

Title	骨格形成過程における β カテニン/LEF/TCFシグナル経路の役割
Author(s)	玉村, 禎宏
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45167
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	たまむらよしひろ 玉村 禎 宏
博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)
学位記番号	第 18615 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	骨格形成過程における β カテニン/LEF/TCF シグナル経路の役割
論文審査委員	(主査) 教授 脇坂 聡 (副査) 教授 伊集院直邦 講師 平賀 徹 講師 池澤 一彦

論文内容の要旨

<目的>

頭部と鎖骨を除くほぼ全ての骨格組織は内軟骨性骨化により形成される。内軟骨性骨化では、骨格形成予定領域に未分化間葉系細胞が凝集して軟骨細胞となる。ついで、軟骨細胞は活発に増殖した後、多量の軟骨基質を分泌する。その結果、骨の鋳型である軟骨原基が成長する。その後、軟骨細胞は肥大化し、軟骨基質の石灰化を誘導する。石灰化軟骨基質は、血管と共に侵入してきた破軟骨細胞によって選択的に吸収を受け、同部には新生骨が添加される。従って、骨格組織形成は、軟骨細胞の発生、増殖、分化の場所や速度に大きく依存するといえる。

最近、内軟骨性骨化の制御に関わる様々な液性因子や転写調節因子の同定が進んでいる。Wnt ファミリー分子は、様々な器官の形態形成や細胞分化に関わる、分泌性糖タンパク質である。これまでに、①複数の Wnt 分子が軟骨細胞に発現すること、②*in vitro*において、Wnt1 および Wnt7a が未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化を抑制すること、③Wnt8 が軟骨細胞の最終分化を促進することが報告されている。これらの知見は、Wnt 分子も軟骨組織形成に深く関与することを示唆する。しかし、複数種の Wnt が同時に軟骨組織に作用し、さらにそれらの Wnt がどの受容体と結合するかが不明確であるため、*in vivo*での軟骨形成における Wnt 分子の役割は未だ不明な点が多い。一方、Wnt 分子の作用は 3 種類のシグナル経路 (Wnt/ β カテニン経路、PCP 経路、Wnt/ Ca^{2+} 経路) により伝達されると報告されている。そこで本研究では、軟骨組織形成に対する Wnt シグナルの生理的意義を明らかにすることを目的として、まず Wnt シグナルの主要な伝達経路である β カテニン/LEF/TCF 経路について追求した。すなわち、内軟骨性骨化過程における本シグナルの活性を時期、場所特異的に検索した。さらに、軟骨細胞分化初期から β カテニン/LEF/TCF シグナルを過剰に発現した場合の *in vivo*における軟骨組織形成の変化について検討した。

<実験方法>

1、マウス軟骨細胞における β カテニン/LEF/TCF 依存性 Wnt シグナルの検索

胎生 18 日齢マウス成長板軟骨組織において、本シグナル伝達経路の活性化の指標の一つである β カテニンの核への局在を抗 β カテニン抗体を用いた免疫染色法により検索した。

また、マウス軟骨細胞株 N1511 細胞の各分化段階における核内の β カテニン量をウエスタンブロッティング法により検討した。

2、 β カテニン/LEF/TCF 依存性 Wnt シグナルの軟骨組織形成に及ぼす影響の検討

II型コラーゲンプロモーター/エンハンサーの制御下に β カテニン/LEF/TCF シグナルを活性化させる構成的活性型 LEF1 (CA-LEF1) を発現するトランスジェニックマウス (CA-LEF1 TG マウス) を作製した。同トランスジェニックマウスの全身骨格像をアルシアンブルー/アリザリンレッド染色により観察した。さらに軟骨組織形成の変化を HE 染色により観察し、軟骨組織基質特異的なプロテオグリカンの蓄積の変化をサフラニン O 染色により検討した。また軟骨組織基質形成に重要な IX 型コラーゲン、アグリカン、Sox9 遺伝子、軟骨細胞分化マーカーであるインディアンヘッジホッグ、X 型コラーゲン遺伝子の発現の変化について *in situ hybridization* 法により検索した。

