

審査の結果の要旨

氏名 矢野 文子

本研究は軟骨内骨化において重要な役割を演じていると考えられる古典的 Wnt シグナルの軟骨分化における作用を明らかにするため、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。さらに古典的 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ものであり、下記の結果を得ている。

1. 古典的 Wnt シグナルを調節するために caLEF-1、dnLEF-1、siRNA β -catenin を発現するアデノウイルス：Ad-caLEF-1、Ad-dnLEF-1、Ad-si β -catenin を作成した。作成した Ad-caLEF-1、Ad-dnLEF-1、Ad-si β -catenin の蛋白発現と機能を確認した。作成したアデノウイルス変異体の蛋白発現に関してはウエスタンブロット解析により、正常に蛋白を発現していることを確認した。また、アデノウイルス変異体の機能に関してはルシフェラーゼアッセイを行い、古典的 Wnt シグナル経路の下流の転写因子 TCF/LEF-1 を調節していることを確認した。

2. 古典的 Wnt シグナルの軟骨初期分化に対する作用を解析するために、アデノウイルスベクター Ad-caLEF-1、Ad-dnLEF-1、Ad-si β -catenin を未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞に7日間、感染させた。軟骨分化解析のために軟骨初期分化マーカーである2型コラーゲン、アグリカン、およびコンドロモジュリン-1の mRNA 発現を分析するためにリアルタイム RT-PCR による検討を行った。Ad-caLEF-1 を導入したものと LiCl 処理はこれらの軟骨初期分化マーカー発現を増加させた。これに対して、Ad-dnLEF-1 と Ad-si β -catenin を導入したものは LiCl 処理にも関わらず、これらマーカー発現を抑制した。これらのデータより、古典的 Wnt シグナルは未分化間葉系細胞に対して軟骨分化を促進していることが示唆された。

3. 古典的 Wnt シグナルの軟骨肥大分化に対する作用を解析するために単層培養の未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 細胞、すでに軟骨細胞である ATDC5 細胞とプライマリーのマウス肋軟骨細胞のアルジネートビーズ培養を用いて解析した。軟骨肥大分化

の最も特異的な分化マーカーである10型コラーゲンのmRNA発現を分析するためにリアルタイムRT-PCRによる検討を行った。Ad-caLEF-1を導入したものとLiCl処理は10型コラーゲン発現を増加させた。これに対して、Ad-dnLEF-1 と Ad-si β -cateninを導入したものはLiCl処理にも関わらず、10型コラーゲン発現を抑制した。これらのデータより、古典的Wnt シグナルは軟骨肥大分化を促進していることが示唆された。

4. 軟骨細胞の肥大化を形態学的に解析するためにATDC5細胞とプライマリーのマウス肋軟骨細胞を包埋したアルジネートビーズをHE 染色し、組織学的に評価した。Ad-caLEF-1を導入したものとLiCl処理は明らかな細胞の肥大化がみられたのに対して、Ad-dnLEF-1 と Ad-si β -cateninを導入したものはLiCl処理にも関わらず、細胞の肥大化が抑制された。これらのデータより、古典的Wnt シグナルは軟骨細胞の形態的な変化(肥大化)に影響を与えていることが示唆された。さらにこれらのアルジネートビーズを免疫組織学的に解析すると、10型コラーゲンのmRNA発現に合致して、10型コラーゲンの蛋白発現がみられた。これらのデータより、古典的Wnt シグナルが少なくとも一部は、直接的に軟骨細胞の肥大化を促進していることが示唆された。

5. Sox9 は軟骨分化と肥大化の調節に必須の因子であることから、古典的Wnt シグナルによる軟骨分化と肥大化の促進はSox9依存性であるかどうかを詳細に検討するためにSox9ノックアウトES細胞を用いた解析を行った。野生型のES細胞に対して、Ad-caLEF-1を導入したり、LiClを加えたりした場合、7日間で2型コラーゲン、10型コラーゲン発現が増加し、Ad-dnLEF-1 と Ad-si β -cateninを導入したものはLiCl処理にも関わらず、2型コラーゲン、10型コラーゲンの発現が抑制された。これに対してSox9ノックアウトES細胞に対してAd-caLEF-1を導入したり、LiClを加えたりしたものはいずれのマーカーの発現も誘導されなかった。Sox9ノックアウトES細胞をSox9発現アデノウイルスで救済すると2型コラーゲンと10型コラーゲンのmRNA発現が共に誘導された。これらのSox9ノックアウトES細胞を用いた実験結果より古典的Wntシグナルによる軟骨分化促進作用はSox9依存性であることが示唆された。

なお、論文題目提出時には、『軟骨形成誘導シグナルの解析-Wnt シグナルの軟骨分化に対する作用と軟骨分化誘導薬の探索および作用機序の解析-』であったが、第 2 章における軟骨分化誘導薬の探索および作用機序の解析の公表の時期や特許の問題より、審査会において話し合いの結果、本論文より削除することになった。そのため、題目の変更を行い、『Wnt シグナルの軟骨分化に対する作用解析』とした。

以上、本論文は、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、学位の授与に値するものと考えられる。