

軟骨前駆細胞 ATDC5 における FGFR3 のシグナル伝達

——軟骨細胞における FGFR3 の機能と作用機構——

安 倍 慎 一
林 恵 理 子
芦 谷 剛 一
清 水 昭 男
瀬 尾 美 鈴

(平成17年3月10日提出)
(平成17年12月12日修正)

要 旨

線維芽細胞増殖因子受容体3 (FGFR3) は軟骨細胞の増殖抑制, 分化の調節に関わっていることが知られている。頭蓋骨以外の骨, 特に長骨などの形成, 伸長は軟骨原基の軟骨内骨化によりおこる。軟骨原基内の成長板において軟骨分化が秩序だてて起こっており, その精密な分化の調節により正常な長さの骨を作ることが出来る。FGFR3 の変異による過剰な FGFR3 のシグナルは, 成長板における軟骨分化のバランスを著しく乱し, 四肢が短くなるなどの症状を呈する軟骨無形成症を引き起こす。FGFR3 は軟骨細胞に STAT1 を介した経路での CDK インヒビター p21^{CIP1} の発現を誘導することにより, その増殖を抑えることが報告されている。しかし, その詳細なシグナル伝達機構はあまりよく分かっていない。

本研究において *in vitro* で軟骨の分化を再現できる能力のある ATDC5 細胞を用いることにより FGFR3 の軟骨細胞における機能と作用機構について明らかにしようとした。未分化状態の ATDC5 細胞は FGF 刺激により増殖が促進されるが, FGFR3 を安定発現させた ATDC5 細胞では FGF 刺激により著しく増殖が抑制された。またその時, 著しい形態の変化が見られ細胞接着が剥がれ丸くなった。そして, それらと同調して p21^{CIP1} の発現が誘導されていた。この時の細胞内のシグナル経路を調べたところ, STAT1 が活性化されていたのに加え, MAPK である ERK1/2 も長時間にわたり強く活性化されていた。このことから, ATDC5 細胞における FGFR3 によるシグナルの ERK1/2 経路の作用を調べたところ, 特異的なインヒビターで ERK1/2 の活性化を阻害することにより, p21^{CIP1} の発現が抑えられることがわかった。またさらに, mouse の FGFR3 の C 末端部位を human の相同する部位と置き換えたキメラレセプターによるシグナルでは, STAT1 のチロシンリン酸化, ERK1/2 の活性化が, mouse の FGFR3 と比較しても差が見受けられないのに p21^{CIP1} の発現が見られなかった。このことによりその他の重要な経路の存在が示唆された。そのため, FGFR により活性化されることが知られている PKC や Src に対するインヒビターを用いてその経路を阻害した。興味深いことに, こちらでも p21^{CIP1} の発現が抑えられた。この時 ERK1/2 の活性化に影響はなかった。さらに興味深いことに, これらのインヒビターすべてにより STAT1 のチロシンリン酸化が抑えられていた。これらの結果より, ATDC5 細胞における FGFR3 の p21^{CIP1} の発現を誘導するシグナル伝達は, STAT1 を軸とした様々な経路の関わる機構

により制御されていることがわかった。軟骨細胞においても、同様の機構が働いていることが示唆された。

目 次

1. 序論
 2. 略語表
 3. 結果
 - 3.1 ATDC5 細胞における FGFR3 と MHR3 の安定発現
 - 3.2 R3 発現細胞は FGF1 刺激により p21^{CIP1} を発現し完全に増殖が停止する
 - 3.3 R3 細胞と MHR3 細胞の STAT1 と ERK1/2 の活性化に差は見られなかった
 - 3.4 FGFR3 による CDK inhibitor p21^{CIP1} の発現誘導には複数の細胞内シグナル伝達経路が関与している
 4. 考察
- 引用文献

1. 序 論

多種類の細胞で構成されている多細胞生物が成り立つためには、個々の細胞が正常に増殖、分化しお互いが緊密に情報を交換することで各々の役割を果たすことが必須である。ポリペプチド性の細胞増殖因子群は細胞においてオートクライン、パラクライン的に働きシグナルを伝達し、そのための厳密な細胞情報の伝達と調節に深く関わっている。細胞増殖因子の1つである線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor: FGF) も細胞の増殖、分化、移動などを誘導することにより、発生、創傷治癒、血管新生などに関わっている [1]。また、FGF シグナルの異常によりガンの増殖や血管新生にも関与する [1]。FGF が細胞に対し働きかけるためには細胞にその受容体である FGF Receptor (FGFR) を必要とする。FGF と FGFR はそれぞれ遺伝子ファミリーを形成しており、FGF は現在までに23種類が同定されている。FGFR は膜貫通型としては4種類 (FGFR1~4) が同定されている。FGFR は免疫グロブリンスーパーファミリーに属している膜1回貫通チロシンキナーゼ供役型の受容体で、細胞外領域に3つの免疫グロブリン (Ig) 様ドメイン、IgI, IgII, IgIIIを持つ。IgI と IgIIの間にはアシッドボックス領域とその下流にヘパリン結合領域を持つ。膜貫通領域をはさみ細胞内領域にはチロシンキナーゼを持つ。

FGFR の変異により遺伝性の骨系統疾患を生じる事が知られている。FGFR1, FGFR2 の変異はそれぞれ Pfeiffer 症候群, Crouzon 症候群などで認められ、いずれもが頭蓋骨結合早期癒合症などの症状を呈している [2,3]。FGFR3 の変異では軟骨無形成症や致死性骨異形成症 (TDI, TDII) を生じる

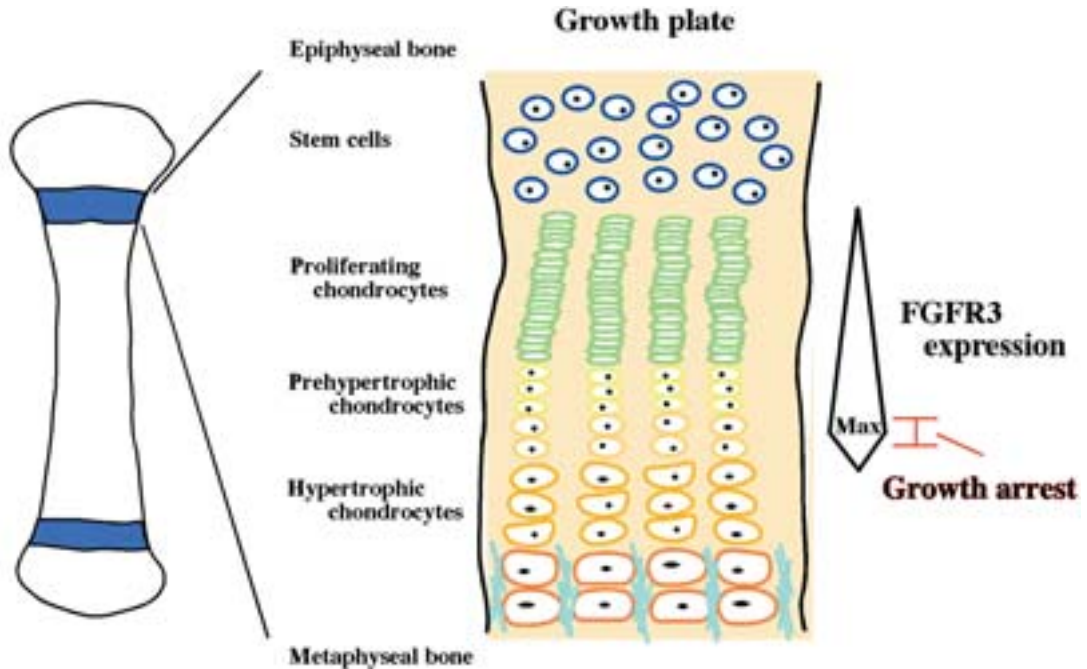
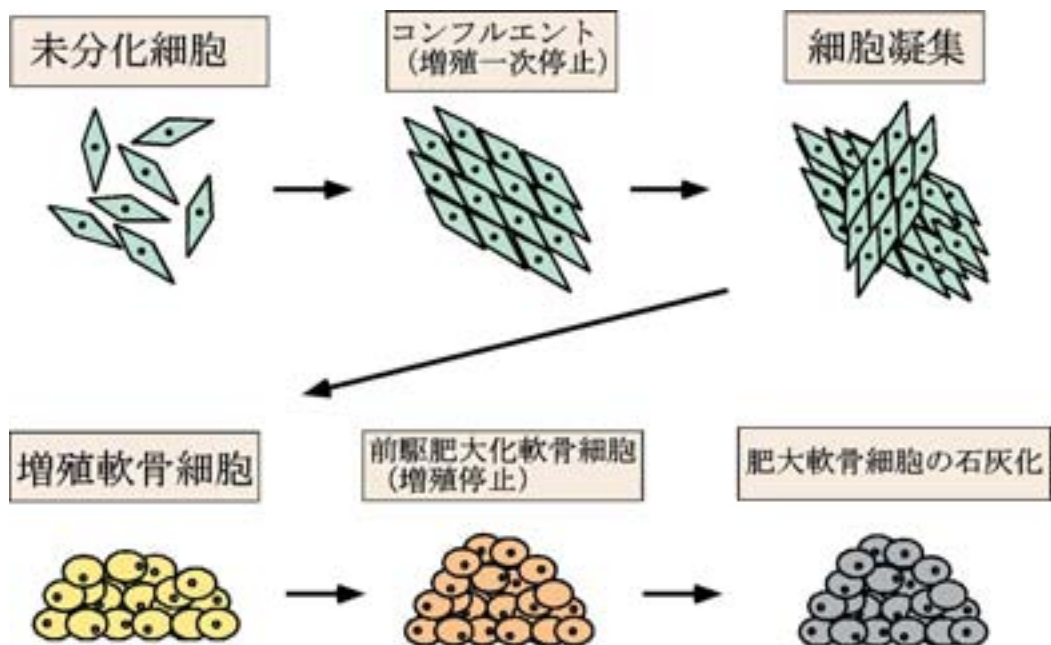


図1 成長板での軟骨分化と ATDC5 細胞の分化

A. 長骨における成長板 (Growth plate) での軟骨分化の模式図

図の左側に示した長骨の絵の青色で示した部位が成長板である。右側が成長板を模式的に示した拡大図である。成長板では、幹細胞から分化した増殖軟骨細胞が増殖し、その後肥大化軟骨細胞へと分化し、肥大化し、最後に石灰化が起こる。最終的にこの石灰化した部分から骨に置き換えられる。成長板での軟骨細胞の増殖や、肥大化が骨の発生や伸長に決定的な役割を果たしている。図の右側に成長板の軟骨分化に伴った FGFR3 の発現量の変化を示した。このように、FGFR3 は増殖軟骨細胞で発現し始め、前駆肥大化軟骨細胞で発現量が最大となる。発現が最大となると同時に増殖停止が起こり、肥大化軟骨細胞へと分化する。

