

氏 名	近 藤 俊 哉
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1921 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Dual effects of the membrane-anchored MMP regulator RECK on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells (ATDC5 細胞の軟骨分化に対する膜結合型 MMP 制御因子 RECK の 2 元的効果)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 村 孝 志 教 授 瀬 原 淳 子 教 授 戸 口 田 淳 也

論 文 内 容 の 要 旨

細胞外マトリックス (ECM) は、細胞間を充填し生体組織に強度を与えるのみならず、細胞の挙動、運命、機能発現にも影響を与え、その異常は様々な病態につながる。個体の成長や疾患に伴う組織形態の変化は、ECM の分解と再構築——すなわち ECM リモデリング——を経て進むが、その内、ECM が分解される局面においては、マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) ファミリーが中心的な役割を担うと考えられている。

活性化 *RAS* がん遺伝子による悪性転換を抑制する遺伝子として発見された *RECK* は、膜に GPI アンカーされた MMP 抑制因子をコードし、その産物は、少なくとも 3 種の MMP (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) を制御する。以前の研究において、*RECK* 欠損マウスが ECM 形成異常を伴って胎生 10.5 日前後で死亡することが見出されているが、それ以降の個体発生や成体における *RECK* の役割については不明の点が多い。そこで本研究では、まず RNA プロット法、*in situ* ハイブリダイゼーション法などを用いて、胚発生の進行に伴う *RECK* の発現パターンを解析した。その結果：

- 1) 胎生 7 日のマウス胚において *RECK* の発現は検出されないが、胎生 11 日以降は検出される。
- 2) 胎生 13.5 日から 16.5 日頃には、軟骨性骨原基において特に強い *RECK* の発現が認められる。
- 3) 培養細胞を用いた実験でも骨芽細胞や破骨細胞に比べ軟骨細胞において *RECK* の発現が高い。
- 4) 胚性腫瘍由来細胞株 ATDC5 において軟骨分化を誘導すると *RECK* の発現が上昇する。

などの知見が得られた。ATDC5 は軟骨発生の初期過程に起こる「細胞凝集」と「軟骨結節形成」を培養下で再現できる良い系である。そこで次に、この系を用いて *RECK* の発現異常が軟骨分化に及ぼす影響を解析した。その結果：

- 5) 分化の初期段階では、*RECK* の発現量が低いのに対し、MMP-2, MMP-9, MT1-MMP が比較的高い。また細胞凝集部において活発な ECM 分解が起こる。
- 6) 凝集した細胞が軟骨結節を形成する段階では、*RECK* の発現は、軟骨分化マーカーである II 型コラーゲンと共に軟骨結節内部において上昇する。また ECM 分解が持続する辺縁部では *RECK* の発現は依然として低い。
- 7) 分化初期の段階から *RECK* を強制発現させると細胞凝集が抑制され、軟骨結節の形成頻度が著しく減少する。
- 8) shRNA によって *RECK* を発現抑制すると、細胞凝集は起こるが、軟骨結節における ECM の集積が抑制され、成熟した結節の形成頻度が減少する。

などが観察された。以上の結果より、*RECK* が適切な部位 (軟骨結節中心部) で適切な時期 (分化後期のみ) に発現することが軟骨結節の形成に重要であることが明らかとなった。また、動的な組織形態形成に伴う ECM リモデリングの制御因子としての *RECK* の重要性が示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞外マトリックスの分解に matrix metalloproteinase (MMP) ファミリーが中心的な役割を演ずることが知られている

が、細胞外マトリックスの構築を正に制御する機構は明らかにされていない。本研究において、申請者らは、膜アンカー型 MMP 制御因子 RECK に着目し、そのマウス胎児組織における発現分布を *in situ hybridization* 法を用いて解析した。その結果、胎生13.5～16.5日胚では、軟骨に強い RECK mRNA の発現が観察された。そこで、軟骨分化を誘導できる培養細胞系 ATDC5 を用いて実験を進めた結果、(1)軟骨分化の初期においては RECK の発現はむしろ低く MMP 活性が高いこと、(2)軟骨分化の後期において RECK の発現が高まること、(3)RECK を強制発現させると分化初期におこる細胞凝集が阻害されること、(4)RECK をノックダウンすると分化後期におこる軟骨結節の成熟が阻害されること、などが判明した。これらの知見より、RECK の発現変動が、軟骨分化の制御に大きく関与することが示唆された。

以上の研究は、軟骨発生の理解に貢献し、基礎医学の発展に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19年2月19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。