

論文の内容の要旨

論文題目 CCAAT/enhancer-binding protein β による軟骨細胞分化制御機構に関する研究

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

氏名 平田 真

【要旨】

ほとんどの生理的な骨格成長は軟骨内骨化により獲得され、変形性関節症などの病的軟骨代謝障害においても軟骨内骨化の関与が指摘されている。この軟骨内骨化において軟骨細胞肥大分化は骨格成長の 4 割から 6 割を占めるとされる重要なステップである。軟骨の肥大分化過程において、軟骨細胞はまず増殖を停止し、X 型コラーゲン(COL10)産生を代表とする肥大軟骨特有の基質を産生し、一方では matrix metalloproteinase 13 (MMP13) などの基質分解酵素を分泌して軟骨基質の分解を促している。こうした一連の分化過程は協調的なもので様々なシグナルにより制御を受けていることが示唆されているが、その分子メカニズムの詳細は未だ明らかではない。

本研究では様々な細胞の増殖・分化に関与することが知られている転写因子 CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β)に着目しその軟骨細胞分化における役割を解析した。まず C/EBP β ホモノックアウト(-/-)マウスを解析し、骨格成長障害を呈していること、その四肢成長板において軟骨細胞増殖層の延長、肥大分化の遅延のあることを示した。この分子機序解明のため、初代培養軟骨細胞において C/EBP β の loss-of-function、gain-of-function の実験を行ったところ、C/EBP β が細胞周期の停止に関与している可能性が示唆された。この細胞周期に関連する因子の中で C/EBP β の標的因子を見出すべくマイクロアレイによる網羅的解析を行い、cyclin-dependent kinase inhibitor である p57^{kip2}を標的因子として同定した。p57 はマウス四肢成長板軟骨において C/EBP β と同様増殖層後期から肥大層にかけて発現しており、C/EBP β 欠損により p57 の発現は低下していた。また、C/EBP β 過剰発現細胞の肥大分化亢進は、shRNA による p57 の発現抑制により阻害されていた。さらに、ルシフェラーゼアッセイ、EMSA による解析から p57 プロモーターにおける C/EBP β の応答配列を同定し、C/EBP β が p57 を直接転写誘導することを示した。

続いて、C/EBP β の軟骨細胞肥大分化への直接的な作用について解析を行った。特に肥大分化に重要な作用を持つ Runx2 がその co-factor として知られていることから、Runx2 と C/EBP β の関係に着目しながら、解析を進めた。まず、C/EBP β と Runx2 の複合遺伝子欠損マウス(C/EBP $\beta^{-/-}$; Runx2 $+/+$)を作成したところ、同胞 C/EBP $\beta^{-/-}$ マウスよりも強い成長障害を認めた。組織学的検討では軟骨内骨化の遅延および一次海綿骨量の低下を認め (Alcian blue / von Kossa 二重染色)、COL10 の発現は C/EBP $\beta^{-/-}$ マウスと同程度であったが MMP13 の発現が著明に低下していた。このメカニズム解明のため、ヒト軟骨系細胞株 SW1353 に C/EBP β と Runx2 を共導入すると、増殖能は単独導入と同程度であったが、各種軟骨分化マーカーの中で MMP13 の発現が相乗的に上昇した。さらにルシフェラーゼアッセイにより COL10、MMP13 プロモーターにおいて C/EBP β が転写活性を有していること、特に MMP13 プロモーターについては Runx2 と協調性して転写活性を誘導することを示した。

続いて軟骨代謝における病態モデルとしてマウスにおいて変形性膝関節症モデルを作出し解析したところ、C/EBP β は関節軟骨の変性に先立って発現しており、そのヘテロノックアウト(+/-)マウスにおける変形性関節症モデルでは同胞野生型マウスに比べて関節破壊が抑制されていた。しかし、この過程における p57 の発現は明らかではなく、肥大分化マーカーである COL10、MMP13 の発現低下のみを認めたため、さらに C/EBP β の肥大分化に対する作用を詳細に検討することとし、Runx2 が軟骨細胞の肥大分化において重要な因子であり、C/EBP β がその co-factor としても知られていることから、Runx2 と C/EBP β の遺伝学的相互作用について解析を行いながら、肥大分化における両者の協調性についても確認することとした。

以上のことから、C/EBP β は p57 の発現誘導を介した増殖の停止から肥大分化への移行、COL10、MMP13 の発現誘導を介した肥大分化促進作用を持ち、生理的な軟骨内骨化、変形性関節症における軟骨内骨化を制御していることが示された。