[4]. 軟骨無形成症は、手足が極端に短くなる小人症を呈し、大きな頭、背腰部の後彎、小肢症、大きな腹部、泉門の癒合遅延などがみられる。致死性骨異形成症も軟骨無形成症と似通った症状を呈するが、致死性が高く、胎生致死性を示す [4]。これらは FGFR3 の点変異によって起こることが分かっており、いずれもレセプターの機能亢進型の変異である。点変異の種類により機能亢進の強度が変わり、それが症状の重度に影響する。又、*fgfr3* ノックアウトマウスでは軟骨の過剰発育により長骨の伸長が促進されることがわかっている [5]。頭蓋骨などを除いた骨の形成はほとんど軟骨内骨化によって起こる。これは、軟骨細胞で作られた軟骨原基によって骨の原型が作られ、最終的にそれが骨に置き換わるという骨形成の様式である。軟骨原基内の成長板と呼ばれる部位で幹細胞が軟骨細胞へと分化し、次に増殖軟骨細胞、続いて肥大化軟骨細胞となり最後に石灰化が起こる [6] (図1-A)。最終的にこの石灰化した部分に血管が侵入し、骨へと置換される。長骨も軟骨内骨化により形成され、上記の FGFR3 が原因の疾患やノックアウトマウスの例によって FGFR3 が、成長板での分化で軟骨細胞の増殖を負に調節することに関わっていることがわかる。これに加え、近年では FGFR3 が、軟骨細胞の増殖を抑制するだけでなく、成長板における軟骨細胞の複雑な分化段階の調節に寄与してい



B. ATDC5 細胞の軟骨分化の模式図

ATDC5 細胞は、培養皿中でインスリン存在下でコンフルエントに達した後も増殖する。その後さらに凝集し軟骨結節を形成する。この軟骨結節の中心付近は前駆肥大化軟骨期に入っており次第に増殖が停止する。さらに分化段階が進むと基質小胞を介した軟骨基質の石灰化が起こる。このように ATDC5 細胞は A の図の成長板と同様な軟骨分化を *in vitro* で再現できる細胞である。

ることが分かってきており、FGFR3 が四肢などの骨形成により深く関わっていることが示唆されている [7]。

FGFR3 が長骨形成に関わっていることは分かっているが、FGFR3 が軟骨細胞に作用し特徴的な反応を引き起こす際の分子的な機構はまだ不明な点が多い。そこで、本研究において FGFR3 の軟骨細胞における細胞内シグナル伝達の様式を明らかにしようと試みた。そのために実験材料として適したマウス胚性腫瘍由来の ATDC5 細胞を用いた [8]。ATDC5 細胞は軟骨分化能を持つ細胞で、未分化状態から増殖軟骨細胞、肥大化軟骨細胞、そして石灰化といった軟骨分化を *in vitro* で再現できる細胞株である [9]。図 1-B に示すように ATDC5 細胞はインスリン存在下でコンフルエントに達した後も増殖する。その後さらに凝集し軟骨結節を形成する。この軟骨結節の中心付近は前駆肥大化軟骨期に入っており次第に増殖が停止する。ATDC5 細胞は軟骨結節を形成し始めるとコンドロイチン硫酸鎖をもつアグリカンと呼ばれるプロテオグリカン、そして II 型コラーゲンを発現する。肥大化軟骨期には X 型コラーゲンを発現するようになる。さらに分化段階が進むとアルカリホスファターゼの活性の著名な上昇に伴って基質小胞を介した軟骨基質の石灰化が起こる。私どもの研究室での以前からの研究により、未分化状態の ATDC5 細胞では発現されていなかった FGFR3 が分化段階を経るにしたがって発現してくることを示した [10]。生体内の成長板でも FGFR3 は分化段階初期の軟

骨細胞で発現され始め、そして肥大化軟骨細胞となると発現が無くなる [11]. ATDC5 細胞が先程から述べている完全型の FGFR3 だけでなく、アシッドボックスを欠損した新規のアイソフォームを発現していることが私どもの研究室により発見された [10]. しかもそのアイソフォームは未分化状態の ATDC5 細胞に発現していた. 現在, アシッドボックス欠損型アイソフォームの詳細な機能については研究中である.

FGF が細胞表面上の FGFR に結合すると FGFR は二量体化し, それにより, 細胞質ドメインでは自己及び互いのチロシン残基のリン酸化が起こる. リン酸化チロシン残基に結合する Src ホモロジー領域 2 (SH2) ドメインやリン酸化チロシン結合 (PTB) ドメインを有する様々なタンパク質が FGFR に引き寄せられる. これらのタンパク質は FGFR の基質としてリン酸化されるか, そうでないものはアダプタータンパク質としてその他の標的タンパク質を引き寄せる. PLC γ , Src, Crk などがこれにあたる. その他に主要な細胞内シグナル伝達経路として, チロシン残基のリン酸化非依存的に FGFR に結合していると言われている FRS2 と呼ばれる足場タンパク質を仲介して, Ras-Raf-MAPKK-MAPK の経路にシグナルを伝達する. 又, 非免疫系細胞における活性化の機構はまだ定かではないが, 転写因子である STAT (signal transducer and activator of transcription) をリン酸化する経路も重要である [12,13]. このように FGFRs は細胞内で多くの経路を用いてシグナルを伝えている.

FGFR3 は STAT1 を介して軟骨細胞に p21^{CIP1} の発現を誘導し増殖を抑制すると報告されている [13]. しかし, それ以外のシグナル伝達経路について詳細な点は明らかになっていない. 私どもの研究室の研究においても, 以前から, 未分化状態の ATDC5 細胞に FGFR3 を安定発現させることによって, FGF 刺激により STAT1 が活性化され, p21^{CIP1} の発現が誘導されて細胞の増殖が著しく抑制されることを示した [14]. 又その時, 細胞の形態にも著しい変化が見られ, 接着が剥がれ丸くなった. そして, 古典的 MAPK である ERK1/2 の活性化を調べたところ, 長時間の活性化が起こっていることが分かった. そこで, 本研究において, ATDC5 細胞を用いて, 軟骨細胞における FGFR3 の機能とシグナル伝達機構の関係を解明しようとした. その結果, STAT1 の活性化には ERK1/2 の経路をはじめとしてその他のシグナル伝達経路の活性化も同時に必要であることを示した.

2. 略語表

BSA: bovine serum albumin

BPB: bromophenol blue

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture
F-12(Ham) (1:1)

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ERK1/2: extracellular-signal regulated kinase 1/2

FBS: fetal bovine serum

FGF: fibroblast growth factor

FGFR: FGF receptor

FRS2: FGFR substrate 2

GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

NP-40: nonidet P-40

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PKC: protein kinase C

PMSF: phenylmethylsulfonylfluoride

PVDF: polyvinylidene fluoride

Rb: retinoblastoma protein

RT: reverse transcription

SDS: sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Sox9: SRY (sex determining region Y)-box 9

STAT: signal transducer and activator of transcription

3. 結果

3.1 ATDC5 細胞における FGFR3 と MHR3 の安定発現

図1-Aに示すように、四肢における長骨の形成は軟骨内骨化によっておこる。軟骨内骨化とは、軟骨細胞で作られた軟骨原基によって骨の原型が作られ、最終的にそれが骨に置き換わるという骨形成の様式である。軟骨原基内の成長板と呼ばれる部位で幹細胞が軟骨細胞へと分化し、次に増殖軟骨となり続いて肥大化軟骨細胞となり最後に石灰化が起こる(図1-A)。この石灰化した部分に血管が侵入し、骨へと置換される。FGFR3の変異が原因となる軟骨無形成症や致死性骨異形成症などの骨格形成異常やノックアウトマウスの実験によって、FGFR3は成長板における軟骨細胞の増殖を負に調節することがわかった[4,5,13]。FGFR3の発現は増殖軟骨細胞で発現し始め、次第に発現が高くなり、増殖を完全に停止する前駆肥大化軟骨細胞においてその発現が最大となることから、成長板における軟骨細胞の増殖停止とFGFR3の発現とが一致している。

軟骨の発生過程におけるFGFR3の作用を調べるため、軟骨細胞のモデル細胞であるATDC5細胞にmouse FGFR3を安定発現したクローンが、当研究室において以前に樹立された[14]。ATDC5細胞は、*in vitro*における軟骨細胞モデルとして、FGFR3の作用機構を分子レベルで解明するため

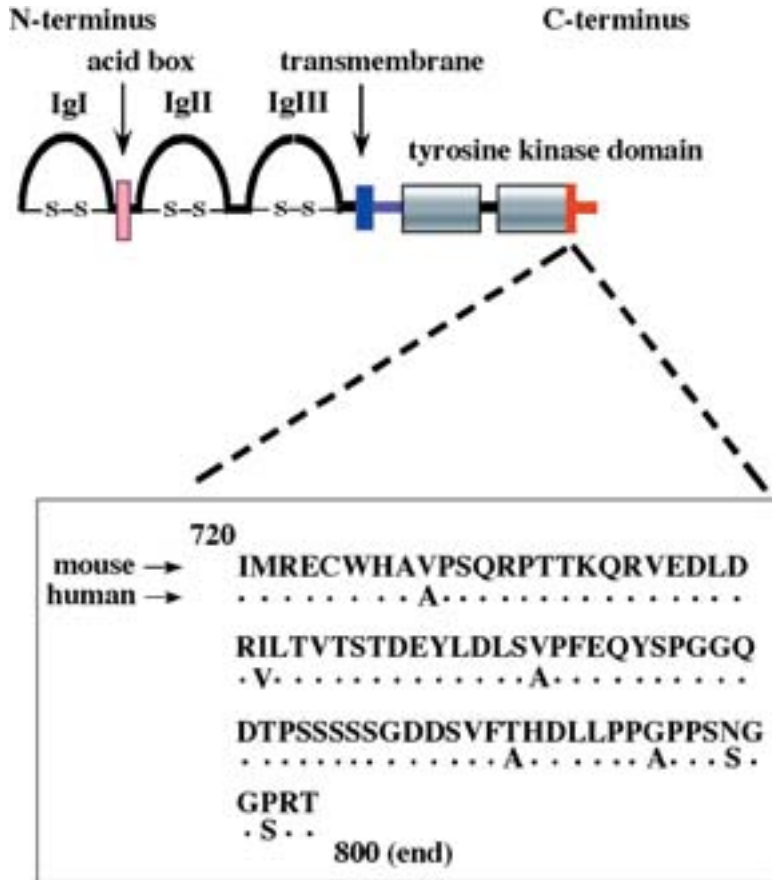


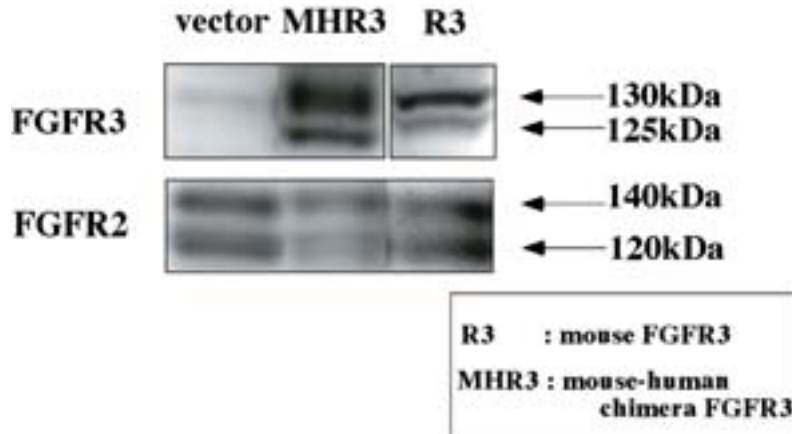
図2 ATDC5細胞におけるFGFR3とmouse-human chimera FGFR3の安定発現

