

審査の結果の要旨

氏名 菅 哲徳

本研究は、大きく分けて2つのテーマが存在する。まず第一は、軟骨分化を正確に、非侵襲的にモニタリング可能な細胞システムを樹立したことである。そして第二は、それを用いて遺伝子ライブラリーより網羅的スクリーニングを行った結果、新規軟骨分化誘導因子 Sorting nexin 19 (SNX19) を同定しその機能を解析したことである。本研究により、SNX19 が軟骨組織に存在する細胞質内タンパクで軟骨増殖能を有し、軟骨変性に対し防御的に働く可能性が示されている。具体的には、下記の結果を得ている。

1. まず、軟骨特異的な分子である II 型コラーゲン (COL2A1) 遺伝子に着目した。ヒト、マウス、ラットの COL2A1 遺伝子イントロン 1 内にある種間で高度に保存された 49bp の転写活性を ATDC5 および HuH-7 細胞においてルシフェラーゼアッセイを用い検討したところ、この配列が既知の軟骨分化転写因子である SOX9 および SOX トリオ (SOX5, 6, 9) に極めて強く反応するエンハンサーであることが分かった。そこで、このエンハンサー配列を 4 個タンデムにして長短のヒト COL2A1 basal promoter と蛍光レポーターEGFP もしくは DsRed2 を繋いだレポーターコンストラクトを ATDC5 に安定導入した。この中から軟骨誘導因子インスリンによって強い蛍光を発するクローンを選別したところ、エンハンサーの下流に短いヒト COL2A1 basal promoter、DsRed2 を繋いだコンストラクトを導入した細胞が軟骨分化への特異性に優れ、これを ATDC5-C2ER 細胞と命名した。実際、ATDC5-C2ER 細胞はインスリン以外にも種々の軟骨分化誘導能を持つ BMP2、TGF- β 、および SOX タンパクの過剰発現により、特異的な蛍光を発した。さらに、このシステムを用いて、BMP2 および TGF- β の軟骨誘導機序について考察したところ、p38-MAPK シグナルの重要性が示唆された。

2. ATDC5-C2ER 細胞が軟骨分化を正確にモニタリングすることが可能であることが分かったので、続いてヒト軟骨組織からレトロウィルス cDNA ライブラリーを作成し、蛍光を指標に発現クローニングを行った。得られた複数の軟骨分化誘導因子の中から、四肢・頭蓋の形成不全を伴うヒトの遺伝病 MMEP の原因となる細胞内輸送蛋白 sorting nexin (SNX) ファミリーに属する分子であることから SNX19 に注目した。SNX19 はマウス胚にて確かに軟骨組織に発現が見られ、複数の細胞株に SNX19 を過剰発現させると軟骨分化が誘導された。一方、SNX19 の shRNA により内因性の SNX19 を抑制すると軟骨分化は有意に抑制された。次

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)を作成したところ、SNX19 は OA 負荷により発現が上昇した。OA における軟骨変性誘導の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、SNX19 に対する shRNA の導入により Tenascin C の発現は低下した。これらの結果より、OA 発症・進展に伴いその発現が上昇してくる SNX19 が軟骨変性を誘導しているのではなく、機械的な不安定性により引き起こされた軟骨変性を補填するごとく軟骨に対し守備的に働く可能性があることが示唆された。

従来の軟骨分化をモニタリングするためのシステムでは、特異性に優れ、また簡便で高い再現性を持ち、かつリアルタイムに軟骨分化をモニタリングすることは不可能であった。本論文は、これらをいずれも満たす細胞システム ATDC5-C2ER を樹立し、これを発現クローニングに応用して新規軟骨分化誘導因子 SNX19 を同定したものである。また、SNX19 の軟骨分化誘導能について詳細に検討がなされている。本論文は軟骨分化を制御する分子メカニズムの解明と有効な軟骨再生医学のための知見に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。