

Title	PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation
Author(s)	北, 圭介
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49857
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	北 圭 介
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 22461 号
学位授与年月日	平成20年9月25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	PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation (PI3K/Akt シグナルは、軟骨細胞の最終分化を調節するシグナル経路である)
論文審査委員	(主査) 教授 仲野 徹 (副査) 教授 宮崎 純一 教授 岡田 雅人

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

脊椎動物の骨形成には、内軟骨性骨形成と膜性骨形成の二つの様式があり、前者では、まず間葉系細胞が凝集し、Type II コラーゲンを発現する静止軟骨細胞に分化した後に、増殖軟骨細胞を経て、Type X コラーゲンを発現する肥大軟骨細胞へと最終分化する。一方、ヒト滑膜由来間葉系幹細胞である hSSCs (human synovial stromal cells) は *in vitro*において軟骨、骨、脂肪細胞へと分化することができることから、ヒト軟骨の発生・分化研究において有用な *in vitro*モデル系であるだけでなく、軟骨の再生医療へのソースになると考えられている。

PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) は、増殖因子や接着因子により活性化される脂質リン酸化酵素で、下流のセリンスレオニンキナーゼAktなどを活性化することにより、様々な細胞応答を制御する。細胞株などを用いた解析から、PI3K/Aktシグナルが軟骨の発生・分化に関与する可能性が示唆されてきたが、その作用機序については不明な点が多い。本研究では、マウス胎仔骨の *ex vivo*器官培養系と hSSCsからの *in vitro*軟骨分化系を用いて、軟骨分化におけるPI3K/Aktシグナルの機能を解析した。

〔 方法 〕

本研究では、Akt-Mer融合タンパクを用いて、Aktシグナルを人為的に制御する実験を展開した。Akt-Merは、活性化型Aktと変異型エストロゲン受容体 (Mer: modified estrogen receptor) の融合タンパクであり、Merのリガンドである40HT (4hydroxy-tamoxifen) の添加/除去によりAkt-Merのリン酸化酵素活性をon/offすることができる。このAkt-Merを発現するトランスジェニックマウス (Akt-Merマウス) の胎仔 (E14.5)、および、野生型マウス胎仔の橈骨を40HT存在下5日間器官培養し、Alcian blue染色、抗Type X コラーゲン抗体を用いた免疫染色、Runx2 に対する *in situ* hybridizationを行い、Akt活性化が軟骨分化へ及ぼす影響を調べた。

また、野生型マウス胎仔の橈骨をPI3K阻害剤LY294002の存在下で培養し、同様の手法で軟骨分化への影響を調べた。

hSSCsは、pellet culture法により、TGF β 存在下軟骨細胞へと分化誘導した。Akt-Mer遺伝子を導入したhSSCsを、40HT存在下、非存在下に軟骨細胞へと分化誘導し、Alcian Blue染色、GAG (glycosaminoglycan) 量の定量をおこない、RT-PCR法により軟骨分化マーカー (*Sox9*, *Col2a1*, *Runx2*, *Col10a1*遺伝子) の発現を調べた。また、遺伝子導入しないhSSCsを、LY294002の存在下で分化誘導し、PI3K阻害の効果解析した。

〔 結果 〕

野生型マウスの胎仔橈骨を抗phospho-Akt抗体で免疫染色したところ、静止軟骨層、増殖軟骨層において強いphospho-Aktシグナルが認められたが、前肥大軟骨層、肥大軟骨層と分化が進むにつれてこのシグナルは著明に低下した。一方、Akt-Merマウスの橈骨を40HT存在下で培養すると、すべての分化段階の軟骨細胞において強いphospho-Aktのシグナルを認めた。このAkt-Merマウスの橈骨を組織学的に解析したところ、Alcian blueで濃染される増殖軟骨層が伸張していたが、肥大軟骨層は消失していた。さらに、Akt-Merマウスでは、前肥大軟骨細胞のマーカーであるRunx2の発現が低下し、肥大軟骨細胞のマーカーであるType X コラーゲンの発現が消失していた。一方、LY294002存在下で野生型マウスの橈骨を培養すると、肥大軟骨層が伸長し、Type X コラーゲンの発現が増強した。

次に、hSSCsをpellet culture法により軟骨細胞に分化させた。この系においてAktを活性化させると、pelletが巨大化し、Alcian blueで濃染される増殖軟骨細胞領域の拡大、GAG産生量の増加が認められた。RT-PCRをおこなうと、初期軟骨細胞のマーカーである*Sox9*, *Col2a1*の発現量に変化はなかったが、後期軟骨細胞のマーカーである*Runx2*, *Col10a1*の発現量は著明に低下した。一方、LY294002存在下では、pelletは小さくなり、Alcian Blueで濃染される領域も減少した。さらに、RT-PCRでは、後期軟骨細胞のマーカー*Runx2*, *Col10a1*の発現量が上昇した。以上の結果より、いずれの軟骨分化誘導系においても、Aktシグナルの活性化は肥大軟骨への分化を阻害すること、PI3Kの阻害は肥大軟骨への分化を促進することが示された。

〔 総括 〕

本研究では、マウス胎仔骨器官培養系とヒト滑膜由来間葉系幹細胞からの軟骨分化系を用いて、軟骨細胞分化におけるPI3K/Aktシグナルの機能を解析した。いずれの実験系においても、Aktシグナルを活性化させると、増殖軟骨細胞の増殖が促進され、肥大軟骨細胞への分化が阻害された。一方、PI3Kシグナルを阻害すると、増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化が促進された。また、橈骨の軟骨分化過程では、増殖軟骨細胞において高いAktの活性化が認められ、最終分化に入る段階でAktの活性化が抑制されていた。以上の結果から、PI3K/Aktシグナルは、増殖期の軟骨細胞の増殖を促進し、最終分化への移行を抑制するシグナルであることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物の内軟骨性骨形成では、まず間葉系細胞が凝集し、Type II コラーゲンを発現する静止軟骨細胞に分化した後に、増殖軟骨細胞を経て、Type X コラーゲンを発現する肥大軟骨細胞へと最終分化する。PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) は、増殖因子や接着因子により活性化される脂質リン酸化酵素で、下流

のセリンスレオニンキナーゼAktなどを活性化することにより、様々な細胞応答を制御する。細胞株などを用いた解析から、PI3K/Aktシグナルが軟骨の発生・分化に関与する可能性が示唆されてきたが、その作用機序については不明な点が多い。

北圭介氏は、マウス胎仔骨の *ex vivo* 器官培養系とヒト滑膜由来間葉系幹細胞からの *in vitro* 軟骨分化系を用いて、軟骨分化における PI3K/Akt シグナルの機能を解析した。Akt シグナルは野生型マウスでは静止軟骨層、増殖軟骨層において強い活性化が認められたが、前肥大軟骨層、肥大軟骨層と分化が進むにつれて活性が著明に低下していた。またマウス胎仔骨器官培養系、および、ヒト間葉系幹細胞からの軟骨分化系において、Akt シグナルを活性化させると、増殖軟骨細胞の増殖が促進され、肥大軟骨細胞への分化が阻害された。一方、PI3K シグナルを阻害すると、増殖軟骨から肥大軟骨細胞への分化が促進された。以上より PI3K/Akt シグナルは、増殖期の軟骨細胞の増殖を促進し、最終分化への移行を抑制するシグナルであることが明らかとなった。以上の研究結果は、軟骨細胞分化のメカニズムに新たな知見を加えるだけでなく、軟骨の再生医療への応用においても意義・波及効果は大きい。従って、本論文は博士（医学）の学位に値するものと認める。