A. Mouse-Human FGFR3 (MHR3) の組み換えアミノ酸配列

Mouse FGFR3 のC-末端 (AA720-AA800) 81個のアミノ酸配列を human のアミノ酸配列と置換した。そのうち異なるアミノ酸数は7個である。上段が mouse のアミノ酸配列で、下段は human のアミノ酸配列である。

に非常に優れた系である [9]。未分化の ATDC5 細胞は、軟骨前駆細胞であり、未だに II 型コラーゲンなど軟骨細胞のマーカー遺伝子を発現していないが、in vitro で培養を継続することによって、図 1 -B に示すように次第に増殖軟骨細胞、前駆肥大化軟骨細胞を経て、肥大軟骨細胞まで協調して分化することが出来る。未分化状態の ATDC5 細胞は内因性の FGFR1、FGFR2 そして当研究室で発見されたアシッドボックスを欠損した FGFR3 Δ AB を発現しているが FGF 刺激により増殖が顕著に促進される。一方、完全型の FGFR3 を安定発現させた ATDC5 細胞は FGF 刺激により増殖が著しく阻害されることがわかった [14]。

本研究において FGFR3 が細胞増殖を抑制する機構を明らかにする目的で、FGFR3 を安定発現しているクローン細胞を用いて、その細胞内シグナル伝達について解析した。さらに、mouse FGFR3 の作用と比較する目的で、mouse FGFR3 (R3) のC-末端領域を human FGFR3 の相同する領域とを



B. ウェスタンブロットニングによる FGFR2 と FGFR3 の検出

Vector, MHR3, R3 を安定発現させた各々のクローン細胞を RIPA バッファーにて溶解し, 全タンパク質を抽出した。そして各タンパク質量60 μ g を SDS-PAGE で分離しウェスタンブロットニングした。抗 FGFR2, FGFR3 抗体により検出した。

置き換えた mouse-human chimera FGFR3 (MHR3) を安定発現させたクローンを用いた [34]. MHR3 が作成された理由は, FGFR3 に対する市販の抗体が, human FGFR3 に比べ R3 に対して極端に感度が低いため, FGFR3 を安定発現させ研究することに困難を生じたためである. 近年は tag を付けた遺伝子の発現が多く行われているが, C-末端側, または N-末端側に tag を付けることにより, FGFR3 と相互作用するタンパク質に変化が生じることを避けるため, 今回は tag を付けなかった. MHR3 の組み換えられたアミノ酸数は81個であり, その中の24個のアミノ酸がチロシンキナーゼ部位の一部に含まれる. また組み換えられた部位には2つのチロシンが含まれている (Y754, Y764). Mouse と human の組み換え部位の間で7個のアミノ酸が異なっていた (図2-A). これら2種類の FGFR3 と control として空のベクター (pBK-RSV) を導入し, G418 による選択によって得られた安定発現クローンそれぞれの FGFR の発現をウェスタンブロットニングにより調べた (図2).

3.2 R3 発現細胞は FGF1 刺激により p21^{CIP1} を発現し完全に増殖が停止する

ATDC5 細胞に FGFR3 を安定発現することによって, FGF 刺激によりその増殖がどのように影響されるか調べた. Vector のみを導入した ATDC5 細胞 (Vector 細胞) では, FGF1 刺激後3日目までの細胞の増殖が, 非添加時の細胞数 (no addition) を100%とするとその163% \pm 9.29に促進された. 一方, R3 安定発現 ATDC5 細胞 (R3 細胞) では FGF1 刺激により増殖が停止し (非添加時の27% \pm 2.22), 形態の著しい変化 (接着の剥がれ) が起こった [14] (図3-A). MHR3 安定発現 ATDC5 細胞 (MHR3 細胞) の増殖は FGF1 刺激により非添加時の57% \pm 5.69に抑制されたが, R3 細胞の方がより強く増殖が抑制されることが分かった. さらに FGF1 刺激後5日目では, R3 細胞は3日目と比べて全く増殖していなかった. しかし, MHR3 細胞は非添加時よりは速度は遅いものの増殖していた

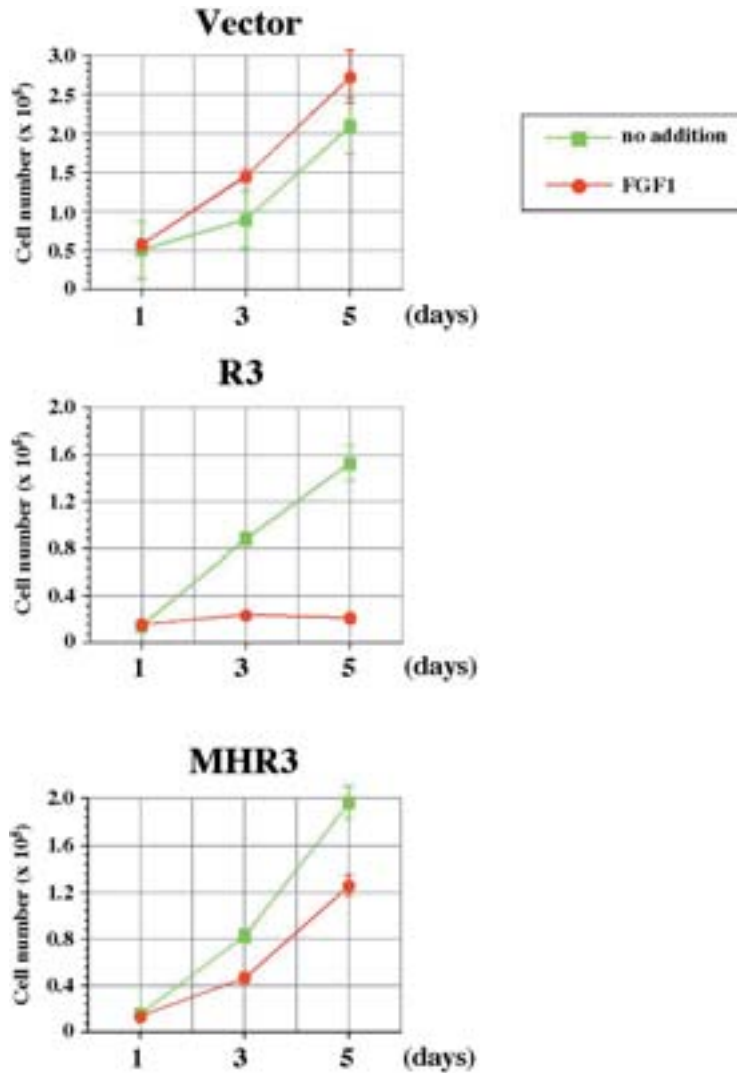


図3 FGF1 刺激による R3, MHR3 発現細胞の増殖抑制と形態変化

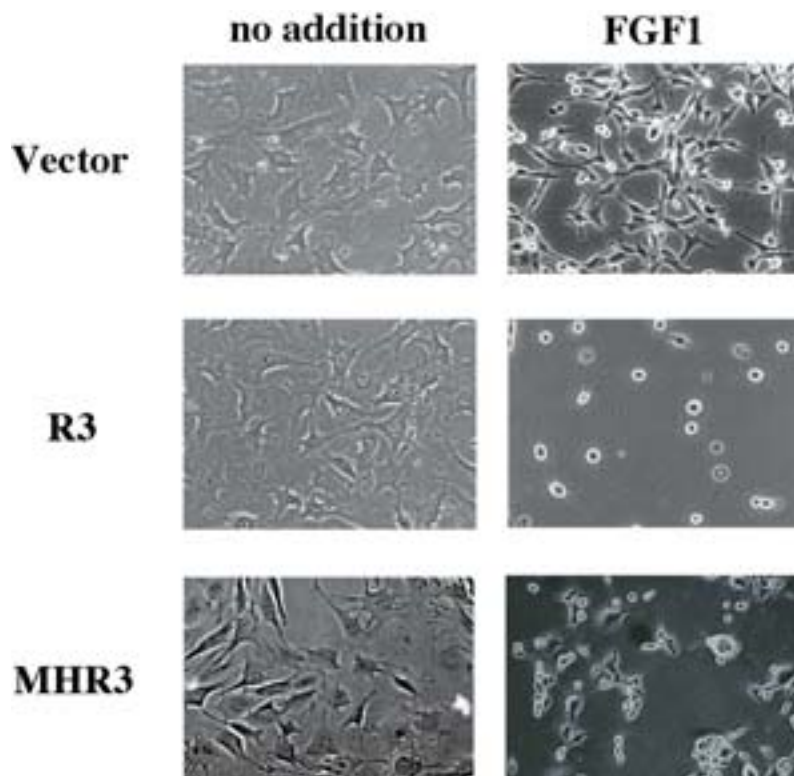
A. FGF1 刺激による増殖抑制効果

Vector, R3, MHR3 細胞それぞれを 5% FBS を加えた DMEM/F12 中に 6×10^3 個/ウェル/500 μ l (24穴培養皿) の密度で播種し、次の日に FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μ g/ml) を添加し、CO₂ インキュベーター内で 37°C, 5% CO₂ 下で培養した。図に示した日数後に細胞を回収し、コールターカウンターで細胞数を計測した。グラフの各点は3つの独立した実験の平均値を示し、その標準誤差を縦軸方向に示した。

(図3-A).

形態の変化についても、R3 細胞は FGF1 刺激によって3日後には接着が剥がれ完全に丸くなったが、MHR3 細胞は形態の変化は見られるものの丸くなるまでは極端に変化しなかった(図3-B).

