

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	末 吉 達 也
論文題目	Conditional deletion of <i>Tgfb2</i> in hypertrophic chondrocytes delays terminal chondrocyte differentiation (肥大化軟骨における <i>Tgfb2</i> 遺伝子の欠失により最終軟骨分化が遅延する)		
(論文内容の要旨)			
内軟骨骨化は未分化間葉系細胞から軟骨原基が形成され骨へと置換される長管骨の主要な骨格形成様式である。肥大化軟骨は内軟骨骨化において軟骨から骨へ置換される際の最終軟骨分化を担う細胞である。Transforming growth factor β (<i>Tgfb</i>)は発生や分化などに影響を与え、軟骨および骨に豊富に発現していることが確認されているが、肥大化軟骨細胞におけるその役割は未だ十分に解明されていない。<i>Tgfb</i> シグナルの細胞膜受容体である <i>Tgfb2</i> 型受容体遺伝子(<i>Tgfb2</i>)のノックアウトマウスは胎生致死であるため、<i>Cre/loxP</i> システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスによって、肥大化軟骨における役割を解析した。 肥大化軟骨特異的に発現するX型コラーゲン遺伝子に<i>Cre</i>を導入した<i>Col10a1-Cre</i>ノックインマウスと<i>Tgfb2</i> フロックスマウスを交配した。<i>Col10a1</i> 遺伝子特異的な<i>Tgfb2</i> ノックアウトマウス(<i>Tgfb2</i>^{flox/flox};<i>Col10a1-Cre</i>)とコントロール(<i>Tgfb2</i>^{flox/flox})の上肢組織を採取し、経時的に比較検討した。 その結果<i>Tgfb2</i>^{flox/flox};<i>Col10a1-Cre</i>マウスは胎生期 14.5 日(E14.5)において増殖軟骨から肥大化軟骨への変換が遅れ、さらにE15.5において一次骨化中心の狭小化、骨膜の菲薄化、最終軟骨分化の遅延がみられた。<i>In situ</i> hybridizationにて<i>Col10a1</i>、<i>Mmp13</i>、<i>Osteopontin</i>、<i>Ihh</i>の発現が低下しており、<i>Vegf</i>遺伝子および<i>Pecam</i>タンパク発現も低下していた。<i>Ihh</i>およびそのターゲットの受容体である<i>Patched-1</i> の発現低下から、<i>Ihh</i>シグナルの低下により肥大化軟骨層での血管侵入および血管内皮細胞の形成が妨げられていることが示唆された。 <i>Tgfb</i>による肥大化軟骨および最終軟骨分化への影響を調べるために軟骨分化セルラインであるATDC5 を培養して<i>in vitro</i>での実験を行った。肥大化軟骨状態のATDC5 にリコンビナント<i>Tgfb1</i> または<i>Tgfb</i>受容体阻害薬を添加すると、<i>Tgfb1</i> の添加で肥大化・後期肥大化マーカーの<i>Col10a1</i>、<i>Ihh</i>、<i>Mmp13</i>、<i>Vegf</i>が増加し、<i>Tgfb</i>の阻害によりそれらは用量依存的に減少した。また、ATDC5 の石灰化も<i>Tgfb1</i> の添加により促進され、<i>Tgfb</i>受容体阻害により阻害されることがAlizarin Red染色で示された。さらに<i>Tgfb2</i>^{flox/flox};<i>Col10a1-Cre</i>マウスの中足骨を器官培養して<i>Ihh</i>シグナルを外因性に賦活した。<i>Ihh</i>受容体のアゴニストを添加することにより<i>Tgfb2</i>^{flox/flox};<i>Col10a1-Cre</i>マウス中足骨の肥大化および最終軟骨分化の遅延をレスキューすることがvon Kossa染色およびX型コラーゲンの免疫染色により確認された。 以上のことから肥大化軟骨における <i>Tgfb</i> シグナルの阻害により、<i>Ihh</i> シグナルが低下し、それらが内軟骨骨化における肥大化および最終軟骨分化を遅延させることが示された。<i>Tgfb</i> シグナルは肥大化軟骨および最終軟骨分化をポジティブにコントロールしており、内軟骨骨化が障害される骨系統疾患や難治性の骨折などにおいてこの研究が新たな治療方法や新薬の開発の一助になることを期待している。			

(論文審査の結果の要旨)
Transforming growth factor β (Tgfb)は発生や分化などに影響を与えるが、内軟骨骨化の過程で肥大化軟骨細胞におけるその役割は未だ十分に解明されていない。肥大化軟骨特異的に発現するX型コラーゲン遺伝子にCreを導入したCol10a1-CreノックインマウスとTgfb2 フロックスマウス(Tgfb2 ^{flox/flox})を交配し、Cre/loxpシステムを用いたTgfb2 コンディショナルノックアウトマウスによって、肥大化軟骨における役割を解析した。Tgfb2 ^{flox/flox} ;Col10a1-Creマウスは胎生期 14.5 日(E14.5)において増殖軟骨から肥大化軟骨への変換が遅れた。さらにE15.5 において一次骨化中心の狭小化、骨膜の菲薄化、最終軟骨分化の遅延がみられ、E16.5 組織切片の <i>in situ hybridization</i> 法にて <i>Ihh</i> 、 <i>Patched-1</i> 、 <i>Vegf</i> の発現低下がみられた。軟骨分化細胞株であるATDC5 に組み換えTgfb1 またはTgfb阻害薬(SB431542)を添加すると、Tgfb1 の添加で肥大化・後期肥大化マーカー遺伝子の発現が増加し、Tgfb阻害薬によりそれらは用量依存的に減少した。これらのことから肥大化軟骨におけるTgfbシグナルの阻害により、内軟骨骨化における肥大化および最終軟骨分化を遅延させることが示された。以上の結果からTgfbシグナルは肥大化軟骨および最終軟骨分化を正の方向にコントロールしていることが明らかになった。以上の研究は内軟骨骨化の分化制御の解明のみでなく、変形性関節症などのヒト軟骨疾患の病態を理解し治療法に結び付けるための知見として寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成24年12月21日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。