

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 伊藤 祥三

本研究は軟骨細胞分化の背景に存在するシグナルネットワーク群について GSK-3 を中心として解析することを目的とした。ノックアウトマウスを用いた *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. GSK-3 α ・GSK-3 β は軟骨細胞の各分化段階においてコンスタントに発現しており、初期分化では活性型・後期分化では不活性型として存在した。*Gsk3a*^{-/-}マウス・*Gsk3b*^{+/-}マウスは正常に発達したが、両者を複合した *Gsk3a*^{-/-};*Gsk3b*^{+/-}マウスでは成長障害を呈した。組織学的には *Gsk3a*^{-/-};*Gsk3b*^{+/-}マウスで増殖細胞層の染色性低下・Col2 の発現減少が見られた。培養軟骨細胞では GSK-3 α ・GSK-3 β それぞれの単独強制発現により初期分化マーカーの発現が上昇し、抑制により低下した。またその効果は両者の共導入によって増強したことから、GSK-3 α ・GSK-3 β は軟骨初期分化の段階で働いて分化を促進しており、それぞれの機能は重複していると推測された。
2. 軟骨細胞分化と古典的 Wnt シグナルとの関わりについて評価したが、GSK-3 の欠損によって β -catenin の転写活性・発現レベルおよび細胞内局在は変化しなかった。そこで軟骨分化における GSK-3 α ・GSK-3 β のリン酸化ターゲットの探索を3段階のスクリーニングで行い、NF- κ B ファミリーメンバー RelA を同定した。軟骨細胞での GSK-3 による RelA のリン酸化部位として T254 が考えられ、同部位に変異を加えると RelA による軟骨初期分化マーカーの転写活性化作用が著しく低下した。
3. RelA は軟骨細胞の各分化段階においてコンスタントに発現しており、p-RelA^{T254} は初期分化で発現が見られた。RelA は軟骨初期分化に促進的に働いており、GSK-3 による T254 のリン酸化は RelA の機能調節に重要と思われた。GSK-3 は RelA の核内移行・細胞内局在には影響を与えなかった。
4. *Prx1-Cre;Rela fl/fl* マウスは長管骨の成長障害を呈し、*Col2a1-Cre;Rela fl/fl* マウスは全身性の成長障害を示した。組織学的には両者でともに増殖細胞層の染色性低下・Col2 の発現減少が見られ、その表現型は *Gsk3a*^{-/-};*Gsk3b*^{+/-}マウスと類似し

ていた。RelA 組織特異的遺伝子欠損マウスにおける表現型は *Gsk3a*^{-/-};*Gsk3b*^{+/-}マウスと同様に初期分化の障害が主たる要因であると推測された。

以上、本論文は、軟骨細胞において GSK-3 α ・GSK-3 β が、RelA T254 のリン酸化を介して軟骨初期分化を促進して、生理的な骨格成長を制御する作用をもつ重要な分子であることを明らかにした。本研究は軟骨細胞の発生・分化に関わるシグナルネットワーク群の全体像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。