



Title	ジーントラップ法を用いた軟骨分化に関わる分子の同定
Author(s)	内橋, 隆行
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45188">https://hdl.handle.net/11094/45188</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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	うち はし たか ゆき 内 橋 隆 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 18600 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 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	ジーントラップ法を用いた軟骨分化に関わる分子の同定
論文審査委員	(主査) 教授 道上 敏美 (副査) 教授 古郷 幹彦 教授 村上 伸也 助教授 西村 理行

#### 論 文 内 容 の 要 旨

内軟骨性骨化は、脊椎動物の骨格形成に不可欠である。しかしながらその過程に関わる分子基盤については、未だ完全には明らかでない。

ジーントラップ法は、ゲノム中にレポーター遺伝子を有するトラップベクターをランダムに挿入することにより、挿入部位の遺伝子の機能を欠失させた変異体を作製し、当該遺伝子の機能を解析する方法である。本研究では、インスリン存在下で培養することにより、未分化間葉系細胞から石灰化軟骨細胞に至る軟骨分化のすべての過程を *in vitro* で再現できる、マウス胚性腫瘍由来細胞株 ATDC5 にジーントラップ法を用い、軟骨分化に関わる分子の単離同定を試みた。

自身のプロモーター及びエンハンサーを持たず、レポーター遺伝子 (lacZ)、選択マーカー遺伝子 (neo) の融合遺伝子を挿入された遺伝子のプロモーター活性に依存して発現する特徴をもつトラップベクター pPT1-geo を、未分化な状態の ATDC5 細胞に導入した。ネオマイシン耐性を示したトラップクローン 815 個についてレポーターである  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標にスクリーニングを行い、活性の高かった 26 クローンについて軟骨細胞分化を誘導した。アルシアンブルー染色、アリザリンレッド染色を行い、軟骨基質産生および石灰化の評価を行った結果、親株より分化が遅れていると考えられた 14 クローン、分化が進んでいると考えられた 8 クローン、分化に差を認めなかった 4 クローンに分類した。このうち親株より分化が遅れていると考えられた #6-30、および分化が進んでいると考えられた #7-57 について、解析を進めた。

5'RACE 法により、#6-30 においては phosphatidylinositol3-kinase (PI3K) p85 $\alpha$  サブユニット遺伝子がトラップされていることが明らかとなった。このクローンは、軟骨結節の数と染色性が ATDC5 親株に比べ、著しく低下していた。また、インスリン刺激による細胞増殖促進が著明に抑制されており、軟骨細胞分化初期に見られる II 型コラーゲン遺伝子、IX 型コラーゲン遺伝子、アグリカン遺伝子の発現も減少ないし遅延していた。また、PI3K 阻害剤 LY294002 を ATDC5 親株に作用させると、細胞増殖は #6-30 同様抑制された。以上の結果より、PI3K と軟骨細胞分化との関わりが示唆された。

一方、#7-57 は、5'RACE により、転写因子 NFIB をコードする遺伝子がトラップされていることが示唆された。#7-57 においては、親株よりもアリザリンレッド染色性が上昇しており、分化マーカー遺伝子の発現を検討したところ、親株では分化とともに発現量が上昇する II 型コラーゲン遺伝子の発現量が、#7-57 では分化期間を通じて増加し

なかった。しかしながら、肥大化軟骨細胞特異的なマーカー遺伝子であるX型コラーゲン遺伝子については発現がみられ、肥大軟骨細胞への分化は確認された。これらの結果より、#7-57においては、軟骨分化は進行するものの、正常な軟骨基質の産生が障害されていることが示唆された。また、ATDC5親株において、分化誘導開始2週後にNFIB遺伝子発現の増加が認められたことから、NFIB遺伝子のATDC5細胞における軟骨細胞分化への関わりが強く示唆された。NFIBの変異体の軟骨分化に及ぼす影響については、本研究の結果のみでは明らかになっておらず、今後の検討を要する。

今回同定されたp85 $\alpha$ 、NFIBのいずれの遺伝子もATDC5細胞の軟骨細胞分化に関わりを持つことが示唆され、ATDC5細胞におけるジーントラップ法の有用性が示された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、軟骨細胞分化能を有する細胞株ATDC5に対してジーントラップ法を適用し、軟骨細胞分化に関わる遺伝子の同定を試みたものである。その結果、phosphoinositide-3-kinase p85 $\alpha$ 及び転写因子NFIBが軟骨細胞分化に関わる分子として同定された。本研究は、軟骨細胞分化の分子基盤を理解する上で有益な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値すると考える。