

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 高 本 真 弥

本研究は軟骨分化において中心的な役割を果たすと考えられているヘッジホッグシグナルの作用機構をより明らかにするため、ヘッジホッグの下流の標的として骨形成に必須の転写因子である core binding factor a1 (Cbfa1) および破骨細胞分化に必須の因子である receptor activator nuclear factor κ B (RANKL) に着目し、ヘッジホッグによるこれらの因子の調節をマウス肋軟骨から調整した初代軟骨細胞において検討したもので、以下の結果を得ている。

1. 初代軟骨細胞においてヘッジホッグ蛋白の添加により Cbfa1 mRNA の発現レベルが上昇することがノーザンブロットにより明らかとなった。これまでも Cbfa1 の軟骨分化への関与は示唆されており、インディアンヘッジホッグ欠失マウスの軟骨膜/骨膜において Cbfa1 の発現が見られないことから Cbfa1 がヘッジホッグの標的となり得ることが考えられていたが直接的な証拠は得られていなかった。本結果によりヘッジホッグシグナルの下流に Cbfa1 が存在する可能性が示された。

2. Cbfa1 の転写開始点より -1825bp 上流から始まる 1.8-kb のプロモーター領域をルシフェラーゼに連結したレポーターコンストラクトを初代軟骨細胞に導入、ヘッジホッグの存在/非存在下で培養したところヘッジホッグの存在によりプロモーターの活性が上昇することがルシフェラーゼ活性により示された。

3. 1.8-kb の Cbfa1 プロモーターの塩基配列をデータベースにより調べたところ、HNF3 β のエンハンサーにおいて知られる 9 塩基の Gli 結合配列と同様の配列が転写開始点の上流 -258bp から -250bp にわたり存在することが明らかとなった。Gli はヘッジホッグシグ

[別紙2]

ナルの受容体 Patched の下流に存在することが知られている。Gli 結合配列を含むルシフェラーゼコンストラクトおよび Gli 発現ベクターを初代軟骨細胞に導入したところ、これらを同時に導入することによりルシフェラーゼ活性は上昇し、結合配列に変異を挿入したコンストラクトでは上昇が見られず、Gli 結合配列が初代軟骨細胞における Gli の機能に重要である可能性が示唆された。これらの結果から、ヘッジホッグは初代軟骨細胞において下流の Gli を活性化させ、Gli が Cbfa1 のプロモーター上の結合配列に結合することで Cbfa1 の遺伝子発現を上昇させる機構の存在が示唆された。

4. 初代軟骨細胞においてヘッジホッグ蛋白の添加により破骨細胞の分化、活性化に必須の因子である RANKL およびその受容体である RANK の mRNA 発現レベルを上昇させることが RT-PCR により示された。RANKL が軟骨分化に関与する可能性のあることはこれまでも示唆されており、細胞株でヘッジホッグが RANKL 発現を上昇させることは報告されていたが、初代軟骨細胞でもヘッジホッグが同様の作用をもつこと、また RANK も上昇させることが初めて示された。

5. ヘッジホッグ蛋白の存在により初代軟骨細胞のアルカリフォスファターゼは上昇するが、RANKL を同時に作用させるとその上昇作用が見られなくなることがアルカリフォスファターゼアッセイにより示された。アルカリフォスファターゼ活性は軟骨最終分化の指標のひとつであり、これにより RANKL がヘッジホッグの軟骨最終分化促進作用を抑制している可能性があることが示唆された。

以上、本論文は初代軟骨細胞においてヘッジホッグシグナルが Cbfa1 遺伝子の発現をそのプロモーター活性の増強を介して上昇させ、さらに RANKL 発現を上昇させることを明らかにした。本研究は複雑で下流の因子に関して不明な点も多かった軟骨分化におけるヘッジホッグの作用機序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。