

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 平田 真

本研究の目的は生理的な軟骨形成および軟骨病的状態である変形性関節症における C/EBP β の役割を解明し、その分子機序を明らかにするため、ノックアウトマウスを用いた生理的条件下および変形性関節症誘導モデルでの *in vivo* の解析、ならびにマウス肋軟骨由来の初代培養軟骨細胞、軟骨系細胞株を用いた *in vitro* の解析により、下記の結果を得ている。

1. C/EBP β ホモノックアウト(-/-)マウスの解析の結果、ノックアウトマウスでは大きな骨格パターンニングの異常はなかったが、骨格の組織学的解析により、軟骨内骨化において特に肥大分化が遅延していることが明らかとなった。*in vitro* の系でも C/EBP β は軟骨細胞において増殖に対しては抑制的に分化に対しては促進的に作用することが確認された。これらのデータにより C/EBP β が細胞増殖の抑制すなわち細胞周期回転の停止に関与し、肥大分化を促す作用を持つことが示唆された。
2. フローサイトメトリーを用いた DNA ヒストグラムの解析から、C/EBP β は軟骨細胞の細胞周期に関与していることを示した。さらに DNA マイクロアレイによる網羅的スクリーニング、その後のマウス初代培養軟骨細胞における gain-of-function、loss-of-function の解析から p57 を標的分子として同定した。続いて p57 の発現制御メカニズムについて解析を行い、C/EBP β が p57 プロモーター活性を有し、プロモーター上の C/EBP モチーフに直接結合し p57 を転写誘導することを示した。最後に sh-p57 を用いて C/EBP β の肥大分化促進作用への p57 の関与を確認したところ、ALP 染色、X 型コラーゲンの mRNA 量の抑制が生じ、C/EBP β の p57 を介した肥大分化促進作用の可能性が示唆された。以上より、C/EBP β は p57 を転写誘導することにより細胞周期を制御し、軟骨細胞の増殖の停止から肥大分化への移行を促進していることが示された。
3. Runx2 との協調性に触れながら C/EBP β の肥大分化促進作用について検討した結果、*in vivo* の系において C/EBP β -/-;Runx2+/-マウスにおける肥大分化は C/EBP β -/-マウスと比べ著明に抑制されており、中でも MMP13 の発現量の低下、軟骨基質分解の遅延が著明であった。ヒト軟骨系細胞株 SW1353 を用いた

*in vitro*における検討でも、MMP13の発現、転写活性はC/EBP β とRunx2を共導入することで協調的に亢進した。一方X型コラーゲンについては、*in vivo*、*in vitro*いずれにおいても明らかなRunx2との協調性は確認されないものの、独立してX型コラーゲンの発現、転写活性を誘導することが明らかとなった。

4. マウスにおける実験的変形性関節症モデルの解析から、C/EBP β が変形性関節症における軟骨代謝にも関与し、軟骨変性に先立ちC/EBP β が発現すること、その発現量低下によりX型コラーゲン、MMP13の発現も低下し、軟骨変性が抑制されることが示された。しかし、この過程におけるp57の関与は明らかとはならなかった。

以上、本論分はC/EBP β が生理的な骨格成長および変形性関節症の軟骨変性における軟骨内骨化の過程で軟骨細胞の増殖の停止から肥大分化にかけて促進的な作用をもつ重要な分子であることを明らかにした。本研究はこれまで解明されていなかった、軟骨内骨化に働くと考えられる転写因子ネットワーク網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。