

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 司 源

---

本研究は、哺乳類の骨格形成およびヒトにおける関節疾患の発症や進展に深く関与している軟骨細胞分化を制御する転写関連因子群の役割の解明および新規軟骨細胞分化関連因子の同定および解析に取り組んだもので、論文は序論およびそれに続く3章からなる本論、総合討論で構成されている。

序論では、研究の背景と目的について述べた後、第2章では、軟骨特異的アンドロゲン受容体欠損マウスの作出および解析を行っている。哺乳類の性徴期には、長管骨の長さや骨盤の形態などの様々な性差が存在する。このような性差は、一般に性ホルモン作用により生じるとされている。男性ホルモン（アンドロゲン）および女性ホルモン（エストロゲン）は標的組織におけるアンドロゲン受容体（AR）およびエストロゲン受容体（ER）を介した標的遺伝子の発現制御により、その生理作用を発揮する。これまでにERは雌性型骨長において機能することが明らかとなっており、ARは雄性型骨形態の構築および軟骨細胞分化過程への関与が示唆されている。しかしながら、現在までの全身AR遺伝子欠損（ARKO）マウスの解析では、内分泌異常を伴う事で雄性型骨形態への関与が示されなかったことから、ARの軟骨細胞分化過程への直接作用は証明することができなかった。軟骨細胞分化過程は、間葉系幹細胞から、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞へと分化し、最終的に、アポトーシスへと誘導されるものである。この三つの軟骨細胞層は成長期の骨端成長板を構成することおよび軟骨分化過程が骨形態を決定することが知られている。そこで、本研究では軟骨細胞特異的ARKOの作出により、ARの軟骨細胞を介した骨長および骨盤型への直接作用の検証を試みた。Cre/loxPシステムによる増殖軟骨細胞特異的なARKOマウス（Col2a1-ARKO）および肥大軟骨細胞特異的なARKOマウス（Col10a1-ARKO）を作出した。これらの軟骨特異的なARKOマウスを用いて、雄性型骨形態、特に、長管骨や恥骨の骨長および恥骨の骨長決定した骨盤型の解析を行った。その結果、Col2a1-ARKOやCol10a1-ARKOマウスの長管骨およびCol10a1-ARKOマウスの恥骨や骨盤型は野生型と有意な差異は見出されなかった。しかしながら、Col2a1-ARKOマウスでは、有意な恥骨長の延長と骨盤腔の拡大を認め、雄マウスにおいて雌性型骨盤が観察された。恥骨軟骨細胞層を詳細に解析したところ、成長板全層および増殖軟骨層の厚さが野生型と比べて、Col2a1-ARKOマウスでは有意に増加していた。このことから、ARが軟骨細胞増殖を抑制することが示唆された。

第3章では、軟骨細胞分化細胞系を用いて、軟骨組織分化におけるAR分子機構を明らかにした。軟骨細胞、特にARKOマウスの解析により、成長板軟骨層厚さの増加は軟骨細胞

の分化異常に起因すると考えられた。そこで、軟骨組織および軟骨細胞分化系を用いた結果、AR リガンド投与により、増殖軟骨分化マーカー遺伝子 Col2a1 および軟骨細胞増殖制御転写因子 Sox9 の発現上昇を認めた。また、AR が Sox9 に対する転写共役因子である可能性をレポーターアッセイにより検討した。その結果、AR がリガンド依存的に Sox9 転写能を抑制することを見出した。さらに、Sox9 の標的遺伝子である Col2a1 のプロモーター領域における ChIP アッセイの結果により、AR がリガンド依存的にリクルートされることを見出した。また、Col2a1 の発現変化がプロモーター領域のヒストン修飾の変化に起因するものと考え、ChIP アッセイを行った。その結果、AR では転写活性化のマークである H3K4me3 および H3Ac の修飾がリガンド依存的に抑制されていることが明らかになった。以上の結果より、AR は Sox9 と協調的に作用し、ヒストン修飾変動を介して、Sox9 の転写能を減弱させ、その標的遺伝子である Col2a1 の発現を抑制するという分子機構を明らかにした。

第 4 章では、軟骨細胞分化系を用いて、マイクロアレイの結果により、Aire を新規軟骨細胞分化制御因子として同定、解析した。青年期のヒトで、Aire 遺伝子の変異が可逆骨幹端異形成症 (RMD) という病気に関連する報告がある。そこで、軟骨初代培養細胞および軟骨細胞分化系を用いて、Aire の軟骨細胞分化における関与を検討した。その結果、Aire は軟骨細胞分化を促進することが明らかとなった。さらに、Aire が軟骨細胞分化を促進するサイトカインである BMP2 の発現を促進することを確認した。そこで、BMP2 のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイおよび ChIP アッセイを行ったところ、Aire が BMP2 のプロモーターにリクルートされて、直接的に BMP2 の発現を促進することが示唆された。同時に、同領域において H3K4me2 修飾が Aire 依存的に増加することも見出した。以上の結果より、Aire は軟骨細胞分化過程における活性化因子として、ヒストン修飾変動を介して、直接的に BMP2 の発現を促進するという分子機構を明らかにした。

続く総合討論では本研究を総括および考察し、今後の課題ならびに研究の方向性について述べている。

以上本論文は、骨盤形態形成における AR の生理機能および軟骨分化に対する AR の転写制御機構の解明、ならびに新規軟骨細胞分化関連因子として Aire の同定およびその機能解析を行ったもので、骨軟骨代謝領域においても研究の発展性が期待され、学術的に貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。