

京都大学	博士（医学）	氏 名	添 田 恒 光
論文題目	Sox9-expressing Precursors Are the Cellular Origin of the Cruciate Ligament of the Knee Joint and the Limb Tendons (Sox9 陽性前駆細胞は膝関節十字靱帯と四肢の腱の細胞の起源である)		
(論文内容の要旨)			
マウスジェネティクスにおいて Cre-LoxP システムは、特異的な遺伝子に Cre を導入することで、組織、期間特異的に遺伝子の機能解析と細胞系譜の追跡を可能とする。CreERT2 はタモキシフェン投与下によりのみ Cre リコンビネーションを発現するため、より決められた期間特異的に遺伝子改変を行う。Sox9 は、胎生期の臓器形成の際に、軟骨をはじめとして、様々な組織の前駆細胞に発現する。軟骨における遺伝子の機能解析と Sox9 陽性細胞の系譜を追跡するため、内因性の Sox9 遺伝子に CreERT2 を導入し、Sox9-CreERT2 ノックインマウスを作成した。このマウスはタモキシフェン投与下によりのみ、Sox9 の発現している組織、時期特異的に遺伝子改変を可能とする。今回、Sox9-CreERT2 ノックインマウスを用いて四肢の靱帯、腱の細胞系譜を追跡した。 Sox9-CreERT2 ノックインマウスを、Creリコンビネーション下でLacZの発現するR26Rマウスと交配した後 (Sox9^{CreERT2/+} ; R26R)、胎生 10.5 日から 15.5 日の間に 1 回のみタモキシフェンを投与し、生後 0 日で採取し、X-gal 染色を行い、膝関節、アキレス腱を組織学的に評価し、靱帯、腱のSox9 陽性細胞の系譜を追跡した。また、Sox9^{LacZ/+}マウスを胎生 13.5 日から 15.5 日で採取し、X-gal染色行い、胎生期のSox9 の発現を検討し、これをSox9^{CreERT2/+} ; R26Rマウスと比較した。 タモキシフェンを投与したSox9^{CreERT2/+} ; R26Rマウスの胎児では軟骨、脳、肺、心臓、脾臓、腸管、腎臓、精巣で染色が陽性であり、Sox9 発現に一致して良好なCreリコンビネーションが確認できた。Sox9^{CreERT2/+} ; R26Rマウスの新生児の膝関節十字靱帯は胎生 14.5 日のタモキシフェン投与までは、靱帯内に Sox9 陽性細胞を認めた。Sox9^{LacZ/+}マウスの膝関節は胎生 13.5 日目までは大腿骨と脛骨の間の中間層でSox9 発現は認めるが、胎生 14.5 日の関節腔が形成され始める時期では、関節内にはSox9 陽性細胞は認めず、おもに軟骨原基でSox9 陽性細胞を認めた。胎生 15.5 日では十字靱帯が明らかになるが、Sox9 は発現していなかった。Sox9^{CreERT2/+} ; R26Rマウスの新生児のアキレス腱では胎生 14.5 日目までは腱内にSox9 陽性細胞を認めた。Sox9^{LacZ/+}マウスの踵部では主に踵骨の軟骨原基にはSox9 陽性細胞を認めるが、その周囲には認めなかった。胎生 15.5 日にアキレス腱を認めるが、Sox9 は発現していなかった。Sox9^{CreERT2/+} ; R26Rマウスの新生児の膝蓋腱では、胎生期 12.5 日までSox9 陽性細胞が腱内に存在したが、それ以降は認めなかった。Sox9^{LacZ/+}マウスでは、胎生 14.5 日以降で膝蓋腱は明らかになるが、Sox9 の発現はしていなかった。膝関節十字靱帯、アキレス腱、膝蓋腱はSox9 の発現は認めないが、Sox9 陽性細胞由来であることが考えられた。Sox9-CreERT2 ノックインマウスはタモキシフェン投与に伴い、Sox9 発現細胞で良好な遺伝子改変を可能とするため、今後、軟骨等のSox9 発現細胞での遺伝子解析において有用なツールになると思われる。			

（論文審査の結果の要旨） Sox9 は、胎生期の臓器形成の過程で軟骨を含む様々な組織の前駆細胞に発現する。軟骨における遺伝子の機能解析やSox9 発現細胞の系譜を明らかにするため、Sox9 発現細胞においてCreリコンビナーゼを誘導できるSox9-CreERT2 ノックインマウスを作成した。本研究では、Sox9^{CreERT2/+}マウスをレポーターマウスであるR26Rマウスと交配し、胎生期にタモキシフェンを投与したマウスとSox9^{LacZ/+}マウスとLacZ発現を比較し四肢の靱帯、腱の細胞系譜を追跡した。タモキシフェンを投与したSox9^{CreERT2/+} ; R26Rマウスの胎仔は、軟骨、脳、肺、心臓、脾臓、腸管、腎臓、精巣でLacZ発現陽性であり、Sox9 発現臓器に一致して遺伝子改変を認めた。Sox9^{CreERT2/+} ; R26Rマウスの新生児では、膝関節十字靱帯、アキレス腱、膝蓋腱は胎生期の軟骨前駆細胞が凝集する時期およびそれ以前のSox9 発現細胞が存在していた。Sox9^{LacZ/+}マウスの胎仔では、膝関節十字靱帯、アキレス腱、膝蓋腱はSox9 の発現を認めなかった。よって四肢の靱帯、腱はSox9 発現細胞由来であることが明らかとなった。 以上の研究はマウスの四肢の靱帯、腱の細胞起源の解明に貢献し、Sox9-CreERT2 ノックインマウスは、軟骨など Sox9 発現細胞における遺伝子の機能解析に寄与するところが多いと考えられる。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23年3月9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。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			