

| | |
|--------------|--|
| Title | Oxygen Tension Regulates Chondrocyte Differentiation and Function during Endochondral Ossification |
| Author(s) | 平尾, 眞 |
| Citation | 大阪大学, 2006, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/47365 |
| 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 | 平 尾 真 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (医 学) |
| 学位記番号 | 第 20715 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 18 年 10 月 20 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻 |
| 学位論文名 | Oxygen Tension Regulates Chondrocyte Differentiation and Function during Endochondral Ossification (内軟骨性骨化における軟骨細胞の分化及び機能に対する酸素濃度の影響) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 吉川 秀樹 (副査) 教授 仲野 徹 教授 金田 安史 |

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

軟骨は無血管組織で低酸素状況下であり、内軟骨性骨化において、静止軟骨、増殖軟骨層から肥大軟骨層になるにつれて酸素濃度が上昇する。また、近年 Hypoxia inducible factor (HIF) が軟骨の成長や維持に必須であるという報告があり、今回我々は酸素濃度が未分化な細胞から軟骨への分化や内軟骨性骨化において重要な要素であるという仮定をした。

[方法ならびに成績]

多分化能を有する未分化間葉系細胞、C3H10T1/2 を O₂ 20% の常酸素と 5% の低酸素環境下で培養後 alcian blue 染色にて、recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rh-BMP2) の濃度依存性に染色性は上昇し、低酸素によってさらに増強した。一方、alkaline phosphatase や alizarin red の染色性は抑制され、oil red O 染色では差はなかった。また、northern blot にて、2 型コラーゲンは BMP2 の濃度依存性に発現し低酸素で発現が増強した。以上から、低酸素状態が C3H10T1/2 細胞の軟骨への分化を促進し、骨分化を抑制し、脂肪分化には影響がないことが示唆された。このように、低酸素が BMP 依存性軟骨分化を促進することから、BMP シグナルを調査した。BMP のシグナル機構で、大きく Smad pathway があるが、p38MAPKinase (p38) の存在も指摘されており、この 2 つに焦点をあてた。western blot にてリン酸化を評価すると BMP による Smad のリン酸化は低酸素で抑制されたが、p38 のリン酸化は増強した。ここで、抑制型 Smad の Smad6 を C3H10T1/2 に強制発現させると、alcian blue 染色性の低酸素による促進の影響は残存した。dominant negative 型 MKK3 を用いて p38 を抑制すると alcian blue 染色性の低酸素の影響が消失した。p38 の特異的インヒビターである FR167653 を用いても同様の結果であった。Smad と p38 の両方を抑制すると、低酸素の影響が消失した。Northern blot にて 2 型コラーゲンの発現の動向も同様であった。以上から、低酸素では BMP シグナルは Smad よりむしろ p38 を介し、C3H10T1/2 細胞の軟骨への分化を促進することが示唆された。ここで、軟骨分化にて必須の転写因子とされている Sox9 の動向は、northern blot にて低酸素による発現の影響はなく、luciferase reporter assay にて転写活性への影響もなかった。免疫沈降にて低酸素によるリ

ン酸化の増強は認められなかった。次に、wildtype の mouse embryo の橈骨を用いて5日間器官培養を行った。safranin O 染色で評価すると、低酸素によって軟骨基質産生が増加した。また、Smad6 を軟骨特異的に発現させた transgenic mouse の器官培養にても低酸素で軟骨基質産生が増加し、p38 を抑制すると、wildtype も transgenic mouse も低酸素の影響は消失した。次に、軟骨の最終分化について、肥大軟骨の特異的マーカーである10型コラーゲンの発現を northern blot で確認したところ、低酸素で発現は抑制された。P38 を抑制すると常酸素、低酸素とも発現は抑制されたが、低酸素による抑制の影響は残存した。Smad を抑制すると、常酸素、低酸素とも発現は抑制されたが、低酸素による抑制の影響は消失した。Smad と p38 の両方を抑制すると、再び低酸素による抑制の影響が認められた。次に、器官培養で in Situ hybridization で10型コラーゲンの発現を確認すると低酸素で発現部位の割合は低下し、p38 を抑制しても同様であった。Smad6 transgenic mouse では、10型コラーゲンの発現の割合に差はなくなり、さらに p38 を抑制すると低酸素の方が強く発現が抑制された。この結果は vitro と同様であった。以上から、低酸素による軟骨最終分化の抑制には、Smad や p38 以外の別の要素も存在することが示唆された。近年、10型コラーゲンの発現が転写因子 Runx2 によって直接制御されているという報告があり、Runx2 の動向を評価した。C3H10T1/2 細胞において、発現は低酸素で低下し、転写活性も低下した。そこで、Runx2 を強制発現させると、低酸素でも遺伝子発現、転写活性とも常酸素と同等まで増強した。そこで、近年のヒストンデアセチラーゼ4 (HDAC4) が直接 Runx2 と結合しその転写活性を阻害し、Runx2 自身の発現、また Runx2 のターゲット遺伝子の発現が抑制されるという報告を受け、HDAC4 の動向を確認した。HDAC4 は C3H10T1/2 細胞で発現しており、免疫染色にて内軟骨性骨化において肥大化軟骨層に発現していた。蛍光免疫染色にて HDAC4 は低酸素にて、核内の発現が上昇した。ここで、siRNA を用いて HDAC4 を特異的に抑制すると低酸素下でも Runx2 の遺伝子発現、転写活性とも上昇し、10型コラーゲンの発現も増強した。以上から、軟骨の最終分化における低酸素の影響は HDAC4 も関与していると考えられた。

[総 括]

低酸素によって未分化間葉系細胞、C3H10T1/2 の軟骨への分化、軟骨基質産生が促進され、最終分化は抑制された。また、内軟骨性骨化において、低酸素によって軟骨基質産生が促進され、最終分化は抑制された。これらの低酸素による初期軟骨分化促進には p38MAPK の活性化が関与し、転写因子 Sox9 を介していなかった。最終分化抑制には、Smad の抑制と HDAC4 の活性化による転写因子 Runx2 の抑制が関与していた。

論文審査の結果の要旨

関節軟骨は無血管組織で、低酸素状態にある。また、内軟骨性骨化において酸素濃度勾配が存在する。本研究では、酸素濃度が内軟骨性骨化に大きな影響を与えるのではないかとこの仮定のもとに、未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 の培養とマウスのエンブリオを用いた器官培養を酸素濃度 20%の常酸素群と酸素濃度 5%の低酸素群に分けて行った。低酸素によって、初期軟骨分化は促進したが、軟骨の最終分化は逆に抑制された。またこれらの現象は、骨形成因子のシグナル機構である、Smad や p38MAPK、さらにヒストンデアセチラーゼの一つである HDAC4 によって制御されていた。低酸素によるシグナルの解明、もしくは酸素によるストレスを防御することが、変形性関節症や関節リウマチなど、軟骨の変性や分化を進める疾患に対する治療の一端を担う可能性が示唆された。以上から、本研究は臨床的に意義のあるものであり、博士（医学）の学位授与に値するものと考えられる。