活性という一連の「ミトコンドリア発アポトーシス実行シグナル」へと変換される。ところが、近年、小胞体はストレス応答やコレステロール代謝調節機構のセンターとなっているばかりでなく、アポトーシスのシグナリングとして機能することが示唆されている。

小胞体には品質管理機構（quality control）が存在する。その根拠のひとつとしてGRP78/BiPをはじめとする分子シャペロンやフォールディング酵素が多量に存在しており、合成されたタンパクの折りたたみ構造を効率よく行うことが示唆されている。一方、変異タンパクなどは正常なコンフォメーションをとることが出来ず、小胞内に異常な折りたたみ構造を有するタンパクとして小胞体ストレスを生じさせる。そのような状況が起こると、小胞体には、転写または翻訳レベルで異常タンパクの巻き戻しおよび小胞体へのストレスの軽減化を図る“unfolded protein response (UPR)”の機構、および、異常タンパクをユビキチン化しproteasomeで分解する“endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD)”の機構が発動するという危機管理がなされている。UPRによる転写・翻訳レベルでの調節機構については、それぞれ、小胞体膜貫通型タンパク質キナーゼであるPERKによるeIF2のリン酸化による翻訳抑制、II型の膜貫通型転写因子であるATF6によりXBP-1が小胞体ストレスエレメント（ERSE: endoplasmic reticulum stress response element）に結合する経路、あるいはリボヌクレアーゼIRE1が知られている（詳細は文献7を参照されたい）。

さて、異常タンパクの小胞体への蓄積が起こると小胞体シャペロンであるGRP78/BiPが増加してくるが、強いストレスの場合には小胞体品質管理の限界を超える。その場合、上述のUPRによってアポトーシスを誘導するシグナル経路が示唆されている。特にPERK（PKR-like endoplasmic reticulum kinase）がeIF2のリン酸化が翻訳を抑制する反面、ATF4の発現が亢進し、その結果、CHOPの発現誘導、酸化ストレスを介してアポトーシスが誘導されることが述べられている⁸⁾。一方で、IRE1₁の細胞質領域にTRAF2が結合することが報告されている⁹⁾。TRAF2はTNF受容体に結合しJNK（c-Jun N-terminal kinase）経路を活性化することが知られており、IRE/TRAFシグナルも同様の経路を介すると推測される。また、別の経路として、カパーゼ12を介してアポトーシスを誘導することがknock outマウ

スなどの知見から得られている。従来では、TNF またはFas経路に存在するカスパーゼ8，ミトコンドリアから放出されたシトクロームCによる活性化されるカスパーゼ9の経路が有名であるが，マウスではカスパーゼ12が小胞体膜状に局在し，小胞体ストレス刺激によるアポトーシスを誘導すると考えられている。そのメカニズムとして，小胞体のIP3Rやryanodine receptor (RyR)を通してCaが放出され，活性型カルパインを介してカスパーゼ12の活性化が誘導されるのであろう(図2)。

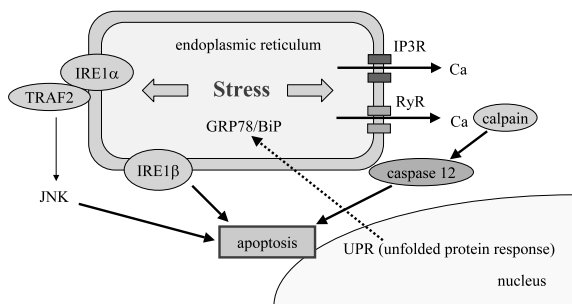


図2：小胞体からのアポトーシスを誘導するシグナル (本文参照)

