

審査の結果の要旨

氏名 腰塚 裕

本研究は異所性骨化に関与する新規遺伝子を単離し、その機能を解析するために、異所性骨化を生じるマウスの *ttw* (tip toe walking)を用いた Differential display 法により耳介軟骨に発現している遺伝子の解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. *ttw* を様々な種類の食事で飼育した結果、高リン食で飼育したものでは低リン食で飼育したものに比べて、より早期から異所性骨化が出現し、骨化の程度も顕著に増強した。表現型に最も違いのみられた、高リン高カルシウム食と低リン高カルシウム食により飼育した *ttw* の耳介軟骨における発現に違いのみられる遺伝子を、Differential Display 法により解析した。その結果、軟骨特異的な新規遺伝子 Cystatin 10 (Cst10)を単離した。
2. Cst10 の *ttw* の耳介軟骨での発現はリン負荷により著明に亢進した。発現は特異的で、組織では軟骨にのみ発現がみられ、その他の組織では全くみられなかった。また、培養細胞でも、骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞のうち軟骨細胞にのみ発現がみられた。軟骨細胞と同様の分化過程をたどるマウス軟骨細胞様細胞株 ATDC5 では、Cst10 は分化誘導前には発現がみられなかったが、分化誘導後に肥大軟骨細胞のマーカーの type X collagen 遺伝子の発現に先立ち発現し、その後分化の進行に伴ってその発現量は増加した。マウスの成長板の免疫組織染色では、増殖細胞層から肥大軟骨細胞層に染色性が認められたが、静止軟骨細胞層には認められなかった。また、細胞内の局

在を解析すると、Cst10 は lysosome と同一部位に局在していた。

3. Cst10 を ATDC5 細胞に導入・高発現させた細胞株と、ベクターのみ導入した対照細胞株を樹立し、両群の分化過程を比較検討した。Cst10 導入細胞では、II 型コラーゲンの発現と軟骨基質を染める Alcian blue の染色性は対照細胞株と同程度であったが、X 型コラーゲンの発現がより早い時期から見られ、Alizarin red の染色性は著明に亢進し、石灰化が亢進しており、Cst10 が ATDC5 細胞に対して、肥大軟骨細胞への分化促進機能を有することが示された。
4. また、Cst10 導入細胞クローンでは、アポトーシスが生じ、ミトコンドリアを介するアポトーシスと関係の深い caspase 3, 9 が著明に亢進していた。これより、Cst10 を強制発現させると、ATDC5 細胞にミトコンドリアを介するアポトーシスが生じることが示された。

以上、本論文は異所性骨化を生じるマウス *ttw* の耳介軟骨に発現している遺伝子の解析から、軟骨特異的な新規遺伝子 Cst10 を単離し、Cst10 が軟骨細胞の後期分化とアポトーシスに関与していることを明らかにした。本研究はこれまで多くが不明であった、内軟骨性骨化のメカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。