



Title	Transcriptional Factor ERG Variants and Functional Diversification of Chondrocytes during Limb Long Bone Development
Author(s)	樋口, 義信
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42761
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	ひふくよしのぶ 口 義 信
博士の専攻分野の名称	博士(学術)
学位記番号	第 15899 号
学位授与年月日	平成13年2月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Transcriptional Factor ERG Variants and Functional Diversification of Chondrocytes during Limb Long Bone Development. (Ets related gene (ERG) による軟骨細胞の分化形質の制御)
論文審査委員	(主査) 教授 栗栖浩二郎
	(副査) 教授 伊集院直邦 助教授 西村 理行 講師 中澤 光博

論文内容の要旨

軟骨組織は、軟骨細胞の運命によって分類すると、最終分化（肥大化・石灰化）を経て骨に置換される成長軟骨と正常では石灰化しない永久軟骨に大別できる。前者は、骨の雰型として内軟骨性骨化において主要な役割を果たし、後者は関節などにおいて衝撃を吸収したり、円滑な可動性を提供するのに役立っている。軟骨性の原始骨格は、成長軟骨細胞と永久軟骨細胞には区別できない一様な細胞塊として形成されることから、両者の分化の方向性は軟骨の初期分化の後に規定されると考えられる。しかし、その機構は全く不明である。

我々は、軟骨細胞の分化形質の制御に関する転写調節因子を探索する過程で、ets スーパーファミリーに属する2種類の ets related gene (ERG) 遺伝子をニワトリ cDNA よりクローニングした。そのうち一つは、胎生期の前軟骨形成部位に特異的に発現することが報告されていた ch-ERG と同一であったが、もう一つは、ch-ERG の DNA 結合領域の上流 27 アミノ酸を欠失した新しいアイソフォームであったので、これを C-1-1 と命名した。そこで本研究では、軟骨組織形成における ERG 遺伝子の生理的役割を検討した。

先ず、ERG 遺伝子の2つのアイソフォームの軟骨組織における発現様式を検討するために、胎生17日齢の頸骨における両アイソフォームの発現を、in situ hybridization 法および免疫組織化学染色法により調べた。C-1-1 は主に関節軟骨に、ch-ERG は成長軟骨の成熟層に主に発現していた。さらに、定量的 PCR 法を用い、種々の軟骨組織や軟骨細胞の分化過程における両遺伝子の発現量を比較した。両アイソフォームはいずれの軟骨組織でも発現していた。しかし、関節軟骨組織において C-1-1 の発現量が最も高いことが明らかになった。また、培養細胞における C-1-1 の発現レベルは、軟骨細胞の最終分化形質の発現とは逆の相関を示し、C-1-1 が関節軟骨細胞の形質維持に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

次に、両アイソフォームの作用を検索するために、両遺伝子を RCAS レトロウイルスベクターに組み込み、3日齢のニワトリ胚肢芽に注入して、両遺伝子の初期骨格形成におよぼす作用を検討した。ステージ 22 のニワトリ後肢芽に ch-ERG および C-1-1 を組み込んだウイルス (RCAS-chERG および RCAS-C-1-1) を感染させ、8日後 (ステージ 36) に肢芽を取り出して組織学的に解析した。RCAS-chERG 感染群においては、対照群と比べて著明な差異は観察されなかった。しかし、RCAS-C-1-1 を感染させた後肢の軟骨組織は対照群に比べ短く、小型の軟骨細胞により占められていた。また、感染領域の骨格組織においては、同時期の対照群にみられる肥大化した軟骨細胞、骨髓形成および骨化した組織を全く認めなかった。本組織を in situ hybridization 法にて解析した結果、II型コラーゲン

ゲンの発現は対照群と同等であったが、肥大化のマーカーである X型コラーゲンの発現は認められなかった。また、感染領域の軟骨組織全域で永久軟骨および未熟軟骨細胞のマーカーである tenascin-C の発現が観察された。従って、C-1-1 は軟骨細胞の成熟・肥大化の抑制因子であり、骨格形成過程で永久軟骨あるいは未成熟な軟骨細胞の形質維持に寄与している可能性が考えられた。

さらにニワトリ胚胸骨より分離した軟骨細胞に chERG あるいは C-1-1 遺伝子を導入して、軟骨細胞分化に及ぼす影響を解析した。C-1-1 遺伝子を導入した軟骨細胞では、増殖の亢進と tenascin-C の発現増加が認められた。また、1 ヶ月以上の長期間にわたり軟骨細胞を培養しても、細胞の肥大化・石灰化は起こらなかった。一方、ch-ERG を導入した軟骨細胞では、軟骨細胞の最終分化のマーカーであるアルカリリフォスファターゼ活性が亢進し、軟骨基質の石灰化が誘導された。この実験より、ERG の作用は軟骨細胞に対する直接的な作用であることが示された。

以上の結果より、C-1-1 と ch-ERG は軟骨性の原始骨格形成以後の成長軟骨細胞と永久軟骨細胞の分化形質の決定に重要な役割を果たしていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、軟骨細胞の分化形質発現における ets related gene (ERG) による制御機構の解明を目的として、ニワトリ胚肢芽および培養軟骨細胞を用いて実験を行い、以下の結果を得ている。

- (1) ニワトリ ERG (ch-ERG) の新しいアイソフォームである C-1-1 をクローニングした。
- (2) 2 つのアイソフォームの発現をニワトリ胚頸骨を用いて、*in situ hybridization* 法および免疫組織化学染色法にて調べた結果、C-1-1 は関節軟骨細胞に、ch-ERG は成長軟骨の前肥大軟骨細胞に優位に発現していた。
- (3) C-1-1 をニワトリ肢芽に過剰発現させた結果、軟骨細胞は未成熟な形質を示し、軟骨細胞の成熟化および肥大化が抑制され、内軟骨性骨化が阻害されていた。
- (4) C-1-1 を過剰発現させた培養軟骨細胞には、関節軟骨が形成される過程で産生される細胞外基質である tenascin-C の発現誘導が促進されていた。
- (5) ch-ERG を過剰発現させた培養軟骨細胞では、アルカリリフォスファターゼ活性の上昇および基質石灰化の亢進等、軟骨細胞の成熟・分化が促進された。しかしながら、*in vivo* では大きな変化が認められなかった。

以上の結果は、C-1-1 と ch-ERG が骨格形成過程において、異なる発現様式と生物学的特性を有することを示す。すなわち、それぞれの ERG アイソフォームは永久軟骨細胞と成長軟骨細胞の分化方向の決定に深く関与すると考えられる。

以上の所見は関連する研究分野に新たな知見を加えるもので、論文は博士（学術）の学位に値するものと認める。