

学 位 審 査 報 告 書

(ふ り が な) 氏 名	まさご ゆうさく 真砂 有作
学位 (専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位 授 与 の 日 付	平成 年 月 日
学位 授 与 の 要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理学研究科 生物科学専攻
(学位論文題目) コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の軟骨形成・内軟骨性骨化における機能解明	
論 文 調 査 委 員	(主査) 森 和俊 教授 阿形 清和 教授 青山 卓史 教授

理 学 研 究 科

京都大学	博士（	理学）	氏名	真砂 有作
論文題目	コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の軟骨形成・内軟骨性骨化における機能解明			
（論文内容の要旨） 哺乳類の頭蓋骨や鎖骨等を除くほぼ全ての骨の形成では、まず II 型コラーゲンを主要成分とする軟骨の形成から始まり、その後軟骨が I 型コラーゲンを主要成分とする骨に置き換わっていく。この過程は内軟骨性骨化と呼ばれている。 全ての種類のコラーゲンは共通して三重螺旋構造を持っている。三重螺旋構造を特異的に認識し、結合する分子シャペロンとして HSP47(47-kDa heat shock protein)が知られている。過去に作製された <i>Hsp47</i> ノックアウトマウス (<i>Hsp47</i>^{-/-})は妊娠後 11.5 日以内に胎生致死となったことから哺乳類の発生において Hsp47 は必須のタンパク質である事が明らかにされている。<i>Hsp47</i>^{-/-}マウスは I 型、IV 型コラーゲンの分子成熟に異常が見られ、基底膜の形成異常が観察されたが、胚発生の初期に死亡してしまったことから他の種類のコラーゲンや軟骨や骨等の結合組織形成における Hsp47 の役割について in vivo では明らかにされなかった。 本研究では特に II 型コラーゲンを分泌する軟骨細胞に注目し、Cre-loxP システムを用いて、<i>Hsp47</i> の軟骨細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウス (<i>Hsp47</i> cK0)を作製し、軟骨形成、内軟骨性骨化における Hsp47 の機能を明らかにしようとした。本研究では、loxP 配列を <i>Hsp47</i> 遺伝子に挿入した <i>Hsp47</i> floxed マウスを樹立する事に成功し、軟骨細胞特異的に Cre recombinase を発現する <i>Col2a1</i>-Cre トランスジェニックマウスと交配することで、軟骨細胞特異的な <i>Hsp47</i> cK0 マウスを得た。<i>Hsp47</i> cK0 マウスは呼吸不全により出生後 2 時間以内に死亡した。妊娠後 16.5 日目以降の <i>Hsp47</i> cK0 マウスは四肢の短縮や変形が見られた。また骨格標本やマイクロ CT による観察の結果、<i>Hsp47</i> cK0 マウス新生児の背骨の椎体では石灰化がほとんど起こっていない事が明らかになり、椎間板の重度の変形が観察された。これらの結果は軟骨形成、内軟骨性骨化において Hsp47 が重要な役割を果たしている事を示している。 続いて in situ hybridization と蛍光免疫染色による解析を行った。その結果、<i>Hsp47</i> cK0 マウスの脊柱の軟骨細胞における II 型プロコラーゲン プロ α 1 鎖 (<i>Col2a1</i>) mRNA の発現量の変化は認められなかったが、I 型プロコラーゲン プロ α 1 鎖 (<i>Col1a1</i>) mRNA の発現量が顕著に増加していることが明らかになった。また驚くべき事に <i>Hsp47</i>cK0 マウスの椎間板では II 型コラーゲン、XI 型コラーゲンが顕著に減少している事が明らかになった。また椎間板の SHG(第二高調波発生)イメージングを実施した。その結果、<i>Hsp47</i>cK0 椎間板の軟骨細胞より代償的に産生された I 型コラーゲンは繊維形成能を失っている事が明らかにされた。初代培養軟骨細胞の免疫染色の結果、<i>Hsp47</i> 非存在下では II 型コラーゲンは rER(粗面小胞体)に局在していることが明らかになった。さらに電子顕微鏡観察による解析を行った結果、<i>Hsp47</i> cK0 軟骨では II 型コラーゲン繊維形成異常が起きている事が明らかになり、軟骨細胞の rER の膨化が認められた。これらの結果から <i>Hsp47</i>cK0 マウスの軟骨細胞では異常な II 型コラーゲンが rER 内に蓄積し、細胞外への分泌量の減少が起こり、分泌された II 型コラーゲンも繊維形成能を損なった異常なミスフォールドコラーゲンであると考えられた。 以上の結果をまとめると、本研究により Hsp47 が軟骨細胞における II 型、XI 型コラーゲンの産生や軟骨形成において非常に重要である事が in vivo において明らかになった。本研究の結果は、2010 年に初めて報告されたヒト HSP47 (別名 SERPINH1) 遺伝子異常における骨形成不全症様の病態が、報告にあるような I 型				

コラーゲンフォールディング異常だけによるものではなく、軟骨の II 型コラーゲン等の複数のコラーゲンフォールディング異常の総合的な結果である事を強く示唆している

(論文審査の結果の要旨)

本論文では遺伝子改変マウスを使用したアプローチにより生体内の Hsp47 の機能解明を行っている。Hsp47 は全身の様々な繊維芽細胞系の細胞で少なくとも 28 種類存在する各種コラーゲンと共に発現していると考えられる。そのため *in vivo* において多様な分子種からなるコラーゲンファミリーの中の特定のコラーゲンと Hsp47 の関係を明らかにするためには、本論文内で用いられたコンディショナルノックアウトマウスを用いたアプローチが有効である。

過去の研究では軟骨と Hsp47 の関係は主に慢性関節リウマチにおける抗原等としての研究が進んでいたが、Hsp47 が軟骨形成自体においてどのような役割を果たすかについてはほとんど明らかになっていなかった。

本論文では軟骨細胞特異的な Hsp47 コンディショナルノックアウトマウスを作製し解析が行われた。その結果、マウス軟骨細胞内の Hsp47 が失われた場合、II 型、XI 型コラーゲンの産生量が明らかに低下する事、軟骨コラーゲンの繊維形成異常が起きる事が組織学的な観察、電子顕微鏡観察、生化学的な手法をもちいて示された。また哺乳類個体の軟骨発生、内軟骨性骨化において Hsp47 が重要である事がコンディショナルノックアウトマウスの重篤な軟骨の形態異常と二次骨の形成異常が起きていた事からも明らかになった。

以上の研究から、Hsp47 が軟骨形成、内軟骨性骨化に重要である事が示された。この研究結果は近年初めて報告されたヒト HSP47(SERP1)遺伝子異常の結果起きる骨格形成異常のメカニズム解明の一助になると考えられ、基礎的な Hsp47 の機能解明とコラーゲンミスフォールディングに関する結合組織疾患の臨床学的な知見をブリッジングする可能性の高い重要な研究であると認められる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 24 年 1 月 24 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果合格と認めた。