次に、このような違いがなぜ生じたのか調べるため、FGF1 刺激による p21^{CIP1} タンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより調べた。p21^{CIP1} は、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) のインヒ



B. FGF1 刺激による形態の変化

Vector, R3, MHR3 細胞を FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μ g/ml) で刺激し、3 日後の細胞の形態を位相差顕微鏡で撮影した (倍率 100X)。

ピターであり、細胞周期の G1 期から S 期への移行を阻害することにより、細胞増殖を阻害する [15,16]。軟骨細胞においても、その発現が前駆肥大軟骨細胞の増殖停止の原因となっていることが示されている [16]。その結果、図 4 に示すように、R3 細胞では FGF1 刺激 1 日後から p21^{CIP1} タンパク質の発現が見られた。しかし、Vector 細胞と MHR3 細胞では p21^{CIP1} タンパク質の発現は認められなかった (図 4-A)。これらの結果は、R3 細胞の FGF1 刺激による強い増殖抑制は p21^{CIP1} タンパク質の誘導が原因であることを示唆している。

次に、これらの細胞で、p21^{CIP1} タンパク質が認められなかったのは、転写レベルでの誘導が見られなかったためなのか、翻訳レベルでの誘導がなかったためなのか、調べようとした。RT-PCR によって p21^{CIP1} の転写レベルを確かめた所、R3 細胞では FGF1 刺激後 3 時間で既に p21^{CIP1} mRNA の発現が認められたが、MHR3 細胞では転写の誘導も見られなかった (図 4-B)。

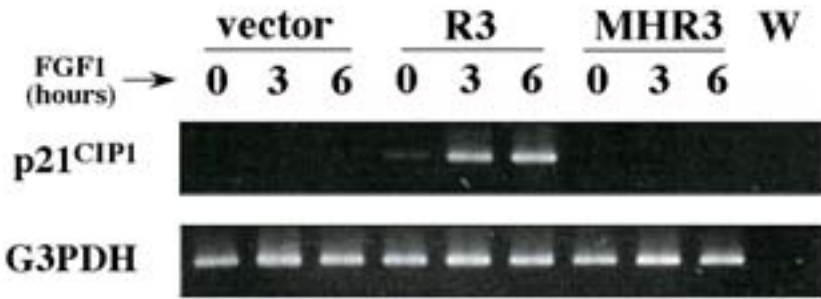
そこで、R3 細胞と MHR3 細胞の細胞内シグナル伝達の差異を探ることで FGFR3 による p21^{CIP1} の発現を誘導する細胞内シグナル伝達、ひいては軟骨分化における細胞内シグナル伝達についてより詳細に調べられるのではないかと考え、FGF1 刺激による R3 発現細胞と MHR3 発現細胞のシグナ



図4 FGF1 刺激による R3, MHR3 細胞における p21^{CIP1} の発現

A. FGF1 刺激による p21^{CIP1} タンパク質発現の誘導

各クローン細胞を FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μg/ml) で刺激した。図に示した日数後に RIPA バッファーにより全タンパク質を抽出し、SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングを行った。抗体は抗 p21^{CIP1} 抗体を使用した。



W : Water

B. p21^{CIP1} の転写の誘導

各クローン細胞を FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μg/ml) で刺激した。図に示した時間後にそれぞれの全 RNA を抽出した。p21^{CIP1} に対する特異的なプライマーを用いて、それぞれの全 RNA について RT-PCR を行った。

ル伝達を比較した。

3.3 R3 細胞と MHR3 細胞の STAT1 と ERK1/2 の活性化に差は見られなかった

FGFR3 からのシグナルが p21^{CIP1} の発現を誘導するために、細胞質に存在する転写因子 STAT1 を介した経路が必須であることは序論でも述べた。そこで、R3 細胞と MHR3 細胞の間で STAT1 の活性化に差が無いか比較した。それぞれの細胞と Vector 細胞を FGF1 刺激し、図 5-A に示した時間毎に全タンパク質を回収し SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングにより、STAT1 のチロシンリン酸化を比較した。その結果、R3, MHR3 細胞のどちらでも、STAT1 のチロシンリン酸化が Vector 細胞よりも強く、FGF1 刺激24時間後でも持続的に活性化されていることがわかった (図 5-A)。

細胞質の STAT1 はチロシンリン酸化されると核に移行することが知られている。興味深いことに、p21^{CIP1} の mRNA の発現が見られない MHR3 細胞でも STAT1 のチロシンリン酸化が強く起こって

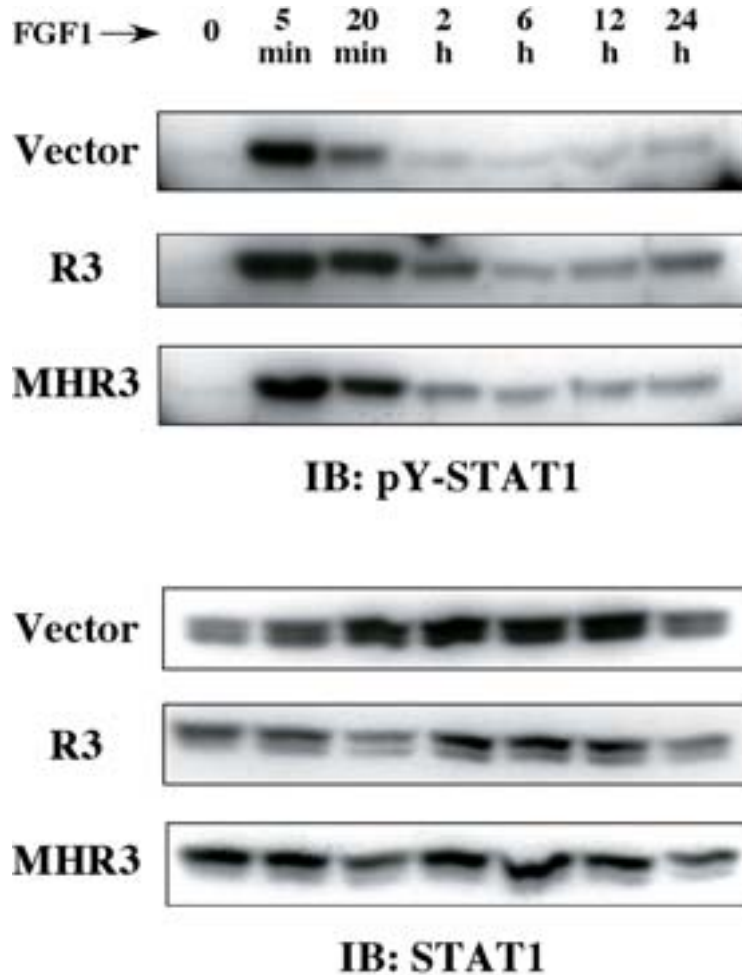
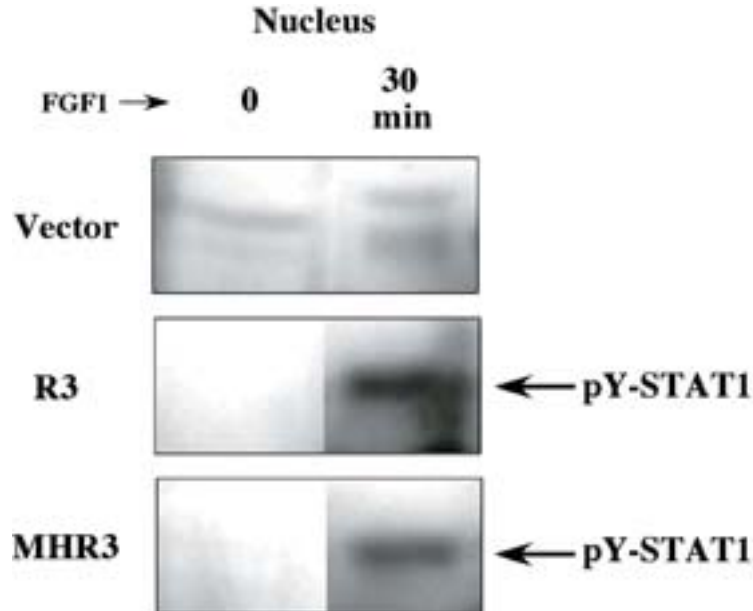


図5 FGF1 刺激による STAT1 の活性化

A. STAT1 のチロシンリン酸化

各クローン細胞を FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μg/ml) で刺激した。図に示した時間後に RIPA バッファーにより全タンパク質を抽出し、SDS-PAGE, ウェスタンブロットティングを行った。抗体は抗 phospho-STAT1 (Tyr701) 抗体を使用した (上のパネル)。同様のサンプルをウェスタンブロットティングし、抗 STAT1 抗体を用いて検出した (下のパネル)。

いたことから、次に STAT1 が FGF1 刺激後に核に移行しているかどうかを確かめた。細胞を FGF1 刺激後、核画分を分離し、SDS-PAGE, ウェスタンブロットティングを行い抗チロシンリン酸化 STAT1 抗体にて調べた (図 5-B)。その結果、R3, MHR3 細胞とも FGF1 刺激30分後にチロシンリン酸化 STAT1 の核移行が見られた。細胞質画分では STAT1 は抗 STAT1 抗体では検出されたが抗チロシンリン酸化 STAT1 抗体では検出されなかったため (データは示さず)、チロシンリン酸化 STAT1 はリン酸化された後速やかに核に移行しているものと思われる。これらの結果から、FGFR3 は R3, MHR3 とも、FGF1 刺激後 STAT1 のチロシンリン酸化を誘導し、その核移行も引



B. チロシンリン酸化STAT1の核への移行

各クローン細胞を FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μ g/ml) で刺激した。図に示した時間後に細胞を回収し、細胞核を分離し、核に含まれるタンパク質を抽出した。そしてタンパク質60 μ g を SDS-PAGE で分離し。抗 phospho-STAT1 (Tyr701) 抗体を使用し、ウェスタンブロットティングにより検出した。

き起こすことは出来るが、何らかの原因で MHR3 細胞では p21^{CIP1} の転写を誘導することが出来ないことが分かった。

STAT1 に加え、近年では古典的 MAPK である ERK1/2 の経路についても軟骨細胞における FGFR3 の作用に重要であることが報告されてきている [7,17,18]. そこで、ERK1/2 の活性化についても、R3 細胞と MHR3 細胞の間で差が無いかどうかを比較した。上記と同様に、細胞を FGF1 刺激し、図 6 に示した時間毎に全タンパク質を回収し SDS-PAGE, ウェスタンブロットティングにより、ERK1/2 の活性化を検出した。その結果、ERK1/2 に関しても、Vector 細胞と比較すると、R3, MHR3 細胞と同様に、強く、24時間後でも持続的に活性化されていることがわかった (図 6-A)。

ERK1/2 もチロシンリン酸化 STAT1 と同様に核に移行し、核内の転写因子をリン酸化して間接的に転写を促進することが重要な役割の1つである。よって、ERK1/2 についても、FGF1 刺激後に核に移行しているか確かめた。活性化 ERK1/2 に関しては細胞質にも大量に存在するため STAT1 と同様の方法では検討することが難しかったので、免疫染色法によって活性化 ERK1/2 の核移行を調べた (図 6-B)。その結果 R3, MHR3 細胞とも FGF1 刺激後15分で活性化 ERK1/2 の核移行が見られた。FGF1 刺激後15分において Vector, R3, MHR3 細胞のどれもで活性化 ERK1/2 の核への移行が見られた。60分では Vector 細胞ではほとんど活性化 ERK1/2 は消失しているのに対して R3, MHR3 細胞では核ではなく、細胞質でのみ活性化 ERK1/2 が観察された。この結果はウェスタンブ

