

論文の内容の要旨

論文題目 軟骨分化蛍光モニタリング細胞を用い同定した
新規軟骨誘導因子 SNX19 に関する研究

指導教員 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

菅 哲徳

社会の高齢化に伴って、変形性関節症に代表されるロコモティブシンドロームへの対策は焦眉の課題となってきた。加齢とともに四肢の関節機能は軟骨の変性・磨耗などにより著明に低下し、骨切り術、人工関節置換術などの侵襲的かつ対症的な治療法に頼らざるを得ないのが現状である。これらの運動器変性疾患に対する根本的治療法を目指した軟骨再生医学の確立のためには、軟骨への分化の際に必要なシグナル分子を網羅的に解明、応用することが必須である。我々はまず、未知の軟骨分化誘導因子を網羅的に探索するためのツールとして軟骨分化をリアルタイムに判定できる細胞システムの作成を試みた。軟骨特異的遺伝子である II 型コラーゲン (COL2A1) 遺伝子転写開始点付近とイントロン 1 の領域の塩基配列を種間で比較検討したところ、イントロン 1 内の高度に保存されているエンハンサー領域が同定された。このエンハンサーと 2 種類の長さのヒト COL2A1 基本プロモーター配列をそれぞれ組み合わせ、SOX9 および SOX トリオ (SOX5,6,9) への反応性を ATDC5 および HuH-7 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにて評価した。エンハンサー配列をタンデムにすることで SOX9 および SOX トリオへの反応性は上昇し、その下流に基本プロモーターを組み合わせる時に反応はさらに増強した。そこで、タンデムにつないだエンハンサーの下流に長短のヒト COL2A1 プロモーター、さらに

蛍光レポーターEGFP または DsRed2 をつないだ計 4 種類のコンストラクトを作成し、それぞれ ATDC5 細胞に安定導入した。その結果、タンデムにつないだエンハンサーの下流に短い基本プロモーター、さらに DsRed2 をつないだコンストラクトを導入した細胞が、軟骨分化を誘導するインスリン刺激に対し特異的かつ鋭敏に反応し赤い蛍光を発したため、この細胞を ATDC5-C2ER と命名し以後の軟骨分化モニタリング細胞として使用することに決定した。インスリン刺激による時間依存的な蛍光の増加は内因性の軟骨誘導マーカー遺伝子の上昇とよく一致するものであった。また、ATDC5-C2ER 細胞に既知の軟骨分化誘導転写因子である SOX6、SOX9 を強制発現させた時も内因性 Col2a1 mRNA の発現レベルの上昇とともに特異的な蛍光が誘導されることを確認した。

次に、軟骨誘導能が知られているが通常のリソフェラーゼアッセイでは検討しづらい BMP2 と TGF- β の軟骨誘導メカニズムを ATDC5-C2ER 細胞を用いて検証した。1 週間の BMP2 および TGF- β 刺激により ATDC5-C2ER 細胞は特異的な赤い蛍光を誘導したが、これは Alcian blue 染色および Col2a1 mRNA レベルの増加とよく一致していた。まず BMP2 および TGF- β の下流シグナルとしてよく知られている Smad シグナルの関与を検討するため、抑制性 Smad の代表である Smad6 を ATDC5-C2ER 細胞に安定導入した。しかしながらこの Smad シグナルを抑制させた ATDC5-C2ER 細胞では、BMP2 と TGF- β はコントロールの細胞と同様、軟骨分化を示す特異的な蛍光を誘導し内因性 Col2a1 mRNA を上昇させた。一方、BMP2 と TGF- β シグナルのもう一つの主要なシグナル伝達経路である p38-MAPK シグナルを抑制するため特異的なインヒビターである SB203580 を投与したところ、容量依存性に赤い蛍光と Col2a1 mRNA は抑制された。このことは、p38-MAPK 経路が BMP2 および TGF- β により誘導される軟骨分化の重要なシグナル経路を担っていることを示唆している。実際 p38-MAPK を特異的に活性化する kinase である恒常活性型 MKK6 を安定導入した ATDC5-C2ER では、Alcian blue の染色性の増加とともに特異的な蛍光が確認された。

次に新規軟骨分化因子を網羅的に同定するため、我々はヒト気管軟骨からレトロウイルス発現ライブラリーを作成し、それを ATDC5-C2ER 細胞に応用し発現クローニングを行った。レトロウイルスライブラリーは、ヒト気管軟骨 mRNA を逆転写し pMx ベクターにクローニング、それを Plat-E 細胞に導入し上清を回収することで作成した。3 週間の培養により強い蛍光を発した細胞を単離し、ゲノムに取り込まれた cDNA を PCR にてリカバリーし、シーケンサーで解析した。この結果、軟骨の恒常性や代謝に関与すると報告のある遺伝子を含む複数の軟骨誘導候補分子を同定することができたが、その中で我々は輸送タンパクの一種である Sorting nexin (SNX) ファミリー遺伝子の SNX19 に着目した。その理由は、他の複数の SNX ファミリー遺伝子がヒトおよびマウスでの骨格系の異

