

論文の内容の要旨

論文題目：軟骨細胞分化調節機構における細胞周期関連分子の役割に関する研究

指導教官：中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名：茂呂徹

緒言

骨格は、脊椎動物の個体に一定の形態を与える基盤となるとともに、運動機能の基本を担う重要な構造である。膜性骨化という過程で形成される一部の骨格を除く殆どの骨格は、まず軟骨が形成され、順次骨に置換されるという内軟骨骨化の過程を経て形成される。また、内軟骨骨化の最終段階において骨に置換されない軟骨が、関節軟骨、椎間板などの永久軟骨として軟骨細胞の形質を維持する。以上のように、骨・軟骨の形成には軟骨細胞の分化が強く関与しており、軟骨細胞の分化制御機構を解明することは、整形外科領域における骨折、骨・軟骨形成不全、変形性関節症などの様々な病態の解明、治療法の確立ばかりではなく、骨・軟骨の再生医療に繋がる可能性もある。近年、軟骨細胞の分化制御機構の解明は分子レベルで急速に進展しており、転写因子、アポトーシス制御因子、細胞増殖因子、受容体などの分子群の関与が報告されている。一方、細胞周期は、細胞が増殖するか、分化・老化・アポトーシス・減数分裂に向かうか、あるいは休止期（G0 期）に入るかを最終的に決定する場であり、細胞の分化増殖を研究する上で、決して無視することが出来ない要素であるにもかかわらず、軟骨細胞の分化制御機構と細胞周期の関連についてはこれまで殆ど検討されてこなかった。細胞の増殖から分化への switching は G1 期に行われるため、細胞が分化するためには細胞周期が G1 期で停止すること（G1 arrest）が必要条件である。そこで本研究では、G1 期に機能する細胞周期関連蛋白による軟骨細胞分

化制御機構の分析を行った。

第 1 章 軟骨細胞におけるインスリンによる細胞周期関連蛋白の発現調節

マウス前軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用い、G1 期に作用する細胞周期関連蛋白の発現調節を検討した。ATDC5 細胞は、単層培養条件下でインスリンの添加により高頻度で軟骨細胞に分化する。また、未分化細胞の細胞凝集から石灰化にいたる多段階の分化過程を再現するため、軟骨分化の制御を解析する有用なモデルとなっている。まず、ATDC5 細胞をインスリン存在下で分化誘導し、蛋白を抽出し、Western blotting を行った。細胞分化の起こる G1 期に機能する分子の抗体を用いた結果、Cyclin (A・D1・D2・D3・E)、CKI (p15・p16・p18・p19・p21・p27・p57)の中には、インスリンに対する明らかな反応性を有するものはなかったが、CDK のひとつ、CDK6 の発現レベルがインスリンによる分化誘導後 24 時間以降において抑制された。この他の CDK である CDK2 および CDK4 の発現レベルには変動が認められなかった。この蛋白レベルでの抑制はプロテアソーム/カルパインの阻害剤である MG132 を加えても回復せず、また Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)で CDK6 の mRNA のレベルを検討しても同様の抑制が見られたため、ユビキチン-プロテアソームによる蛋白分解によるものではなく、発現抑制によるものであると考えられた。

次に CDK6 上流のシグナル伝達経路を解析するため、まず軟骨分化に関連するシグナル伝達経路として知られる p38 MAPK のリン酸化を Western blotting に検討すると、インスリンで分化誘導した群において p38 MAPK のリン酸化が亢進していた。そこで、細胞分化の際のシグナル伝達系路として知られる p38 MAPK、ERK-1/2、PI3K のそれぞれの阻害剤、SB203580、PD98059、LY294002 の存在下で ATDC5 細胞を培養し、インスリンで分化誘導した際の CDK6 蛋白レベルの変動を Western blotting にて検討した。p38 MAPK の阻害剤 SB203580 を加えた実験では、ATDC5 細胞をインスリンで分化誘導すると CDK6 の発現抑制がみられるが、さらに阻害剤を加えた群では発現抑制が回復した。一方、ERK-1/2、PI3K の阻害剤 PD98059、LY294002 を加えた実験では、こちらも同様インスリンを加えた群で CDK6 の発現抑制がみられるが、阻害剤による発現抑制の回復はみられなかった。以上より、p38 MAPK シグナルの下流に CDK6 の発現抑制が存在していることが示された。

第 2 章 軟骨細胞内における CDK6 の機能解析

cdk6 遺伝子を ATDC5 細胞に導入して CDK6 を安定高発現する細胞株を樹立し、CDK6 の細胞内機能解析を行った。遺伝子導入はリポフェクションで行い、親株 (ATDC5 細胞) と同程度の発現レベルの細胞株を低発現群、親株の数倍の発現レベルを示す細胞株を高発現群と判定した。これらの三株間の誘導による分化の違いを、分化マーカーを指標として比較検討した。

まず、親株、低発現群、高発現群のそれぞれで、細胞培養後インスリンにて分化誘導し、Alkaline phosphatase 染色、Alizarin red 染色、Alcian Blue 染色を行った。この結果、それぞれの染色において親株、低発現群では分化誘導により染色性が亢進していたが、高発現群では染色性が低下し、軟骨細胞の分化が抑制されていた。