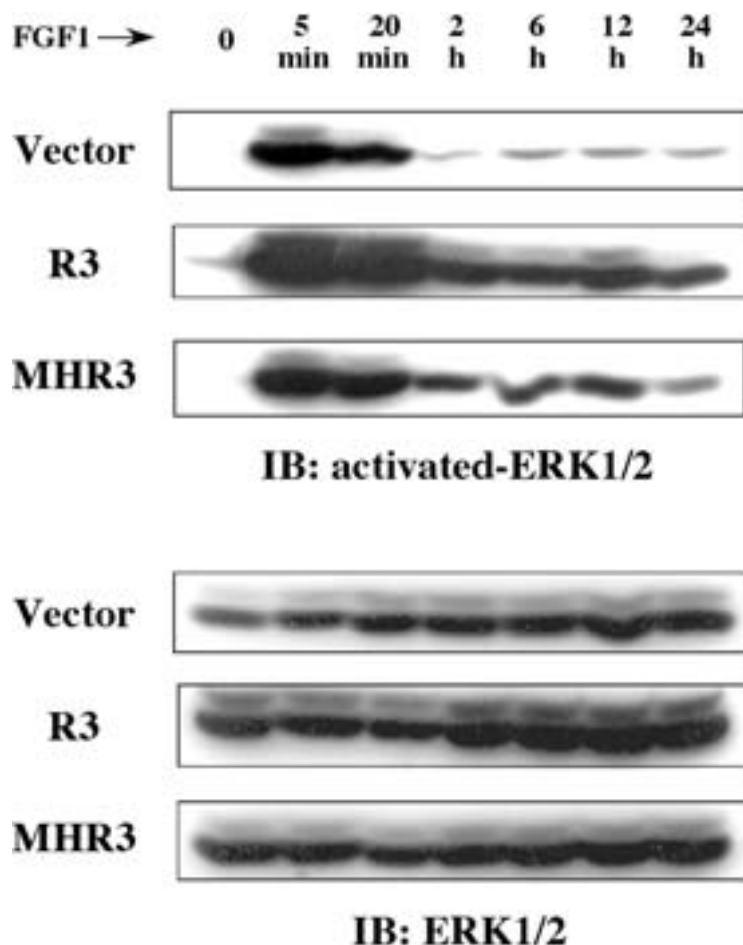


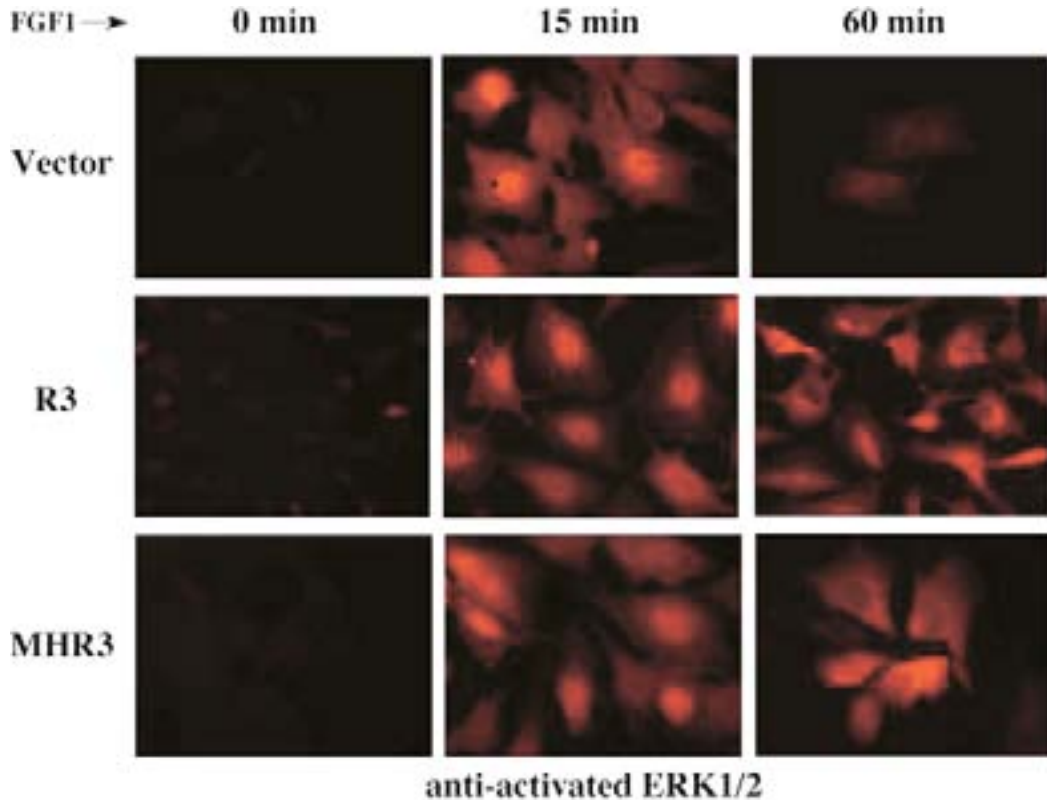
図6 FGF1 刺激による ERK1/2 の活性化と Sox9 の誘導

A. ERK1/2 の活性化

各クローン細胞を FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μg/ml) で刺激した。図に示した時間後に RIPA バッファーにより全タンパク質を抽出し、SDS-PAGE, ウェスタンブロットティングを行った。抗体は抗 activated ERK1/2 抗体を使用した (上のパネル)。同様のサンプルを抗 ERK1/2 抗体を用い検出した (下のパネル)。

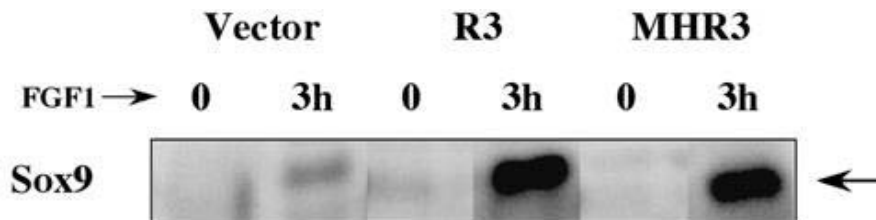
ロットティングの結果と一致しており、FGFR3 による ERK1/2 の持続的な活性化によって ERK1/2 が細胞質内でも働いている可能性を示唆している。以上の結果より、R3, MHR3 細胞間に ERK1/2 の FGF1 刺激後の核移行にも差がないことが示された。

次に、活性化 ERK1/2 が実際に転写を促進しているかを調べた。そのために、各々の細胞が FGF1 刺激により Sox9 と呼ばれる転写因子の発現を引き起こすかどうかで判断した。Sox9 は軟骨分化に必須であり、軟骨前駆細胞と軟骨細胞で発現されているが肥大化軟骨細胞では全く発現がなくなるという特徴的な転写因子である [19]。Sox9 は軟骨細胞を FGF2 刺激することにより発現され、そしてそれは ERK1/2 経路依存的に起こることが報告されている [7,19]。そこで私は Sox9 の発現を指標にして ERK1/2 が実際に遺伝子の転写を活性化しているかどうかを調べた。各々の細胞を



B. 活性化 ERK1/2 の局在

各クローン細胞を FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μg/ml) で刺激した。図に示した時間後に細胞を固定し、免疫染色を行った。1次抗体は抗 activated ERK1/2, 2次抗体は Alexa Fluor 594 抗マウス IgG を用いた。赤く染色されているのが活性化 ERK1/2 である。



C. Sox9 の発現誘導

各クローン細胞を FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μg/ml) で刺激した。図に示した時間後に RIPA バッファーにより全タンパク質を抽出し、SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングを行った。抗体は抗 Sox9 抗体を使用した。

FGF1 で 3 時間刺激した後に全タンパク質を抽出し、SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングを行い、抗 Sox9 抗体で検出した。その結果 Vector 細胞では Sox9 はほとんど発現されなかったが、R3, MHR3 発現細胞ともに高レベルの Sox9 の発現が見られた (図 6-C)。

以上これらの結果をまとめると、MHR3 は STAT1 のチロシンリン酸化と核移行, ERK1/2 の活性化と核移行については R3 と同等に作用できることがわかった。しかしながら、p21^{CIP1} の発現を誘

導することはできないことが分かった。

3.4 FGFR3 による CDK inhibitor p21^{CIP1} の発現誘導には複数の細胞内シグナル伝達経路が関与している

いままでの結果から、MHR3 細胞と R3 細胞は STAT1 のチロシンリン酸化, ERK1/2 の活性化とそれぞれの核移行を同程度引き起こすことが出来るにも関わらず, p21^{CIP1} の発現誘導に大きな差があることがわかった。そこで, FGFR3 が活性化し p21^{CIP1} の発現を誘導するシグナル伝達経路として, STAT1 や ERK1/2 以外にも重要な役割を果たしている経路があるのではないかと考え, プロテインキナーゼインヒビターを用いた実験を行って, これを確認しようとした。

プロテインキナーゼ C (PKC) と非受容体型チロシンキナーゼである Src は, FGFR によって活性化される。そして, それぞれ膵臓癌細胞やマウス線維芽細胞において p21^{CIP1} の発現誘導に関連している例が報告されている [20,21]。そこで, ATDC5 細胞においてもこれらの経路が関係していないか調べた。PKC, Src に対してはそれぞれへの ATP 結合阻害剤である Bis I (Bisindolylmaleimide I) もしくは PP2 を加えて阻害した。R3 細胞を FGF1 刺激する30分前に各々のインヒビターを細胞に添加し, そして FGF1 刺激5分後と24時間後に細胞の全タンパク質を回収し, SDS-PAGE, ウェスタンブロットングを行った。驚いたことに, ERK1/2 に対するインヒビター U0126 だけでなく, PKC, Src それぞれに対するインヒビター Bis I, PP2 においても同様に p21^{CIP1} の発現の抑制が見られた (図7-A)。しかしこれらのインヒビターでは ERK1/2 の活性化は抑制されていないため, ERK1/2 経路とは独立した経路が p21^{CIP1} の発現に関わっていることが示唆された。そして, さらに興味深いことには, これら全てのインヒビターは STAT1 のチロシンリン酸化に影響していた (図7

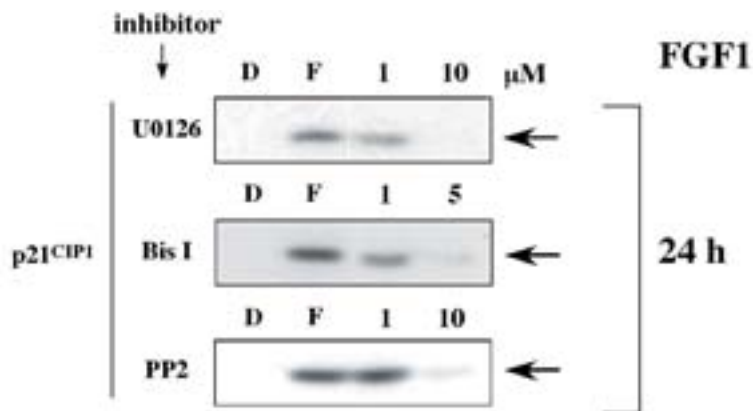
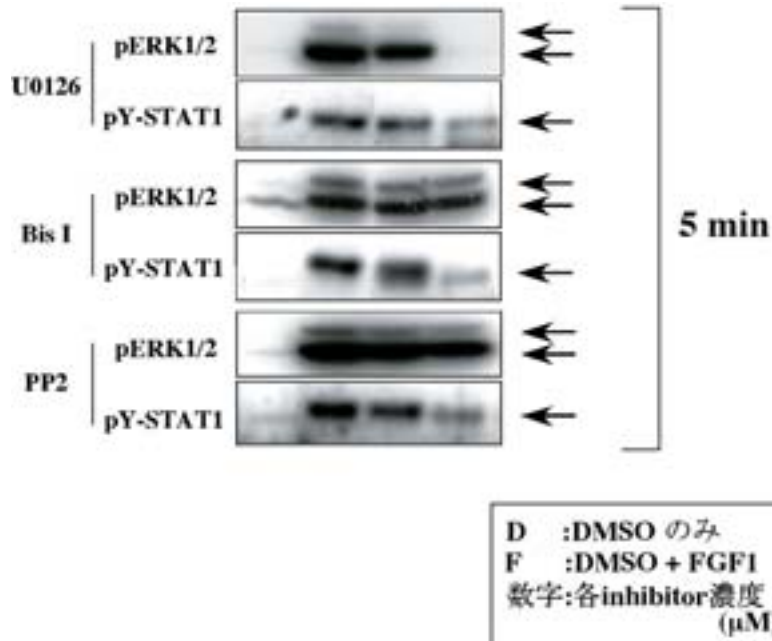