常や成長遅延をきたすことが過去に報告されていたためである。

まず SNX19 の発現パターンを確認するため、胎生 11.5 日のマウス胚リオで whole mount in situ hybridization を行ったところ、Snx19 mRNA は胎児期の四肢、脊椎に発現がみられこれは Col2a1 mRNA の発現と一致した。次にマウス胚リオ胎生 17.5 日の近位脛骨の成長板で免疫化学染色を行ったところ、Snx19 は特に増殖軟骨層に発現していた。次に我々は SNX19 の細胞内局在を確かめるため EGFP タグをつけた SNX19 を HeLa 細胞に導入した。その結果、EGFP 蛍光は明確に細胞質内に限局しており、Hoechst 33258 で見られる核染色とは対照的な局在を示した。

SNX19 の軟骨分化に対する機能を検証するため、我々は ATDC5-C2ER 細胞に SNX19 を安定導入した細胞を作成した。SNX19 過剰発現は赤い特異的な蛍光を誘導し、同時に内因性の Col2a1、Aggrecan、Sox6 の mRNA レベルを上昇させ、Alcian blue、Toluidine blue の染色性を増強させた。より primary な軟骨細胞での効果を検証するため、繰り返し継代することにより脱分化したマウス肋軟骨由来細胞に SNX19 を安定導入したところ、やはり内因性 Col2a1 mRNA レベルは上昇し軟骨系細胞に再分化することが判明した。さらに胎生 11.5 日のマウス limb bud 由来の間葉系細胞に SNX19 をアデノウィルスにより過剰発現させると、Alcian blue の染色性は増強した。逆に Snx19 に対する shRNA を ATDC5-C2ER 細胞に安定導入しその機能を抑制したところ、Col2a1 mRNA レベルは有意に抑制された。また、SNX19 には Phox (PX) ドメイン、Phox-associated (PXA) ドメイン、Nexin C ドメインの 3 つの機能ドメインが存在する。これらのドメインはその他の SNX ファミリー分子において、小胞輸送やタンパクのソーティングなどの役割を果たしていることが過去に報告されていた。これら 3 つのドメインをそれぞれ欠失させた SNX19 を作成し ATDC5-C2ER 細胞に安定導入したところ、PX および PXA ドメインを欠失させたコンストラクトでは有意に Col2a1 mRNA の誘導は抑制されたが、Nexin C ドメインについては変化が見られなかった。このことから、PX および PXA ドメインが SNX19 の Col2a1 誘導に必要不可欠であることが示唆された。

最後に SNX19 の病的な軟骨における働きを検討するため、8 週齢の野生型マウスの膝関節に外科的処置を加え不安定性を誘導した実験的変形性関節症モデル (OA モデル) を作成した。手術後 4 週の免疫化学染色による検討から、Snx19 は sham 手術での正常軟骨には発現が見られなかったが、OA モデル側の変性軟骨に強く発現が見られた。このことは、OA の軟骨変性過程において SNX19 が関与している可能性を示していた。軟骨の肥大化は OA の軟骨変性発症の重要なステップであるが、肥大化軟骨細胞の代表的な遺伝子マーカーの一つである X 型コラーゲン (Col10a1) は、SNX19 の過剰発現および shRNA による抑制で変化

が見られなかった。一方、SNX19 過剰発現は関節軟骨特異的なマーカーである Tenascin C の発現を上昇させ、shRNA による SNX19 の抑制は Tenascin C の発現を低下させた。これらの結果より、SNX19 は軟骨変性を誘導するのではなく機械的不安定性がもたらした軟骨変性に対して、それを補填するごとく守備的に働く可能性が示唆された。

以上をまとめると、本研究ではまず軟骨分化をモニタリングするための新しい細胞システム ATDC5-C2ER を樹立、その後本システムの特異性の高さを利用して、新規軟骨分化誘導因子 SNX19 を同定することに成功した。SNX19 は成長板増殖軟骨層において発現が見られ、軟骨基質を増加させる働きがあった。また同時に、SNX19 が機械的刺激に伴う軟骨変性に対して保護的な役割を果たし、その関連シグナルが OA の治療ターゲットになりうる可能性を示した。今後、SNX19 のさらなる機能解析および ATDC5-C2ER 細胞システムを利用した新規軟骨誘導因子の同定により軟骨分化を制御する分子メカニズムが解明され、効果的な軟骨再生医学に寄与するものと期待される。