

審査の結果の要旨

氏名 大島 寧

軟骨内骨化は骨格形成の重要なプロセスであり、分化初期段階は Sox trio が、肥大分化の過程では Runx2 が制御因子として重要な働きをしていることが報告されている。一方、その次の段階である軟骨細胞アポトーシスの制御因子については殆んど分かっておらず、無機リン酸 (Pi) が培養軟骨細胞の細胞死を誘導するという報告が散見される程度である。本研究は、軟骨内骨化の過程において重要な律速段階の一つである軟骨細胞アポトーシスの制御機構の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. in vitroにおいてPi刺激による培養軟骨細胞アポトーシス誘導実験系を確立した。培養軟骨細胞および前軟骨細胞株であるATDC5細胞にPi刺激を加えると、刺激後約12から24時間でミトコンドリアからのシトクロムcの放出およびCaspaseの活性化が確認され、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスが誘導された。

2. この系を用い、ミトコンドリア経路のアポトーシスを正/負に制御する Bcl-2 family member分子群がPi刺激後のアポトーシスに与える影響を調べた。anti-apoptotic memberでは、Bcl-xLの強制発現によりアポトーシスが抑制され、逆にRNAiによる発現抑制で亢進した。一方、pro-apoptotic Bcl-2 family memberでは、Bnip3の発現をRNAiで抑制することでPi刺激後のアポトーシスが抑制された。

3. Bcl-xLおよびBnip3がPi刺激後の軟骨細胞のアポトーシスに重要であることが分かったため、両者の相互作用を生化学的に検討した。Pi刺激後Bcl-xLの発現量は不変であったが、Bnip3の発現量はPi刺激後12-24時間で上昇し、遅れてCaspaseの活性化がみられた。また、Pi刺激後6時間でBcl-xLとBnip3は結合した。

4. これら分子の発現量をin vivoにおいて組織学的に検討した。マウス成長板においてBcl-xLの発現量はほぼ均一であったのに対し、Bnip3の発現量は肥大軟骨層で強く発現していた。すなわち、肥大軟骨層でBnip3の発現量が上昇し、Bcl-xLに結合してその抗アポトーシス作用を阻害することで軟骨細胞のアポトーシスが誘導されると考えられた。

5. さらにin vivoにおける作用を確認するため、Cre-loxP recombination systemを用いて軟骨組織特異的bcl-xノックアウトマウスを作製した。Bcl-xコンディショナルノックアウトマウスは体幹および四肢短縮を呈し、組織学的には成長板の肥大軟骨層が短縮していた。Bnip3の発現量はノックアウトマウスおよび正常な同胞との間で差異がみられなかったが、ノックアウトマウスでは肥大軟骨層においてCaspase活性が亢進しており、アポトーシス亢進が肥大軟骨層の短縮の原因と考えられた。このノックアウトマウスを低リン食で飼育したところ、短縮していた肥大軟骨層が部分的に改善された。低リン食を与えたノックアウトマウスでは肥大軟骨層におけるBnip3の発現量が低下しており、亢進していたアポトーシスもほぼ正常化していた。

以上、本論文は、肥大軟骨細胞のアポトーシスがanti-apoptotic Bcl-2 family member分子Bcl-xLおよびpro-apoptotic Bcl-2 family member分子Bnip3の相互作用によって規定されることを、in vitroおよびin vivo両方で示した。本研究はこれまで未知に等しかった、軟骨内骨化における軟骨細胞アポトーシスの機序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。