次に、親株、低発現群、高発現群のそれぞれで、細胞培養後インスリンにて分化誘導し、分化誘導後 3 日、14 日の細胞から RNA を抽出し、軟骨細胞の分化マーカー、II 型コラーゲン、X 型コラーゲンの mRNA の発現を RT-PCR によって検討した。親株および低発現群では分化誘導により II 型コラーゲン、X 型コラーゲンの発現が誘導されるのに対し、高発現群ではその誘導が認められなかった。また、非分化誘導処理群は、どの群でも II 型コラーゲン、X 型コラーゲンの誘導は認められなかった。以上より、高発現群において、軟骨細胞の分化が抑制されていた。

本来増殖と分化のメカニズムは互いに拮抗しあうものであり、CDK6 が細胞周期の進行の役割を担うことから、CDK6 の強制発現による分化能の低下が増殖亢進の結果として二次的に起きた可能性が考えられたため、BrdU 取り込み及びフローサイトメトリー (FACS) により増殖能と細胞周期分布の評価を行った。この結果、インスリンの存在下においても、非存在下においても、高発現株・低発現株・親株の間でその増殖能、細胞周期の分布に有意な差はみられず、CDK6 による分化能の抑制は、単に増殖促進による 2 次的なものではなく、増殖調節作用とは独立した直接効果であることが示唆された。

考察及び結語

第 1 章では、ATDC5 細胞培養系を用いたインスリンによる細胞周期関連蛋白の発現調節を検討し、細胞分化の起こる G1 期の細胞周期関連蛋白のうち、インスリン処理によって、CDK6 の蛋白レベルが低下することが明らかとなった。この現象は、通常細胞周期関連蛋白が分解される場合とは異なり、プロテアソームによる分解系を介さない反応であることが推測され、そのシグナル伝達経路としては、p38 の関与が示された。

次に第 2 章では、細胞内での CDK6 の機能解析を行った。ATDC5 細胞に CDK6 を高発

現させた細胞株は、インスリンによる軟骨細胞分化誘導に抵抗性を示したが、増殖能については、コントロール群と大きな差がなく、CDK6 強制発現が増殖能を有意に上昇させるという所見は得られなかった。また、親株、低発現群、高発現群の間で細胞周期の分布に大きな差が認められなかったことから、CDK6 強制発現による分化能の低下は、増殖促進の結果起こった二次的なものではないことが示された。

骨・軟骨の形成には軟骨細胞の分化が強く関与しており、軟骨細胞の分化制御機構を解明することは、骨・軟骨の形成・成長障害の病態解明や骨折治癒の促進等、新しい治療法の確立ばかりではなく、骨・軟骨の再生医療に繋がる可能性もある。一方、細胞周期関連分子と軟骨細胞分化制御機構との関連に着目した研究は、今日まで殆ど行われておらず、また、今回着目した CDK6 は、CDK の中でも CDK2 や CDK4 に比べて細胞の複製・増殖制御の研究において殆ど注目されることがなかった分子である。本研究によって、軟骨細胞の分化制御機構のひとつとして、p38 MAPK シグナルの下流に CDK6 の発現抑制が存在していることが明らかとなり、CDK6 が軟骨細胞分化効率を決定する重要な因子である可能性が示された。細胞周期制御には多くの因子が関わるため、今後は、それら因子との相互作用を検討したいと考えている。また、骨芽細胞、破骨細胞など、細胞種を越えて同一の分化制御機構が存在する可能性もあり、今後、骨・軟骨のみならず、広範囲な組織の再生医療へと繋がる可能性もあり、さらなる検討を継続する予定である。

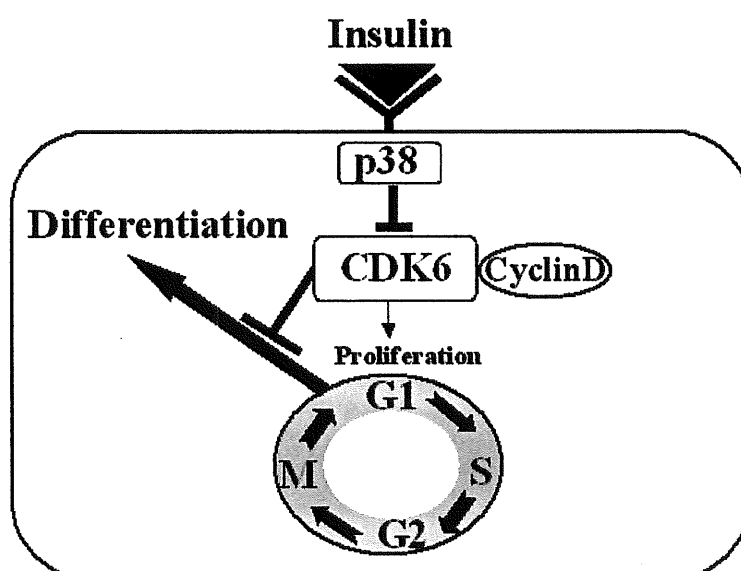


Figure. 本研究により示された、軟骨細胞分化抑制機構