図7 ERK1/2, PKC, Src に対するプロテインキナーゼインヒビターによる p21^{CIP1} 発現と STAT1 チロシンリン酸化の阻害

A. ERK1/2, PKC, Src に対するインヒビターによる p21^{CIP1} タンパク質発現の阻害

R3 細胞を図に示した濃度のインヒビター, もしくはインヒビターと等量の DMSO で処理し, 30分後に FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (1 μg/ml) で刺激した。その24時間後に RIPA バッファーにより全タンパク質を回収し, SDS-PAGE, ウェスタンブロットングを行った。抗体は抗 p21^{CIP1} 抗体を使用した。

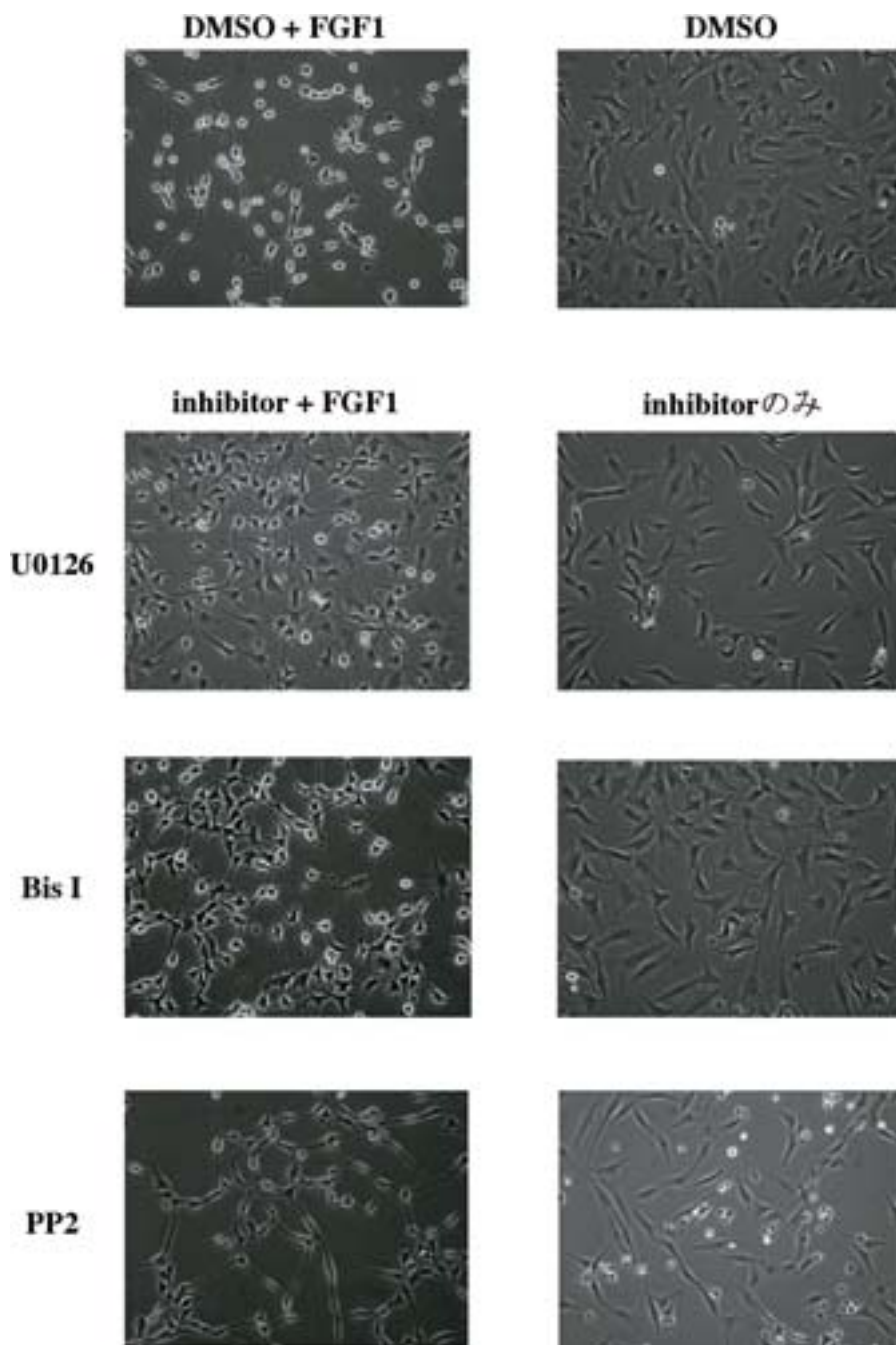


B. ERK1/2 の活性化と STAT1 のチロシンリン酸化に及ぼす ERK1/2, PKC, Src インヒビターの影響
 A と同様に R3 細胞を処理し, FGF1 (10 ng/ml) とヘパリン (10 μg/ml) で刺激した。その 5 分後に RIPA バッファーにより全タンパク質を回収し, SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングを行った。抗体は抗 activated ERK1/2 抗体もしくは抗 phospho-STAT1 抗体を使用した。

-B). 図 7-A でタンパク質を回収する前に細胞の形態を撮影した写真が図 7-C である。興味深いことに, それぞれのインヒビターにより FGF1 刺激による R3 細胞の形態の変化も p21^{CIP1} の発現と同調して抑えられていた。

4. 考 察

FGF, FGFRs は四肢の形成, 伸長に関わっている。その中で, FGFR3 は軟骨分化, 正常な軟骨原基の形成に深く関わっていることが知られている [6]。FGFR3 は軟骨の分化段階に沿って発現が上昇し, 肥大化軟骨細胞まで分化したときにその発現がみられなくなる [11]。このことは FGFR3 が軟骨分化の前半の段階に関わっていることを示唆している。FGFR3 の細胞膜貫通領域 (G380R) に点変異が生じると軟骨無形成症を呈する。その大きな特長は, 体幹は正常であるが極端に手足が短くなることである [4]。これらの点変異は FGFR3 の恒常的な活性化を引き起こすことがわかっている [4]。また, *fgfr3* ノックアウトマウスでは四肢などの骨の過剰な発育が見られる [5]。四肢の長さは骨に置き換えられる前の軟骨原基の伸長に影響される。よって, 正常な FGFR3 の作用は軟骨原基の伸長を抑制することであることが予想された。実際に, FGFR3 は軟骨細胞に CDK インヒビター p21^{CIP1} の発現を伴う増殖抑制を引き起こす [13]。また, p21^{CIP1} の発現を誘導するには STAT1 の経



C. 細胞の形態変化に及ぼす ERK1/2, PKC, Src インヒビターの影響
A と同様の細胞を, タンパク質を回収する前に撮影した。

路が必要であることが以前からわかっている [12]. しかし, FGFR3 の引き起こす軟骨細胞での増殖抑制についての詳細な分子機構はまだ多くは分かっていない. そこで, 軟骨細胞における FGFR3

の機能とシグナル伝達機構の関係をより詳細に解明しようとした。

本研究室で、mouse の FGFR3 の C-末端領域を human の FGFR3 の相同する領域と置き換えた MHR3 を作成し、その MHR3 を安定発現させたクローンである MHR3 細胞を、mouse の FGFR3 を安定発現させた R3 細胞と比較したところ、FGF 刺激に対する反応が弱いことが示された [34]。FGF1 刺激により、Vector 細胞では刺激後 3 日目までの細胞の増殖が非添加時に比べて促進されたのとは逆に、R3 発現細胞は刺激後 5 日目でも完全に増殖が停止していた。一方、MHR3 発現細胞は 3 日目以降徐々に細胞の増殖は回復していった (図 3-A)。さらに、FGF1 刺激による形態の変化にも違いがあり、R3 発現細胞は細胞の接着が剥がれ完全に丸くなるのに対し、MHR3 発現細胞では形態に変化は見られるものの R3 発現細胞の様に接着がはがれることはなかった。

以上の結果から、各々のクローン細胞の p21^{CIP1} タンパク質の誘導に違いが見られないか調べた。予想されたように、R3 細胞では FGF1 刺激 1 日後から p21^{CIP1} タンパク質の発現が見られた。しかし、Vector 細胞と MHR3 細胞では p21^{CIP1} タンパク質の発現は認められなかった (図 4-A)。このことから ATDC5 細胞が FGFR3 の作用によって増殖を完全に抑えるためには p21^{CIP1} タンパク質の誘導が必要であることが示された。又、これらの細胞で RT-PCR によって p21^{CIP1} の転写レベルを確かめた所、R3 細胞では FGF1 刺激後 3 時間で既に p21^{CIP1} mRNA の発現が認められたが、MHR3 細胞では転写の誘導も見られなかった。このことにより MHR3 細胞では p21^{CIP1} 遺伝子の転写誘導が起こっていないことが分かった。

p21^{CIP1} の発現誘導の重要性は、ATDC5 細胞が軟骨細胞に分化する際に p21^{CIP1} の発現誘導が必須であることを示した他の研究者によっても報告されている [22]。これと上記の結果から、p21^{CIP1} の発現による強力な増殖抑制が軟骨分化に重要な役割を担っていることが示唆された。そこで、R3 細胞と MHR3 細胞の細胞内シグナル伝達の差異を探ることで FGFR3 による p21^{CIP1} の発現を誘導する細胞内シグナル伝達、ひいては軟骨分化における細胞内シグナル伝達についてより詳細に調べられるのではないかと考え、FGF1 刺激による R3 発現細胞と MHR3 発現細胞のシグナル伝達を比較した。

まずは、R3 細胞と MHR3 細胞の間で STAT1 の活性化に差が無いか比較した。その結果、R3 細胞と MHR3 細胞の両方で、FGF1 刺激による STAT1 のチロシンリン酸化は Vector 細胞よりも強く、FGF1 刺激 24 時間後でも持続的に活性化されていた (図 5-A)。STAT1 はチロシンリン酸化されると二量体化することにより核へと移行し、転写因子として働く。R3 細胞と MHR3 細胞では STAT1 のチロシンリン酸化に差はなかったため、次にチロシンリン酸化 STAT1 の核への移行に差が無いかどうか確かめた。その結果、FGF1 刺激後 30 分で R3 細胞と MHR3 細胞どちらも同様にチロシンリン酸化 STAT1 が核画分に検出され、STAT1 の核移行についても R3 細胞と MHR3 細胞に差が無いことが分かった (図 5-B)。

近年では ERK1/2 の経路が、軟骨細胞における FGFR3 の作用に重要であることが報告されてきている [7,17,18]。そこで、ERK1/2 の活性化が R3 細胞と MHR3 細胞の間で差が無いか比較した。結果、ERK1/2 に関しても STAT1 と同様に R3 細胞と MHR3 細胞の両方で、FGF1 刺激 24 時間後

でも持続的に活性化されていることがわかった (図 6-A). ERK1/2 も核移行し, 転写因子のリン酸化を介して転写を促進する. よって, 活性化 ERK1/2 の核移行についても免疫染色法にて調べた. 活性化 ERK1/2 は FGF1 刺激後15分で Vector 細胞, R3 細胞, MHR3 細胞の全てで核への移行が見られ, R3 細胞と MHR3 細胞の間に差は見られなかった (図 6-B). 又, FGF1 刺激後60分では Vector 細胞ではほとんど活性化 ERK1/2 は消失しているのに対して R3, MHR3 細胞では核ではなく, 細胞質でのみ活性化 ERK1/2 が観察された. この結果は図 5-A の結果と一致しており, FGFR3 による ERK1/2 の持続的な活性化によって ERK1/2 が細胞質内でも働いている可能性を示唆している. ERK1/2 が活性化されているのに, 長時間の刺激後では核内に活性化 ERK1/2 が見られない理由は核内の ERK1/2 特異的ホスファターゼである MKP1 の作用によるものであるという報告がある [23].

