

【要約】

AKAP13 influences osteogenesis by integrating

Wnt signaling and RhoA activity

(AKAP13 は Wnt シグナルと RhoA 活性を統合して骨  
形成に影響を与える)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：横手幸太郎教授)

石田 晶子

【目的】 Protein kinase A anchoring protein 13 (AKAP13) は骨形成の初期段階への関与が示唆されているが、骨への直接的な効果なのか間接的な効果なのかはわかっていない。本研究では、AKAP13の骨形成調節機構を明らかにすることを目的とした。また、*Akap13*の骨形成への寄与がWnt/ $\beta$ -カテニンシグナルと関連している可能性は未だ検討されていないため、*Akap13*とWnt/ $\beta$ -カテニンシグナルとの関連を調べることにした。

【方法】 骨特異的 *Akap13* コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し、 $\mu$ CT 解析を用いて対照群と比較検討を行った。また、MC3T3-E1 細胞を用いて *Akap13* ノックダウン KD および *Lbc* (human AKAP13) 過剰発現した際の  $\beta$ -カテニンの蛍光免疫染色および骨関連遺伝子・Wnt 関連遺伝子 (*Lef1*, *Axin2*, *Cnx43*, *Dkk1*) 発現を検討した。続いて *Akap13* KD および *Lbc* 過剰発現時、また、*Lbc* および guanine-nucleotide exchange factor (GEF)・PKA anchoring (R II) ドメインを欠失させた mouse *Akap13* 変異構造体を導入した際の RhoA 活性化を検討した。さらに、*Lbc* 過剰発現に加えて Rho inhibitor 添加後の RhoA 活性化、骨関連遺伝子発現およ

び  $\beta$ -カテニン局在について検討した。

【結果・考察】*Collagen1a1* (cre) *Akap13* cKO マウスは、骨密度・骨梁幅・骨梁数の低下と骨梁間隙の増大を認め、骨粗鬆症様変化をもたらした。また、*Akap13* cKO マウスの大腿骨から Bone marrow stromal cells (BMSCs) を採取し、骨形成分化を誘導後、アリザリンレッド染色を用いて骨形成を評価したところ *Akap13* cKO マウスの BMSC は 28 日間ミネラル化しないことが示された。MC3T3-E1 細胞での *Lbc* 過剰発現で、Wnt3a 誘導性  $\beta$ -カテニン核内移行が増加し、*Lbc* が  $\beta$ -カテニンの核内移行を促進することが示された。*Akap13* ノックダウンは *Lef1* mRNA 発現を有意に減少させ、他の Wnt 関連遺伝子発現の減少を認めず、*Akap13* の *Lef1* への直接作用が示唆された。*Lbc* 過剰発現は RhoA 活性を増加させたが、GEF 欠失 *Akap13* 変異体導入では RhoA 活性の増加を認めず、*Akap13* の RhoA への作用は GEF 依存的と考えられた。また、*Lbc* 過剰発現は *Alp* mRNA 発現を増加させ、不死化骨髄幹細胞における *RhoA* 過剰発現は、RhoA 誘導依存的に *Alp* mRNA 発現を増加させた。さらに、*Lbc* 過剰発現の MC3T3-E1 細胞において Rho 阻害剤添加に

より Wnt3a 誘導性  $\beta$ -カテニンの核内移行が減少した。  
すなわち、MC3T3-E1細胞における wnt3a および Akap13  
過剰発現による  $\beta$  カテニン核内移行は RhoA の活性化  
を介していることが示唆された。

【結論】以上の結果から、Akap13 は骨形成の初期段階  
だけでなく、骨の維持にも寄与していることが示唆され、  
AKAP13 は RhoA 活性化を介して  $\beta$ -カテニンの核内移  
行を促進し、Lef1 遺伝子を制御することで、骨関連マー  
カーの増加に寄与していることが示唆された。