<結果>

1、マウス成長板軟骨組織における β カテニンの局在

β カテニンは静止軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層前期においては細胞質に存在したが、肥大軟骨細胞層後期では核に局在した。

2、軟骨細胞分化に伴う核内の β カテニン量の変化

マウス軟骨細胞株 N1511 細胞分化誘導 1 日後 (増殖期)、5 日後 (肥大化初期) の細胞の核抽出物から β カテニンは検出されなかった。培養 9 日後、11 日後 (肥大化後期) では、すでに報告されているニワトリ軟骨細胞同様、マウス軟骨細胞においても核抽出物から β カテニンが検出され、細胞分化が進むにしたがって検出量は増大した。

以上の結果より、 β カテニン/LEF/TCF 依存性 Wnt シグナルが後期肥大化軟骨細胞において活性化されることが示唆された。

3、CA-LEF1 TG マウスの解析

CA-LEF1 TG マウスは、胎生 18.5 日において致死となった。胎生 18.5 日齢の骨格標本では、著明な四肢の短縮が観察され、またアリザリンレッド染色陽性の石灰化基質がほとんど認められず、石灰化が遅延していた。さらに、しばしば関節部の癒合が生じていた。

組織学的には、成長板の層状構造がみられず、軟骨組織は小型の細胞が高密度に集合して形成されていた。また血管や線維芽細胞様の細胞の軟骨組織への侵入が認められた。サフラニン O 染色では、軟骨組織の染色性が低く、サフラニン陽性の軟骨組織内に陰性の細胞集団が混在する不均一な像を呈した。

さらに *in situ hybridization* 法による分析では、IX 型コラーゲン、アグリカン、Sox9 遺伝子の発現の低下が認められた。またインディアンヘッジホッグ、X 型コラーゲン遺伝子の発現は検出されなかった。

<考察、結論>

本研究結果より、 β カテニン/LEF/TCF 依存性 Wnt シグナルは、マウス成長板軟骨においても、軟骨細胞肥大化後期に活性化されることが示唆された。また、軟骨細胞分化初期より本シグナルを活性化させると軟骨組織形成が阻害され、著名な骨格形成異常が誘導されることが判明した。このことより、軟骨形成初期には、 β カテニン/LEF/TCF 依存性 Wnt シグナルの活性が阻害される必要があると考えられる。以前の研究で、Wnt アンタゴニストの Frzb が軟骨原基の形成に先立って高レベルに発現することが報告されている。従って、 β カテニン/LEF/TCF 依存性 Wnt シグナルが Frzb によって阻害されることによって、初期軟骨形成の進行が維持されると想像される。また、本シグナルは軟骨細胞の石灰化から骨への置換にかけての内軟骨性骨化の最終過程に必要であることが示されている。本研究で作製したトランスジェニックマウスの軟骨組織では、軟骨組織の崩壊や血管誘導などの内軟骨性骨化の最終過程でみられる幾つかの組織変化が誘導され、また軟骨基質産生の著明な低下がみられ、軟骨基質の石灰化およびそれに続く骨への置換も阻害されていた。このことは、 β カテニン/LEF/TCF 依存性 Wnt シグナルが内軟骨性骨化を促進するためには、十分に分化した軟骨細胞において活性化される必要があることを示している。すなわち、正常な骨格形成には、適切な軟骨細胞分化時期における β カテニン/LEF/TCF 依存性 Wnt シグナル活性の調節が必要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は軟骨形成過程における形態形成制御因子 Wnt の機能に関して、その主要なシグナル経路である β カテニン/LEF/TCF 経路の役割を構成的活性型変異体を発現するトランスジェニックマウスを用いて解析したものである。その結果、トランスジェニックマウスにおいては軟骨組織形成が非常に遅延し、さらに軟骨組織への血管や周囲の間質細胞の侵入が認められた。これらのことから、過剰な β カテニン/LEF/TCF 経路の活性化は軟骨形成に対して抑制的に作用することが判明した。本研究は軟骨形成における Wnt 分子の機能について新しい知見を与えたものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。