

Title	軟骨特異的に発現させたGalnt3トランスジェニックマウスの解析
Author(s)	橋本, 綾子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45576">https://hdl.handle.net/11094/45576</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	橋本 (小野) 綾子 <small>はしもと おの あや こ</small>
博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)
学位記番号	第 19408 号
学位授与年月日	平成 17 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	軟骨特異的に発現させた Galnt3 トランスジェニックマウスの解析
論文審査委員	(主査) 教授 高田 健治 (副査) 教授 米田 俊之 助教授 原田 英光 講師 豊澤 悟

### 論文内容の要旨

#### [研究目的]

糖タンパク質は、糖質とタンパク質が共有結合した生体高分子であり、タンパク質に糖鎖が結合する様式は、一般に N 結合型糖鎖と O 結合型糖鎖の 2 種類ある。O 結合型糖鎖であるムチン型糖鎖の生合成は、ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素の働きにより、ポリペプチド鎖上の Ser あるいは Thr に N-アセチルガラクトサミンが転移することにより糖鎖合成が開始される。著者らの研究グループでは、軟骨細胞の成熟を強力に促進することが知られている転写因子 *Runx2* ノックアウトマウスの軟骨細胞に、*Runx2* を導入しマイクロアレイ法による *Runx2* の下流遺伝子を検討した結果、ムチン型糖鎖を形成するポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 3 (*Galnt3* 酵素) をコードする *Galnt3* 遺伝子が誘導された。一方、野生型マウスにおいて胎生期 12.5 日以降の軟骨細胞に発現することがわかった。そこで、本研究では、II 型コラーゲンプロモーターを用いて、軟骨細胞特異的に *Galnt3* を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、生体内の軟骨細胞における *Galnt3* の機能について *in vivo* で検討した。

#### [方法]

##### (1) トランスジェニックマウスの作製

II 型コラーゲン・プロモーター下に *Galnt3* cDNA を組み込んだ DNA 断片をマウス受精卵に注入し、*Galnt3* を軟骨細胞特異的に過剰発現する Tg マウスを作製した。導入遺伝子の確認は PCR で、導入遺伝子の発現はリアルタイム RT-PCR で行った。

##### (2) トランスジェニックマウスの解析

生体内の軟骨細胞における *Galnt3* の機能を調べるために以下の解析を行った。

- ・骨格標本
- ・組織標本：HE-Kossa 染色、*in situ* ハイブリダイゼーション (軟骨細胞分化マーカー遺伝子の発現の検討)、PAS 染色 (ムチン様ドメインをもつ糖タンパクの検出)、サフラニン O 染色 (プロテオグリカンの検出)、免疫染色 (タンパクレベルの検出)

- ・ウェスタンブロット (プロテオグリカンの定量)
- ・TUNEL 染色 (アポトーシスを起こした軟骨細胞の同定)

#### [研究成績]

- (1) 胎生期 18.5 日のマクروسコピーにおいて、*Galnt3*Tg マウスは、野生型マウスに比べ身体が小さく、四肢の著明な短縮を認めた。
- (2) 胎生期 18.5 日の骨格標本において、*Galnt3*Tg マウスは、野生型マウスに比べ胸郭がベル状を呈しており、また四肢の末端に向かうにしたがって、アルシアンブルーの染色性が低下していた。
- (3) 組織学的解析の結果、HE-Kossa 染色において *Galnt3*Tg マウスは、野生型マウスと比較して著明な軟骨小柱構造の欠落を伴う成長板の短縮を認めた。また、骨端部では軟骨の境界が不明瞭であり、関節の形成が遅延していた。
- (4) In situ ハイブリダイゼーションによって軟骨細胞マーカー遺伝子の発現を調べた結果、*Galnt3*Tg マウスでは軟骨細胞の分化が抑制されていることが示された。
- (5) PAS 染色により、ムチン様ドメインをもつ糖タンパクの検出を調べた結果、*Galnt3*Tg マウスは、野生型マウスと比較して細胞外のムチン様タンパクの産生が亢進していることが示された。
- (6) 主要な軟骨細胞外基質であるプロテオグリカンの検出を行ったところ、サフラニン O 染色が著明に低下しており、*Galnt3*Tg マウスでは、プロテオグリカンが著減していることが示された。
- (7) アグリカン遺伝子およびタンパクを検出するために、in situ ハイブリダイゼーション、免疫染色およびウェスタンブロットを行ったところ、*Galnt3*Tg マウスは、野生型マウスと比べてアグリカン mRNA の発現が増加していたが、アグリカタンパクの発現は低下していた。
- (8) フィブロネクチンタンパクの免疫染色を行ったところ、*Galnt3*Tg マウスでは、軟骨基質は著明に減少しており、軟骨細胞の凝集が認められた。
- (9) *Galnt3*Tg マウスにおける軟骨細胞のアポトーシスを検討するため TUNEL 染色を行ったところ、胎生期 18.5 日の野生型マウス、*Galnt3*Tg マウスともに、後期肥大軟骨細胞層において TUNEL 陽性細胞を認めた。*Galnt3*Tg マウスでは静止軟骨細胞層において TUNEL 陽性細胞を認め、アポトーシスが亢進していることが示された。

#### [結論]

II 型コラーゲンプロモーターを用いて *Galnt3* を軟骨細胞に過剰発現させたことにより、軟骨細胞外基質において、ムチン型糖鎖の増加およびプロテオグリカンの減少が見られた。そして軟骨基質の著減を認めるとともに、軟骨細胞の凝集、成熟の抑制およびアポトーシスの亢進を認めた。これらの結果より、*Galnt3* は軟骨細胞基質の糖鎖構造の修飾を通して、軟骨細胞の凝集、分化、アポトーシスに関与することが明らかとなった。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究の目的は、軟骨特異的に *Galnt3* を過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いて、その組織学的解析を行うことにより、生体内の軟骨細胞における *Galnt3* の機能について明らかにすることである。

その結果、トランスジェニックマウスは成長の抑制が認められ、また、軟骨基質の著減、軟骨細胞の凝集、成熟の抑制およびアポトーシスの亢進を認めた。

以上の研究結果により、*Galnt3* は、軟骨細胞基質の糖鎖構造の修飾を通して、軟骨細胞の凝集、分化、アポトーシスに関与することが明らかとなり、博士 (歯学) の学位を授与するに値するものと認める。