さらに, 軟骨特異的な転写因子 Sox9 の発現を指標に, 各クローン細胞の活性化 ERK1/2 が軟骨細胞における転写促進の機能を有しているかどうかを調べた. この結果も, Vector 細胞では Sox9 はほとんど発現されなかったが, R3, MHR3 発現細胞ともに高レベルの Sox9 の発現が見られ, 二つの細胞に差が見られなかった (図 6-C). この結果は Sox9 の発現誘導は FGFR2 ではなく FGFR3 からのシグナル特異的に起こることを示したものである. そして MHR3 は ERK1/2 の活性化において R3 と同様に活性化できることを表している.

以上のことから MHR3 細胞は R3 細胞と同様に STAT1, ERK1/2 の活性化を引き起こすことが示された. しかし, それにも関わらず MHR3 細胞では p21^{CIP1} の発現誘導が起こらない. そのため, p21^{CIP1} の発現を誘導するためには STAT1 や ERK1/2 以外にも重要な経路があるのではないかと考え, p21^{CIP1} の発現誘導に関連している例がヒト臍臓癌細胞やマウス線維芽細胞で報告されている [20,21] PKC と Src の関与を調べた. プロテインキナーゼのインヒビターを用いてその経路を阻害することによって, R3 細胞の p21^{CIP1} の発現誘導に影響が出るかどうかを調べた. ERK1/2 が Sox9 だけではなく p21^{CIP1} の発現誘導に関与しているかどうかについても調べた. まず, ERK1/2 の経路を U0126 により阻害した. U0126 は, ERK1/2 をリン酸化し活性化する MEK1/2 の活性を阻害することにより ERK1/2 の活性化を阻害する. 10 μ M の U0126 により FGF1 刺激 1 日後の R3 細胞の p21^{CIP1} の発現誘導が抑えられた (図 7-A). 又, FGF1 刺激 5 分後には ERK1/2 の活性化が抑えられ, それと同調して STAT1 のリン酸化が抑えられた (図 7-B). これにより ERK1/2 の経路も p21^{CIP1} の発現誘導に関わっていることが示された. 最近, RCS 細胞 (Rat chondrosarcoma) や, ATDC5 細胞で, ERK1/2 の阻害実験にて同じように p21^{CIP1} の発現が抑えられることが他の研究者からも報告された [17,18]. これらの報告と今回の結果は, ERK1/2 が軟骨細胞における FGFR3 の作用に重要であることを示している.

次に PKC と Src の経路について調べた. PKC と Src に対してはそれぞれへの ATP 結合阻害剤である Bis I もしくは PP2 を加えて阻害した. 興味深いことに, U0126 だけでなく, PKC, Src それぞれに対するインヒビター Bis I, PP2 によっても同様に p21^{CIP1} の発現の抑制が見られた (図 7-A). し

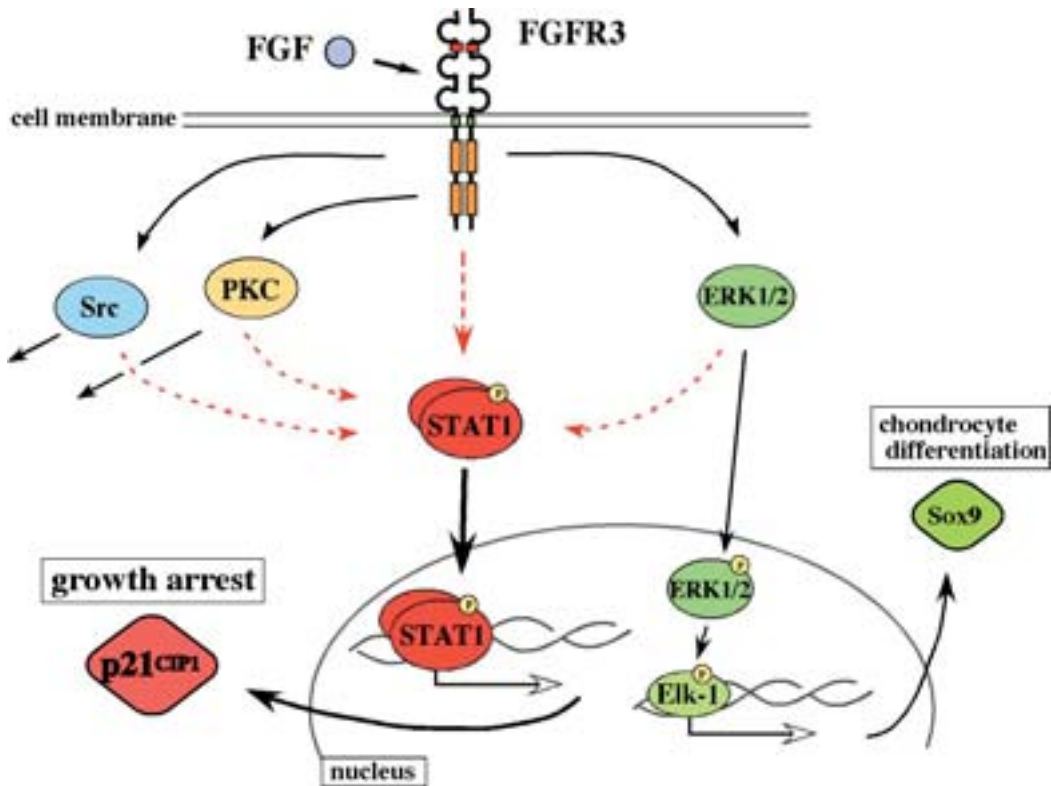


図8 ATDC5細胞におけるFGFR3による転写誘導のモデル図

ATDC5細胞においてFGFR3がp21^{CIP1}の発現を誘導するにはSTAT1を介した経路を必要とする。STAT1はチロシンリン酸化されることにより活性化され、核に移行しp21^{CIP1}の転写を促進する。STAT1のチロシンリン酸化にはERK1/2、PKC、Srcが活性化される必要がある。STAT1のチロシンリン酸化への関わりを赤い点線で表した。又、ERK1/2、PKC、SrcはSTAT1のチロシンリン酸化だけでなく、それぞれで、その他の役割も果たしていると思われる。特にERK1/2については軟骨分化特異的なSox9の発現を誘導する。

しかしこれらのインヒビターではERK1/2の活性化は抑制されていないため、ERK1/2経路とは独立した経路がp21^{CIP1}の発現に関わっていることが示唆された。そして、さらに興味深いことには、これら全てのインヒビターはSTAT1のチロシンリン酸化に影響していた(図7-B)。R3細胞はFGF1刺激により著しい形態変化も起こすが、上記のインヒビターはこの形態変化も抑制する傾向が見られた。このことは、細胞の形態変化がp21^{CIP1}によるものかp21^{CIP1}と同様の機構で制御される因子によるものであることを示唆していると考えられる。また、MHR3細胞でもp21^{CIP1}の発現が誘導されず、著しい形態の変化も見られないことからインヒビターによる実験の結果と一致している。

このようにERK1/2、PKC、Srcの分子を介したどの経路もp21^{CIP1}の発現に関わっており、又、PKC、SrcはERK1/2の活性化には影響せず、それらを介する経路はそれぞれでSTAT1のチロシンリン酸化と関係しているのではないかという結果が得られた。STAT1は直接p21^{CIP1}遺伝子の上流のプロモーター領域に結合して転写活性を発揮することがわかっている[24]。この事と上記の結果

から、次のような関わり合いが考えられるのではないだろうか。FGFR3による軟骨細胞での p21^{CIP1} 発現誘導は最終的に STAT1 経路の活性化が必要であるが、STAT1 経路は FGFR3 により活性化される様々な経路から調節されている (図8)。最終的にその全ての経路が十分に活性化されることにより STAT1 が p21^{CIP1} の発現を誘導できるようになるのでは無からうか。しかし ERK1/2 や PKC はセリン、スレオニンキナーゼであり、チロシンキナーゼではない。そして、STAT1 の活性化にはチロシンとセリンの2種類のリン酸化が関わっていることが知られている。チロシンリン酸化は主に核移行とプロモーター領域への結合、セリンリン酸化は転写促進活性の増強に関わっている [25]。さらに ERK1/2 や PKC は STAT1 や STAT3 のセリンリン酸化に関わっているという報告が多数ある [26-29]。Chin らの研究により、多種類の細胞で IFN- γ 刺激により STAT1, STAT3 が活性化され、それぞれホモダイマーもしくはヘテロダイマーを作り p21^{CIP1} のプロモーター部位に含まれる標的配列の候補となる配列に結合することが示されている [24]。したがって、ATDC5 の系においても STAT3 の関わりは十分考えられる。今後、STAT3 のチロシンリン酸化とセリンリン酸化についても、詳細に調べなければならない。p21^{CIP1} の発現の誘導は p53 を介した経路がよく知られているが、Parker らの p53 ノックアウトマウスの研究により軟骨における p21^{CIP1} の発現が p53 に非依存性であることが明らかにされている [35]。従って ATDC5 細胞の系においても p53 は関与していないと考えている。

最終的に MHR3 細胞が p21^{CIP1} の発現を誘導できない原因は不明として残された。R3 細胞と同様に STAT1 をチロシンリン酸化することから上記の PKC や Src の経路の活性化の欠如によるものではないと考える。従ってまだ他にも p21^{CIP1} の発現を調節する経路、機構が存在する可能性がある。この追求も今後の課題である。p21^{CIP1} が発現しないにも関わらず MHR3 細胞で増殖の抑制が起こっている理由は、現時点では明らかではないが ERK1/2 経路が関わっていると考えられた。MHR3 発現細胞では ERK1/2 の活性化は R3 発現細胞と同等に起こっていたので、MHR3 発現細胞の一時的な増殖抑制は ERK1/2 経路の活性化による可能性が高い。ERK1/2 経路の活性化によって、Rb ファミリータンパク質の p107 や p130 の脱リン酸化が起こるためではないかと推測される。Rb タンパク質が脱リン酸化することによって E2F 等の転写因子との結合が起こり細胞周期の移行が抑制されると考えられる。Scheijen らは、未分化で対数増殖期にある ATDC5 細胞では p107, p130 と E2F の複合体は確認されず、飽和密度に達し軟骨細胞への分化が誘導された ATDC5 細胞では p107, p130 と E2F の複合体が増加していると報告している [36]。 *in vitro* の軟骨細胞のモデルである RCS 細胞で FGF 刺激により p107 や p130 のタンパク質が脱リン酸化されることが報告されている [30]。これらの脱リン酸化には ERK1/2 経路が関わっていることが最近分かっている [31]。また特に p107 に関しては軟骨細胞の FGF 刺激に対する増殖抑制反応の最も早期の反応で、刺激後一時間ですでに脱リン酸化される。同様なことが MHR3 細胞で起こっているかどうかについては今後確認しなければならない。

