

論文の内容の要旨

論文題目 Wnt シグナルの軟骨分化に対する作用解析

指導教員 高戸 毅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 矢野 文子

緒論

骨形成の様式は膜性骨化と軟骨内骨化の2つがある。膜性骨化は頭蓋冠、下顎骨の一部、鎖骨などで認められ、軟骨を経由することなく未分化間葉系細胞が直接骨芽細胞に分化して骨組織を形成する。軟骨内骨化は脊椎や四肢の長管骨など骨格の大部分で認められ、軟骨の型がまず形成され、次いで骨に置換される。軟骨内骨化には軟骨が重要な役割を果たしている。

軟骨細胞は骨芽細胞、筋芽細胞、脂肪細胞と共通の前駆細胞である未分化間葉系細胞から分化する。軟骨組織の発生は、まず未分化間葉系細胞が密に集団化する。やがてそれらの細胞が細胞質に富む軟骨細胞へと分化する。軟骨細胞は分化段階の初期においてアグリカンや2型コラーゲンを発現する。未分化間葉系細胞から軟骨細胞への初期分化には Sox5、6、9 が特異的な転写因子として重要な役割を担っている。後期では軟骨細胞は肥大軟骨細胞となり10型コラーゲン、MMPs、VEGF を発現することにより軟骨内骨化過程における軟骨基質の分解や血管侵入の誘導を促す。軟骨細胞の肥大分化には骨芽細胞の分化に必須な転写因子である Runx2 が促進的に働いている。最近の報告では、Wnt シグナルの下流の転写因子である TCF が軟骨細胞の初期から肥大化にかけて発現しており、軟骨分化に関与すると示唆されている。

軟骨の初期分化・肥大化を制御するシグナルには様々なものが知られているが、軟骨細胞の分化から肥大化・アポトーシスまで一連のシグナル相互作用などについてはなお、解明すべき点が多く残されている。本論文において、軟骨分化誘導シグナルのひとつとして、古典的 Wnt シグナルの軟骨分化における役割を解析した。

Wntシグナルの軟骨分化に対する作用の解析

Wntファミリーは脊椎動物において20種類以上のリガンドからなる分泌性糖蛋白である。Wnt蛋白のレセプターは10種類の7回膜貫通型レセプターFrizzled (Fzd)があるが、Fzdとともにレセプター複合体を構成するもう一つの膜蛋白LRP-5/-6がWntシグナルの認識に必須である。Wntシグナルの中心伝達経路は β -cateninを介する古典的Wnt経路であり、その他にDvlからRhoAを介して、Jun N-terminal kinase (JNK)を活性化し、細胞骨格の再構築を促す経路 (PCP経路)およびG蛋白質によるphospholipase C (PKC)の活性化および細胞内のCa²⁺濃度上昇を促進する経路 (Ca²⁺ 経路)が存在する。

Wntファミリーは発生のさまざまな局面で時間的、位置的に特異的な発現を示し、形態形成の誘導因子、細胞の極性決定因子、増殖分化の調節因子として多様な機能をもっている。近年、Wntが軟骨形成に重要との報告がされている。In vitroの過剰発現系の実験では、Wnt4とWnt8は軟骨分化を抑制するが、肥大化を促進し、Wnt1とWnt7aは軟骨分化を抑制、Wnt9aは軟骨分化と肥大化のどちらもを抑制、Wnt3、Wnt5aとWnt5bは軟骨分化を促進するが肥大化を抑制し、Wnt11は軟骨分化と肥大化のいずれにも影響しない。これらの報告は軟骨初期分化と肥大化におけるWnt蛋白の役割を示唆している。しかし約20種類あるWntファミリーは古典的Wnt経路であるかそれ以外の経路であるかの分類がいまだに解明されておらず、いずれの経路が軟骨分化と肥大化を制御しているかは判っていない。

本論文において、軟骨分化における古典的Wnt 経路の役割を明確にするためにTCF / LEF-1の構成的活性型変異体・抑制型変異体を発現するアデノウイルスを作成し、未分化間葉系細胞株や軟骨細胞に導入し、初期軟骨分化と肥大化マーカーを区別して解析した。古典的Wnt 経路による軟骨分化シグナル機構については軟骨分化必須因子であるSox9との相互作用を解析した。その結果、古典的Wntシグナル経路は軟骨分化一連の過程の初期分化と肥大化を促進し、その作用機序はSox9依存性であることがわかった。永久軟骨の肥大化は変形性関節症などの病的な状態であれば観察されるが、その一部に古典的Wntシグナルが関与している可能性が示唆された。

結語

本研究では古典的 Wnt シグナルは軟骨内骨化において Sox9 依存性に軟骨分化・肥大化を促進することを明らかにした。この知見は軟骨分化シグナルネットワークを解明する手がかりになり、さらに軟骨分化の異常が引き起こす変形性関節症などを含む様々な疾患の病態生理の理解と将来の治療法の開発に役立つことが期待される。