

Title	軟骨細胞の増殖・分化・アポトーシスに関する研究 : 細胞周期調節分子cyclin dependent kinase 6(Cdk6) およびcyclinD1の機能について
Author(s)	酒井, 暁子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46394">https://hdl.handle.net/11094/46394</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>〉</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	酒井 暁子
博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)
学位記番号	第 20232 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	軟骨細胞の増殖・分化・アポトーシスに関する研究～細胞周期調節分子 cyclin dependent kinase 6 (Cdk6) および cyclin D1 の機能について～
論文審査委員	(主査) 教授 高田 健治  (副査) 教授 上崎 善規 助教授 西村 理行 助教授 大倉 正也

### 論文内容の要旨

#### 目的

細胞周期調節分子 Cyclin dependent kinase 6 (Cdk6)、およびその活性を調節するパートナーの一つである cyclinD1 は、細胞増殖に重要な因子である。本研究では、軟骨細胞特異的に発現可能な II 型コラーゲンプロモーターを用いて Cdk6 および cyclinD1 を強制的に発現させた遺伝子組み換えマウス (transgenic mice : 以下 tg) を作製、また Cdk6 tg、cyclinD1 tg 各々を交配させることにより、Cdk6/cyclinD1 ダブル tg (以下、ダブル tg) を作製し、それらを用いて細胞周期の促進が、軟骨細胞の増殖・分化・アポトーシスに及ぼす影響を検討した。Cdk6 tg、cyclinD1 tg は、発現量の違いにより、それぞれ 2 系統樹立、ダブル tg は、強発現 tg どおしの交配あるいは強発現 tg と弱発現 tg の交配により 3 種類作製し、導入遺伝子の発現が最も強い系統について解析した。さらに、p53 ノックアウトダブル tg を作製、解析することにより、p53 の関与を評価した。

#### 方法および結果

Cdk6 tg、cyclinD1 tg は、すべての解析において、野生型と著変なく、ダブル tg でのみ表現型が見られた。

胎生期 18.5 日において、ダブル tg は、野生型に比べて体が小さく、四肢の著明な短縮を認めた。また顎骨の短縮による舌の突出が見られ、出生直後に胸郭の低形成による呼吸不全で全例死亡した。

胎生期 15.5 日の骨格標本では、ダブル tg は、野生型に比べて、顎、脊椎、四肢の短縮が著明で、軟骨の石灰化の遅れが明らかであった。

胎生期 18.5 日の骨格標本では、ダブル tg は、野生型に比べて顎、脊椎、四肢の短縮が見られ、胸郭がベル状を呈していた。脊椎などに骨化の遅れが見られたが、四肢などでは著明でなかった。

胎生期 15.5 日の脛骨における HE&Kossa 染色では、ダブル tg は、野生型に比して、骨端部の軟骨領域が不鮮明でかつ小さかった。骨端部に多数のアポトーシス小体が見られ、成長板全域に散在していた。野生型では、軟骨基質への石灰化および血管侵入が認められたのに対し、ダブル tg では、軟骨基質への石灰化および血管侵入の遅延が認められた。

軟骨細胞の分化段階を調べるために、胎生期 15.5 日の脛骨において、軟骨細胞分化マーカー遺伝子である II 型コラーゲン遺伝子、アグリカン遺伝子、X 型コラーゲン遺伝子およびオステオポンチン遺伝子の発現パターンを *in situ*

ハイブリダイゼーションにより検討した。ダブル tg では、野生型と比べて、II型コラーゲンおよびアグリカン遺伝子の発現領域は縮小し、境界は不鮮明であった。野生型で、X型コラーゲン遺伝子が肥大軟骨細胞層に発現し、オステオポンチン遺伝子が後期肥大軟骨細胞層に発現していたのに対し、ダブル tg では、X型コラーゲン遺伝子陽性細胞が骨幹部を占め、オステオポンチン遺伝子の発現はほとんど認めなかった。これらの結果より、ダブル tg では、軟骨細胞分化が抑制されていることが示された。

軟骨細胞増殖への影響を調べるために、胎生期 15.5 日で BrdU 取り込み解析を行った。脛骨の増殖軟骨細胞層において、全軟骨細胞中の陽性細胞の割合を比較した。ダブル tg において、増殖能の著明な亢進が認められた。

胎生期 15.5 日の脊椎、肋骨および四肢の軟骨細胞を用いて、フローサイトメトリーによる細胞周期解析を行った。ダブル tg では、野生型に比べて、G0/G1 期の細胞の割合が減少し、S 期および、G2/M 期の細胞の割合が増加した。つまり、ダブル tg では、細胞周期の G1/S 移行が促進されていることが示された。

軟骨細胞のアポトーシスを検討するため、胎生期 15.5 日で TUNEL 染色を行った。大腿骨骨端において、全軟骨細胞中の陽性細胞の割合を比較した。ダブル tg では、多数の陽性細胞を認め、野生型に比して有意にアポトーシスが亢進していることが示された。

ここまでの実験で、ダブル tg では、軟骨細胞の分化障害、細胞周期の G1/S 移行促進、アポトーシスの著明な亢進が認められることが明らかになった。しかし、軟骨領域および個体が小さくなる原因がアポトーシスによるものか否かは不明であった。p53 はアポトーシスに深く関与することが知られている。そこで p53 ノックアウトダブル tg を作製し、誘導されたアポトーシスの p53 依存性を検討した。

胎生期 15.5 日において骨格標本作製し検討した。p53 ノックアウトダブル tg は、野生型よりやや小さいが、ダブル tg より明らかに大きかった。アリザリンレッドの染色性は、野生型に比べ、ダブル tg と同程度に低下しており、軟骨の石灰化の遅れは明らかであった。

胎生期 15.5 日の脛骨における HE 染色では、p53 ノックアウトダブル tg は、ダブル tg に比べて軟骨領域の大きさは回復していたが、野生型ほどではなく、細胞の大きさが不均一で大きな細胞が所々に見られた。単位面積あたりの細胞数は、野生型、ダブル tg と著変なかった。

胎生期 15.5 日で BrdU 取り込み解析を行ったところ、p53 ノックアウトダブル tg は、野生型に比べて有意に陽性細胞の割合が多くダブル tg と同等であった。

TUNEL 染色では、p53 ノックアウトダブル tg は、陽性細胞が激減し、ダブル tg におけるアポトーシスは p53 依存性であることが解った。

#### 考察および結論

軟骨細胞での Cdk6、cyclinD1 の同時過剰発現は、細胞周期における G1/S 移行を促進すると同時に、p53 依存的にアポトーシスを誘導することが *in vivo* で証明された。細胞周期の G1/S 移行を促進するだけでは、軟骨細胞は増殖できずに逆にアポトーシスが誘導される。アポトーシスをレスキューしても、軟骨細胞が増殖し軟骨が大きくなる事は無かった。アポトーシス以外の分裂障害が誘導され、細胞の無尽蔵な増殖を制限させる機構が働いている可能性が考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

軟骨細胞特異的に Cdk6 および cyclinD1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いて、細胞周期の促進が、軟骨内骨化に及ぼす影響について、組織学的解析により検討した。

その結果、Cdk6 および cyclinD1 を同時に過剰発現させた場合、体が全体的に小さくなり、四肢の著明な短縮を認めるとともに、軟骨細胞分化の抑制、細胞周期の G1/S 移行の促進、アポトーシスの亢進を認めた。また、p53 遺伝子を欠落させたことで、誘導されたアポトーシスが抑制された。

以上のことにより、Cdk6 および cyclinD1 は、軟骨内骨化において、重要な役割を果たしてい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。