以上、本研究において、軟骨細胞のモデル細胞である ATDC5 細胞を用い、FGFR3 による細胞の

完全な増殖停止には p21^{CIP1} タンパク質の発現誘導が重要であることを示した。さらに、FGFR3 が FGF 刺激により p21^{CIP1} の発現を誘導するためには複数の経路が関わっていることを示唆した (図 8)。なぜ、複数のシグナル伝達経路の活性化が p21^{CIP1} の発現誘導に必要なのだろうか。それは恐らく p21^{CIP1} は軟骨分化の段階を決定的に進める因子だからでは無からうか。例えば p21^{CIP1} の誘導が起ってしまうと、もう後戻りは出来ないとするならば、それは厳密に調節されなければいけないであろう。長骨の形成と長さの調節は軟骨原基内の成長板の軟骨細胞の増殖と分化により調節されており、その局所的な調節には多数の増殖因子、Ihh, PTHrP, BMPs, VEGF, FGF などが関与している [6]。そしてこれらの因子は互いに関わり合っている [32, 33]。これらの因子の微妙なバランスを個々の細胞の反応に反映するためにこのような多数のシグナル伝達経路が存在することで、それぞれの因子からのシグナルのクロストークなどが行えると考える。又、FGFR3 の下流のシグナル伝達経路である、PKC, Src などの経路はそれぞれ p21^{CIP1} 発現以外の独自の役割を持っていると考える (図 8)。それは MHR3 発現細胞における ERK1/2 の活性化から伺える。MHR3 発現細胞で ERK1/2 は R3 と同様に活性化され Sox9 の発現誘導能を持っている。しかし、p21^{CIP1} は発現しない。これは ERK1/2 は活性化されており独自の役割である Sox9 の発現を誘導できるが p21^{CIP1} の発現はそのほかの経路の活性の欠如により抑えられていることを意味する。一方 U0126 により ERK1/2 の活性化を抑えると p21^{CIP1} の発現が抑えられる。これは、この仮説を支持する結果であろう。こういった機構により、FGFR3 によって活性化されるそれぞれの経路はそれぞれ独自の役割を果たしつつ異なる増殖因子のクロストークを介してバランスが取られ、軟骨分化の条件がそろったところで p21^{CIP1} を始めとする分化に決定的な因子を誘導するのではないだろうか。今回の研究で、このように FGFR3 の軟骨細胞の増殖抑制に多くのシグナル伝達経路が関わっていることがわかったが、今後、軟骨細胞においてなぜ FGFR1 や FGFR2 ではなく FGFR3 のみがこういった反応を引き起こすことが出来るのか、ERK1/2 の 24 時間以上という長時間の活性化にはどのような意味があるのかなど、FGFR3 による増殖抑制及び分化調節の分子機構についてさらに解明したい。

引用文献

- [1] Powers, C. J., McLeskey, S. W., and Wellstein, A. (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr. Relat. Cancer* 7, 165-197
- [2] Muenke, M., Schell, U., Hehr, A., Robin, N. H., Losken, H. W., Schinzel, A., Pulleyn, L. J., Rutland, P., Reardon, W., Malcolm, S., and et al. (1994) A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nat. Genet.* 8, 269-274
- [3] Rutland, P., Pulleyn, L. J., Reardon, W., Baraitser, M., Hayward, R., Jones, B., Malcolm, S., Winter, R. M., Oldridge, M., Slaney, S. F., and et al. (1995) Identical mutations in the FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes. *Nat. Genet.* 9, 173-176
- [4] Vajo, Z., Francomano, C. A., and Wilkin, D. J. (2000) The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosy-

- nostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr. Rev.* 21, 23-39
- [5] Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A., and Leder, P. (1996) Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84, 911-921
- [6] van der Eerden, B. C., Karperien, M., and Wit, J. M. (2003) Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr. Rev.* 24, 782-801
- [7] Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D., and de Crombrugge, B. (2004) Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.* 18, 290-305
- [8] Atsumi, T., Miwa, Y., Kimata, K., and Ikawa, Y. (1990) A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell. Differ. Dev.* 30, 109-116
- [9] Shukunami, C., Ishizeki, K., Atsumi, T., Ohta, Y., Suzuki, F., and Hiraki, Y. (1997) Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1174-1188
- [10] Shimizu, A., Tada, K., Shukunami, C., Hiraki, Y., Kurokawa, T., Magane, N., and Kurokawa-Seo, M. (2001) A novel alternatively spliced fibroblast growth factor receptor 3 isoform lacking the acid box domain is expressed during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 11031-11040
- [11] Ohbayashi, N., Shibayama, M., Kurotaki, Y., Imanishi, M., Fujimori, T., Itoh, N., and Takada, S. (2002) FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev.* 16, 870-879
- [12] Sahni, M., Ambrosetti, D. C., Mansukhani, A., Gertner, R., Levy, D., and Basilico, C. (1999) FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev.* 13, 1361-1366
- [13] Su, W. C., Kitagawa, M., Xue, N., Xie, B., Garofalo, S., Cho, J., Deng, C., Horton, W. A., and Fu, X. Y. (1997) Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II dwarfism. *Nature* 386, 288-292
- [14] Shimizu, A., Takashima, Y., and Kurokawa-Seo, M. (2002) FGFR3 isoforms have distinct functions in the regulation of growth and cell morphology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 113-120
- [15] Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512
- [16] Aikawa, T., Segre, G. V., and Lee, K. (2001) Fibroblast growth factor inhibits chondrocytic growth through induction of p21 and subsequent inactivation of cyclin E-Cdk2. *J. Biol. Chem.* 276, 29347-29352
- [17] Krejci, P., Bryja, V., Pachernik, J., Hampl, A., Pogue, R., Mekikian, P., and Wilcox, W. R. (2004) FGF2 inhibits proliferation and alters the cartilage-like phenotype of RCS cells. *Exp. Cell Res.* 297, 152-164
- [18] Nakajima, M., Negishi, Y., Tanaka, H., and Kawashima, K. (2004) p21 (Cip-1/SDI-1/WAF-1) expression via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in insulin-induced chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 1069-1075
- [19] Murakami, S., Kan, M., McKeehan, W. L., and de Crombrugge, B. (2000) Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 1113-1118
- [20] Detjen, K. M., Brembeck, F. H., Welzel, M., Kaiser, A., Haller, H., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S.

- (2000) Activation of protein kinase Calpha inhibits growth of pancreatic cancer cells via p21 (cip) -mediated G(1) arrest. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 17), 3025-3035
- [21] Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W. J., and Jove, R. (2000) Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene* 19, 5419-5427
- [22] Negishi, Y., Ui, N., Nakajima, M., Kawashima, K., Maruyama, K., Takizawa, T., and Endo, H. (2001) p21Cip-1/SDI-1/WAF-1 gene is involved in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells in vitro. *J. Biol. Chem.* 276, 33249-33256
- [23] Volmat, V., Camps, M., Arkinstall, S., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2001) The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J. Cell Sci.* 114, 3433-3443
- [24] Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W. C., You, Z. H., Iwamoto, Y., and Fu, X. Y. (1996) Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272, 719-722
- [25] Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82, 241-250
- [26] Haq, R., Halupa, A., Beattie, B. K., Mason, J. M., Zanke, B. W., and Barber, D. L. (2002) Regulation of erythropoietin-induced STAT serine phosphorylation by distinct mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 277, 17359-17366
- [27] Chung, J., Uchida, E., Grammer, T. C., and Blenis, J. (1997) STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6508-6516
- [28] Uddin, S., Sassano, A., Deb, D. K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A. B., Fish, E. N., and Platanius, L. C. (2002) Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *J. Biol. Chem.* 277, 14408-14416
- [29] Steinberg, S. F. (2004) Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem. J.* 384, 449-459
- [30] Laplantine, E., Rossi, F., Sahni, M., Basilico, C., and Cobrinik, D. (2002) FGF signaling targets the pRb-related p107 and p130 proteins to induce chondrocyte growth arrest. *J. Cell. Biol.* 158, 741-750
- [31] Raucci, A., Laplantine, E., Mansukhani, A., and Basilico, C. (2004) Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 1747-1756
- [32] Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M., and Vortkamp, A. (2002) Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev. Cell* 3, 439-449
- [33] Chen, L., Li, C., Qiao, W., Xu, X., and Deng, C. (2001) A Ser (365) --> Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia. *Hum. Mol. Genet.* 10, 457-465
- [34] 林恵理子. (2004) FGF レセプター 3 とその Acid box 欠損型アイソフォームの細胞内シグナル伝達 京都産業大学修士論文
- [35] Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A. T., Bradley, A., Olson, E. N., Harper, J. W.,

Elledge, S. J. (1995) p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267, 1024-1027

- [36] Scheijen, B, Bronk, M, van der Meer, T, and Bernards, R. (2003) Constitutive E2F1 overexpression delays endochondral bone formation by inhibiting chondrocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3656-3668

Signal transduction of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 in chondroprogenitor ATDC5 cells.

Shin-ichi ABE, Eriko HAYASHI, Koichi ASHIYA,
Akio SHIMIZU, Misuzu SEO

Abstract

Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) plays a critical role in chondrogenesis.

The use of murine chondroprogenitor ATDC5 cells allowed us to assess the ability of FGFR3 to activate several distinct signal transduction pathways that are important for the development of chondrocyte phenotype. To analyze signal transduction by FGFR3, we have constructed mouse/human chimeric FGFR3 (MHFGFR3), composed of mouse FGFR3 replaced with the c-terminus portion of human FGFR3, and compared the ability of mouse FGFR3 and MHFGFR3 to elicit growth arrest in ATDC5 cells.

Upon stimulation by FGF1 mouse FGFR3 is much more potent in the induction of cell rounding and growth arrest than MHFGFR3. FGFR3 induced CDK inhibitor p21^{CIP1} expression to cause complete growth arrest, whereas MHFGFR3 could not. Both FGFR3 and MHFGFR3 induced a strong and sustained activation of ERK1/2 and STAT1 phosphorylation, which is essential for the p21^{CIP1} expression. Next, we examined which signal transduction pathways mouse FGFR3 utilized. Interestingly, by inhibiting PKC- or Src-mediated pathway, the induction of p21^{CIP1} expression and cell rounding were suppressed. Furthermore, all inhibitors for ERK1/2, PKC, and Src suppressed tyrosine phosphorylation of STAT1. These results demonstrate that to induce p21^{CIP1} expression and growth arrest in chondroprogenitor cells, multiple pathways must be activated simultaneously. Thus, MHFGFR3 may not be able to activate all of the pathways indispensable to induce p21^{CIP1} and growth arrest.