

審査の結果の要旨

氏名 茂呂 徹

細胞の分化過程においては細胞周期が G1 期で停止することが必要条件であり、細胞周期関連分子が細胞分化の調節因子として働いている可能性がある。本研究は、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を分析するため、マウス前軟骨細胞株 ATDC5 をインスリンで分化誘導する系を用い、下記の結果を得た。

1. ATDC5 をインスリンで分化誘導して蛋白を回収し、G1 期に機能する細胞周期関連分子である cyclin A・D1・D2・D3・E、cyclin dependent kinase (CDK) 2・4・6、および CDK inhibitor (p15・p16・p18・p19・p21・p27・p57)の変動を Western blotting にて検討したところ、インスリンシグナルによる分化刺激によって CDK6 のみが著明に抑制された。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、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ことが示された。
2. CDK6 の上流のシグナル伝達系路を検索するため、p38 MAPK、ERK-1/2、PI3K のそれぞれの阻害剤である SB203580、PD98059、LY294002 を加えて 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 にて検討したところ、SB203580 を加えた群においてのみ CDK6 の発現抑制が回復した。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。
3. *cdk6* 遺伝子を ATDC5 細胞に導入して CDK6 蛋白を安定的に高発現する細

胞株、および低発現株を数クローンずつ樹立し、CDK6の細胞内機能解析を行った。インスリンの誘導による分化の違いを、軟骨細胞の分化マーカである Alkaline phosphatase 染色、Alizarin red 染色、Alcian Blue 染色で検討した。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。さらに、同様にインスリンで分化を誘導し、軟骨細胞の分化マーカである typeII collagen、type X collagen の mRNA の発現を RT-PCR で検討すると、親株および低発現群では分化誘導により双方の分化マーカ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。以上より、CDK6 高発現群において、軟骨細胞の分化が抑制されることが示された。

4. 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、高発現株・低発現株・親株の間で有意な差はみられなかったため、CDK6 による分化能の抑制は、増殖調節作用とは独立した直接効果であることが示された。

以上、本論文は、軟骨細胞の分化メカニズムのひとつとして、p38 MAPK シグナルの下流に CDK6 の発現抑制が存在し、この抑制は増殖調節作用と独立した直接効果であることを明らかにした。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、本研究は、軟骨細胞の分化制御機構の解明、そして骨・軟骨の形成・成長障害の病態解明や骨折治癒の促進、新しい治療法の確立、骨・軟骨の再生医療等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。