6. 変異型FGFR3 (TD II-FGFR3) の小胞体局在とアポトーシス

このように小胞体はアポトーシスのセンサーオルガンとして機能するらしい。一方で前述したように，TD type IIにおける変異型 FGFR3 は小胞体への蓄積を示

す。Lievens らによると野生型 FGFR3は HEK293細胞の細胞膜まで移行し，その分子量は成熟型FGFR3として想定される130Kdであるが，TD type IIでは glycosylationを受けていない未成熟な98Kdまたは120Kdの TDII-FGFR3が小胞体に存在し，シャペロンタンパクである calreticulinと結合するという⁴⁾。さらには，リガンドが存在しないにもかかわらず，小胞体に存在する120KdのTDII-FGFR3が stat1のリン酸化を誘導していることが報告されている。興味深いのは，細胞膜まで移行・局在した野生型FGFR3を発現させた場合にはstat1のリン酸化は生じないという。Legeai-Malletらの報告のTD type IIがstat1を介したアポトーシス誘導する所見¹⁰⁾，また，逆にFGFR3 knock outマウスにおけるアポトーシスの減少¹¹⁾，さらにはTDがstat1シグナル/p21WAF1/CIP1を介してアポトーシスを誘導する報告³⁾は，細胞膜からのシグナルよりも，実は小胞体からの異常なシグナル経路による可能性が高いと考えられる。

これに似た現象は，TD type IIばかりではなくSADDAN でも認められる。例えば，マウス FGFR3アミノ酸の644番目(ヒトでは650番目のアミノ酸に相当)における変異が，K644EではTD type II，K644MではSADDAN を，さらにはK644Nでは hypochondroplasia (HCH: 軽度の症状を示す)を発症するが，HCH ではFGFR3タンパクは細胞膜まで輸送されるが，SADDANでは120Kdの未成熟形 FGFR3タンパクとして小胞体に蓄積されるという。さらに，stat1ばかりでなくstat3, 5もリン酸化を受けるが，HCHではそれらのリン酸化型を検出することは出来なかった。

これらの見解に一致して，我々も変異型FGFR3がさ

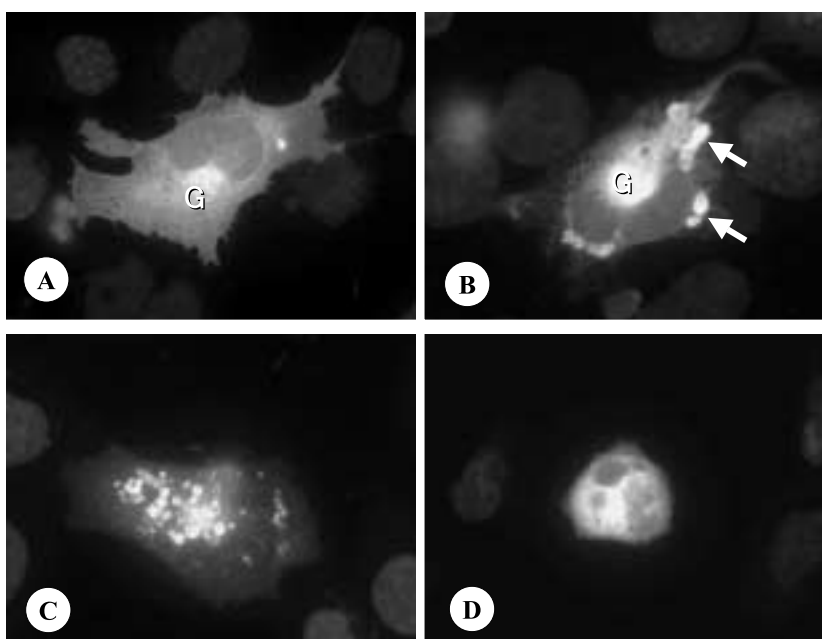


図3：培養軟骨細胞(CFK2)に野生型FGFRα(A)とTDII-FGFR3 cDNA(B-D)をtransfectionsしてFGFR3タンパクの局在を見た蛍光顕微鏡像。野生型FGFR3タンパクはゴルジ体および細胞膜に均一に局在している(A)。しかし，TD II-FGFR3 cDNAを発現させた場合は，変異型FGFR3タンパクは小胞体の一部に塊状の蓄積像(矢印，B)を示したり，また，多数の小胞状構造物に一致して局在する(C)ことが分かる。また，核濃縮を示しアポトーシスが起こりつつあると考えられる細胞においては変異型FGFR3タンパクの局在は不明瞭となる(D)。G:ゴルジ体

