

審査の結果の要旨

氏名 篠田 裕介

本研究は、細胞分化や胎生期の発達に重要な役割を果たしていると考えられている Krüppel-like transcription factor KLF5 の、骨軟骨代謝制御機構を明らかにするために、KLF5 ヘテロノックアウトマウスの解析を行い、さらに *in vitro* においてその機能の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. まず、KLF5 の骨軟骨組織での発現を確認したところ、RT-PCR では初代骨芽細胞、初代軟骨細胞、骨芽細胞系細胞の MC3T3E1、軟骨細胞系細胞の OUMS27 に多く発現していたが、破骨細胞やマクロファージ系細胞の Raw264.7 細胞には発現が少なかった。免疫組織学的にも、胎生 15.5 日齢、生後 1 日齢、8 週齢マウスの脛骨において、主に骨芽細胞と軟骨細胞に発現が認められた。次に KLF5^{+/-}マウスの解析を行った。生後 4 週齢・8 週齢・50 週齢においては、KLF5^{+/-}マウスの骨軟骨組織に明らかな異常を認めなかったが、胎生 15.5 日から 16.5 日齢においては、全身の大きさが明らかに小さく、脛骨長が有意に短かった。胎生 15.5 日から 16.5 日齢では、10 型コラーゲンの発現の遅れは見られないにも関わらず、肥大軟骨細胞周囲の血管形成、軟骨基質の石灰化が遅れており、骨髄腔形成の遅延が見られた。さらに、生後 1 日齢においても、軟骨基質の残存と石灰化遅延が見られ、肥大軟骨層が延長していた。よって、KLF5 は軟骨基質の石灰化や、軟骨基質の分解に重要な役割を果たしていると考えられた。

2. 8 週齢の KLF5^{+/-}マウスに骨折モデル及び関節炎モデルを導入し、この過程における KLF5 の役割を検討した。しかし、KLF5^{+/-}マウスと野生型で明らかな差を認めなかった。骨折治癒過程や関節炎において、KLF5 が重要な役割を果たしていない可能性も考えられたが、KLF5 が前述の様に軟骨組織のリモデリングや炎症に重要であることが確認されており、骨折モデルにおいて差を認めなかったのは、すでに KLF5 の haploinsufficiency を代償する遺伝子が十分に発現しているためである可能性が高いと考えられた。

3. 成長板において、軟骨基質分解や、血管侵入に重要と考えられている代表的な分子として Matrix metalloproteinase 9 (MMP9)、Matrix metalloproteinase 13 (MMP13)、VEGF-A が挙げられる。KLF5 は転写因子であり、これらの分子の転写を調節している可能性があると考え、KLF5 過剰発現によるこれらの分子の発現を *in vitro* にて検討した。軟骨細胞系細胞である OUMS27 細胞において KLF5 を過剰発現すると、MMP13 や VEGF の mRNA 発現の変化はわずかであったが、MMP9 の mRNA 発現、酵素活性が著明に上昇した。逆に、KLF5^{+/-}マウス由来の初代軟骨細胞においては MMP9 の発現が低下しており、免疫組織学的にも胎生 15.5

日齢の KLF5+/-マウスの脛骨骨幹部において野生型に比し MMP9 の発現が低下していた。さらに、OUMS27 細胞において KLF5 の RNAi を行うと、MMP9 の発現が抑制された。これより、KLF5 は軟骨細胞において MMP9 の転写を制御していることが示された。さらに、OUMS27 細胞に KLF5 を過剰発現し、細胞外基質・接着因子の制御や血管形成に関連する遺伝子の PCRarray を行ったところ、軟骨に発現する遺伝子の中では MMP9 の発現誘導が最も顕著であることが確認された。軟骨基質分解には破（軟）骨細胞が重要であるため、KLF5 が破骨細胞形成に与える影響を検討したが、retro virus を用いて KLF5 を過剰発現しても、破骨細胞形成には差を認めず、さらに KLF5 を過剰発現した破骨細胞における MMP9 発現量を検討したが、やはり明らかな差は認めなかった。これより、KLF5+/-マウスの表現系の一部は、軟骨細胞における MMP9 の発現減少によるものと考えられた。

以上、本論文は KLF5 が軟骨細胞における MMP9 の発現を制御する遺伝子であり、軟骨基質の石灰化や、軟骨基質の分解に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究は、骨軟骨組織において重要な役割を果たしている KLF5 の発現及び機能について検討した初めての論文であり、軟骨の最終分化と軟骨基質の分解機構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。