

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中道 裕子

骨は、高等動物個体において極めて多種多様な生理機能に必須であり、体重の支持機能と造血機能および体内のミネラル恒常性を保つ機能を有することが知られている。骨を構成する細胞種については、骨形成を司る骨芽細胞、骨吸収を司る破骨細胞のほかに、リンパ球をはじめとする造血系細胞および軟骨細胞が存在することが知られている。これらの細胞種は、お互いに分泌するサイトカインによって複雑なネットワークを構成し、骨の機能を制御している。骨芽細胞、破骨細胞、造血系細胞の分泌する骨機能制御因子については近年非常によく研究されているが、軟骨細胞の分泌する因子の骨機能に対する作用は不明な点が多いのが現状である。

申請者は、軟骨細胞が分泌する情報伝達因子が、骨形成および骨代謝機能に如何に重要かを明確にすることを目的に、現京都大学の開祐司により単離された、軟骨細胞の分泌する糖タンパクであるコンドロモジュリン-I (ChM-I) に着目した。そこで、ChM-I 遺伝子欠損 (KO) マウスを作製し表現型の解析を行った。ChM-I は、*in vitro* における軟骨細胞の増殖促進・プロテオグリカン合成促進活性を指標に単離された因子である。ChM-I は、*in vitro* で血管内皮細胞に対しては増殖抑制、骨芽細胞に対しては増殖促進・分化抑制作用を持つことが知られている。しかし、これらの *in vitro* における ChM-I の機能解析には限界があり、個体内での ChM-I のこれらの細胞種に対する機能を明らかにする必要があった。本研究ではジーンターゲティングの手法を用いることで、ChM-I KO マウスの作製に成功し、表現型の解析から、ChM-I の生体内高次機能の解明を試みた。本論文は4章より構成されている。

第1章は、序論で、ChM-I の発見の経緯とその主要な生物活性について、さらに本研究で行った ChM-I KO マウスの作製と ChM-I の生体内高次機能解析の意義について述べている。

第2章は、最初にジーンターゲティング法の優越性について他の実験系との比較をすることで解説し、改めて ChM-I KO マウスの作製の意義について述べている。次に KO マウスの作製法について概説し、ターゲティングベクターの構築、相同組み換え ES 細胞クローンの取得、キメラマウスの作製と ChM-I KO マウス系統の確立を述べている。最後に、ウエスタンブロット法により、抗 rhChM-I ポリクローナル抗体を用いて ChM-I タンパクの発現を検討し、ChM-I KO マウスにおける ChM-I タンパクの発現の消失を確認している。

第3章は、作製した ChM-I KO マウスの表現型の解析について述べている。

表現型の解析は ChM-I 発現組織（軟骨、胸腺、目）と軟骨に隣接する骨組織において行った結果を述べている。その結果、ChM-I KO マウスの胎仔期の骨・軟骨形成は正常であり、生後の骨・軟骨組織も5週齢までは野生型との差異は認められなかった。しかし、12週齢の ChM-I KO マウスにおいて野生型マウスと比較して有意に10%の骨密度の上昇が認められ、海面骨・皮質骨の双方で骨量が増加していることがわかった。さらに、骨組織形態計測を行った結果、骨密度上昇は骨形成・骨吸収の代謝回転の低下によるものであることがわかった。本研究によって生体内では、ChM-I は軟骨・骨形成には必須ではなく、骨量および骨代謝の制御に関与していることを初めて明らかにした。胸腺組織については、9週齢の ChM-I KO マウスにおいて胸腺髄質層の萎縮による組織サイズの縮小および細胞数の顕著な減少（約40%）が認められた。そこで、胸腺におけるT細胞分化マーカーの発現についてFACSにより検討したところ、KO マウスにおいて、野生型と比較して未分化なリンパ球前駆細胞の陽性比率がやや高いことが判明した。従って ChM-I のT細胞の増殖と分化への関与が示唆された。本研究により、胸腺機能の調節に ChM-I の機能が生理的に重要である可能性を明らかにすることが出来た。眼については、ChM-I KO マウスで異常は認められなかった。

第4章の総合討論では論文全体を総括し、生体内における ChM-I の役割と今後の展望について考察されている。

このように、申請者の行った研究は、骨機能の調節機構を新たな視点からとらえ、遺伝子欠損個体を作製並びに解析することで、軟骨細胞由来の情報伝達因子の重要性を証明する糸口となり得ると考えられる。

以上、本論文はジーンターゲティング法により ChM-I KO マウスを作製し、ChM-I の生体内高次機能の一端を明確にしたものである。これらの知見は、骨代謝における研究をはじめ、多くの分野に重要な知見を広く与えるものであり、学術上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。