さまざまな細胞内局在を示すことを発見した(図3)²⁾。その局在パターンには、野生型FGFR3と同様に主にゴルジ体への集積を示しながらも細胞膜まで輸送されるパターン(野生型FGFR3の場合を含む)、細胞質内の広範に張り巡らされた小胞体の一部へ蓄積するパターン、さらには、多数の大きな小胞状構造が細胞内に存在するパターンがある。また、アポトーシスを起こして細胞体・核の濃縮を示した細胞では、変異型FGFR3の細胞内局在は不明瞭化した。少なくとも、臨床的に重篤な症状を示すTDII-FGFR3では、小胞体内での変異型タンパクの蓄積が認められたが、興味深い点は、小胞体の一部に変異型タンパクを蓄積するコンパートメントを形成すること、また、ラット培養軟骨細胞であるCFK2ではTD II-FGFR3でアポトーシスの発現を確認することが出来たが、Chinese Hamster Ovary (CHO) cellでは、TD II-FGFR3遺伝子をtransfectionしてもアポトーシスを起こす細胞はほとんど検出できなかった¹²⁾。このことは、TD type II, SADDANの小胞体由来のシグナルはある程度cell-specificであることが考えられる。

7. おわりに

ごく最近までの「細胞膜に存在する変異型FGFR3からJak/stat系を介してアポトーシスが誘導される」というシナリオは、今後は訂正が必要かもしれない。しかしながら、ここで問題なのは、変異型FGFR3の小胞体蓄積はstat1を介するとされており、前述のIRE/TRAFシグナル、カスパーゼ12, PERK/eIF2 /ATF4/CHOPを介したものであるか否かについてはまったく解明されていない。特に小胞体内に蓄積された変異型FGFR3がどのようにstat1の核移行を可能にするかは不明である。さらに、小胞体由来のstat1シグナルアポトーシスを誘導するとしたら、Jak/stat系が免疫系細胞であるリンパ球やマクロファージで発見された経緯を考えると、TD type IIあるいはSADDANでは骨髄細胞や破骨細胞といった血球系細胞にもアポトーシスの可能性も出てこよう・・・我々が解明すべきことも膨大に蓄積されているようである。

参考文献

- 1) Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78 (2) :335-342, 1994
- 2) Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*. 371 (6494) : 252-254, 1994
- 3) Su WC, Kitagawa M, Xue N, et al. Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature*. 386 (6622) :288-292, 1997.
- 4) Lievens PM, Liboi E. The thanatophoric dysplasia type II mutation hampers complete maturation of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), which activates signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 278 (19) :17344-17349. 2003.
- 5) Lievens PM, Mutinelli C, Baynes D, et al. The kinase activity of fibroblast growth factor receptor 3 with activation loop mutations affects receptor trafficking and signaling. *J Biol Chem*. 279 (41) :43254-43260, 2004.
- 6) Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*. 3 (11) :E255-263, 2001.
- 7) 一條秀憲ら：小胞体ストレスとアポトーシス *細胞工学* 21 (4), 2004
- 8) Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, et al. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98 (19) :10845-10850, 2001.
- 9) Urano F, Wang X, Bertolotti A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 287 (5453) :664-666, 2000.
- 10) Legeai-Mallet L, Benoist-Lasselin C, Delezoide AL, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutations promote apoptosis but do not alter chondrocyte proliferation in thanatophoric dysplasia. *J Biol Chem*. 273 (21) :13007-13014, 1998.
- 11) Amizuka, N., Davidson, D., Liu, H., et al. Signalling by fibroblast growth factor receptor 3 and parathyroid hormone-related peptide coordinate cartilage and bone development. *Bone*, 34 : 13-25, 2004.
- 12) 那須真樹子, 網塚憲生, 李 敏啓ら：致死型軟骨無形成性症II型における軟骨細胞のアポトーシス. 第46回歯科基礎医学会学術大会・総会, 広島, 2004. 9. 23-25, 歯科基礎医学会雑誌, 46 (5) : 406, 2004.