

Title	軟骨分化過程におけるAridファミリー転写因子Mrf1の役割の解明
Author(s)	天野, 克比古
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47602
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	あまの かつひこ 天野 克比古
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 21037 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 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	軟骨分化過程における Arid ファミリー転写因子 Mrf1 の役割の解明
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 米田 俊之 助教授 和田孝一郎 助教授 社 浩太郎

論文内容の要旨

<目的>

内軟骨性骨形成は、骨端部の成長板において、軟骨細胞の増殖、続いて肥大化、石灰化、アポトーシスを含めた分化、軟骨組織への血管侵入、それに伴う破骨細胞前駆細胞、ならびに骨芽細胞前駆細胞の浸潤、そして骨への置換、といった一連の過程を経て完結する。このような内軟骨性骨形成において、軟骨細胞の増殖や分化は様々なホルモン、サイトカインおよび転写因子によって制御されている。転写因子 Sox9 は、II 型コラーゲンなどの軟骨基質の発現を促進し、内軟骨性骨形成において必須であることが示されている。Sox9 は転写ファクトリーと呼ばれる巨大なタンパク複合体を形成することにより標的遺伝子の発現を制御することが示唆されているが、軟骨分化における、Sox9 の転写ファクトリー形成に関する詳細は不明である。本研究においては、内軟骨性骨形成制御の分子機構を明らかにする目的で、Sox9 転写ファクトリーの構成因子を同定し、その分子の機能的役割の解明を試みた。

<実験方法>

1. Sox9 転写ファクトリーの構成因子の同定

軟骨細胞株 ATDC5 をインスリン存在下で培養した後、完全長 cDNA 発現ライブラリーを作成した。各クローンを ATDC5 細胞に導入し、II 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性を指標にスクリーニングを行った。

2. Mrf1 mRNA の発現の解析

各臓器および C3H10T1/2 細胞より、全 RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した後、Mrf1 に対する特異的 Taqman probe を用い、定量的 RT-PCR を行った。

3. Mrf1 と Sox9 の結合実験

BOSC23 細胞に、Flag 標識された Mrf1 と HA 標識された Sox9 発現プラスミドをトランスフェクションした。抗 Flag 抗体で免疫沈降した後、抗 HA 抗体を用いウエスタンブロッディングを行った。

4. Mrf1 の細胞内局在の検討

COS7細胞に Venus 標識された Mrf1 および DsRed 標識された Sox9 発現プラスミドをトランスフェクションした。遺伝子導入 48 時間後、4%ホルマリン-PBS で細胞を固定し、DAPI による核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

5. マウス胎児中足骨の器官培養

胎生 15 日齢のマウス胎児中足骨を実体顕微鏡下において分離し、37°C、5%CO₂ で 1 週間培養後、病理組織学的検討を行った。アデノウイルスによる遺伝子導入あるいは、BMP2 (250 ng/ml) 添加は、培養 2 日目に行った。

6. 培養細胞およびマウス胎児中足骨への遺伝子導入

Myc-tag で標識した Mrf1 cDNA を組み込んだアデノウイルスを作成し、培養細胞およびマウス胎児中足骨に感染させた。

<結果>

1. Mrf1 遺伝子の同定および発現動態の検討

II 型コラーゲン遺伝子プロモーター活性の上昇を指標にスクリーニングを行った結果、DNA 結合能を有する Arid (AT-rich interaction) ドメインを含む Mrf1 を同定した。Mrf1 mRNA の組織分布を検討した結果、Mrf1 は軟骨、心臓および精巣に高量に分布していた。また C3H10T1/2 細胞に、Sox5、6 および 9 を過剰発現させ、軟骨細胞分化を促進させると、Mrf1 の発現は上昇した。

2. Mrf1 と Sox9 の協調作用

免疫共沈降法により、Mrf1 と Sox9 は物理的に結合することが見出された。さらに Mrf1 は核内に分布し、Sox9 と共局在した、また Mrf1 は Sox9 と協調して、II 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性を著明に上昇させた。さらに、C3H10T1/2 細胞において、Mrf1 は Sox9 ファミリーによる II 型コラーゲンの発現誘導効果を増加させた。

3. 軟骨分化における Mrf1 の役割

マウス胎児中足骨に BMP2 存在下で Mrf1 を過剰発現させると、骨端部分の成長が促進された。組織学的検討の結果、Mrf1 は、扁平あるいは球型の小さな II 型コラーゲン陽性、X 型コラーゲン陰性の軟骨細胞、すなわち分化初期の軟骨細胞の増殖を促進した。一方、Mrf1 は、Sox9 と同様に、マウス胎児中足骨の石灰化を抑制した。さらに初代培養軟骨細胞に Mrf1 を過剰発現すると、Mrf1 は BMP2 で誘導される石灰化を抑制した。

<結論>

本研究において分離された Arid ファミリー分子 Mrf1 は、Sox9 転写ファクトリーの一員として、軟骨細胞の初期分化を促進し、一方、石灰化などの後期分化を抑制することが初めて明らかとなった。以上の結果より、内軟骨性骨形成過程における Sox9 転写コファクターの重要性が示唆され、内軟骨性骨形成の制御分子メカニズムの一端が解明された。また、Mrf1 は、内軟骨性骨形成の薬物的制御を試みる場合の標的分子になり得ることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は内軟骨性骨形成制御の分子機構を明らかにする目的で、Sox9 転写ファクトリーの構成因子を同定し、その分子の機能的役割の解明を試みたものである。

その結果、Mrf1 は Sox9 転写ファクトリーの構成因子として内軟骨性骨形成を制御する新規の転写調節因子であることを見出したものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。