Osaka University Knowledge Archive

Title	軟骨細胞分化過程における陽イオンチャネルＴＲＰＶ４の役割の解明
Author(s)	村松, 周治
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57592
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【1】

氏　　名	村　松　周　治（むら　まつ　しゅう　じ）
博士の専攻分野の名称	博　士（学　術）
学　位　記　番　号	第　２４０８２　号
学位授与年月日	平成22年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	**軟骨細胞分化過程における陽イオンチャネルTRPV4の役割の解明**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　米田　俊之 （副査） 教　授　村上　伸也　　講　師　前田　隆史　　講　師　佐藤　　淳

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

脊椎動物の骨格の大部分は、軟骨形成後に骨に置換する内軟骨性骨化より形成される。内軟骨性骨化は未分化間葉系細胞の凝集に始まり、その後Ⅱ型コラーゲンやアグリカンなどの基質を産生する軟骨細胞への分化、増殖、肥大、アポトーシスを経て最終的に骨に置換する連続的な骨形成過程である。転写因子Sox9は、内軟骨性骨化において未分化間葉系細胞の凝集およびその後の軟骨細胞の分化過程に必須であることが明らかにされている。しかし、軟骨細胞分化におけるSox9の活性化機序に関する詳細は不明である。本研究においては、Sox9を制御する分子メカニズムを解明する目的で、Sox9の発現あるいは活性制御に関与する新たな分子の同定を試み、その分子の軟骨細胞分化過程における役割の解明を行なった。

【方法】

1. Sox9の制御に関与する分子のスクリーニング

軟骨細胞株ATDC5細胞のmRNAより、オリゴキャッピング法を用いて完全長cDNA発現ライブラリーを作製した。各クローンをⅡ型コラーゲン遺伝子のプロモーター領域とSox9結合配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターと共にATDC5細胞に共導入し、ルシフェラーゼ活性を指標にスクリーニングを行なった。

2. mRNAの発現解析

インスリン刺激したATDC5細胞から経時的に全RNAを抽出し、cDNAマイクロアレイ法により解析した。TRPV4の発現はTaqMan probeを用いたReal-time定量PCR法により評価した。マウス軟骨組織でのTRPV4の発現は、各組織から全RNAを抽出しRT-PCR法で行なった。

3. レポーターアッセイ

TRPV4の活性化は、TRPV4アゴニスト、4α-phorbol-12,13-didecanoate（4α-PDD）を用いて実施した。その反応性はⅡ型コラーゲン遺伝子レポーターの活性で評価した。TRPV4の発現抑制は、short hairpin RNA（shRNA）を発現するアデノウイルスベクターを用いて行った。.

4. 軟骨細胞分化の検討

ATDC5細胞および間葉系幹細胞株C3H10T1/2細胞を4α-PDDで刺激し、アルシアンブルー染色により軟骨分化を評価した。Sox9タンパクの発現は、ウエスタンブロット法により検討した。

【結果】

1. Sox9の制御に関与する分子のスクリーニング

約12万のcDNAクローンをスクリーニングした結果、Ⅱ型コラーゲン遺伝子レポーターを活性化する遺伝子を46種類同定した。これらの遺伝子に関して、ATDC5細胞の軟骨分化過程での発現変動をcDNAマイクロアレイ法で調べた結果、軟骨細胞の分化に平行して、Sox5、Sox6、Ifitm5、Myd116、およびTRPV4のmRNA発現の上昇が認められた。これらの遺伝子の中で、軟骨細胞分化との関わりが不明であり、レポーターを強く活性化したTRPV4に着目して以下の検討を行なった。

2. TRPV4の発現

ATDC5細胞およびC3H10T1/2/細胞の軟骨細胞分化過程におけるTRPV4の経時的発現変動をReal-time定量PCR法により検討した。その結果、TRPV4 mRNAの発現は軟骨細胞分化に伴って上昇し、その発現様式はⅡ型コラーゲン、およびアグリカンの発現様式と近似していた。また、マウス軟骨組織での発現をRT-PCR法により調べた結果、TRPV4は肋軟骨細胞、胎生12日齢の肢芽組織、ならびに12週齢マウスの関節軟骨組織に高い発現を認めた。

3. TRPV4活性化による細胞内カルシウム濃度上昇とSox9の発現誘導

TRPV4を活性化する化合物4α-PDDはATDC5細胞において細胞内カルシウムイオン濃度を著明に上昇させた。定量PCR法およびウエスタンブロット解析の結果、ATDC5細胞において4α-PDDはSox9 mRNAの発現を誘導し、Sox9タンパク質を増加させた。これらの促進作用は非選択的TRPV4阻害剤ルテニウムレッド(RR)によって阻害された。

4. TRPV4活性化によるⅡ型コラーゲン遺伝子レポーターへの作用の検討

ATDC5細胞およびC3H10T1/2細胞を4α-PDDで刺激すると、Ⅱ型コラーゲン遺伝子レポーター活性の上昇が認められ、その活性上昇はルテニウムレッド、あるいはTRPV4に対するshRNAによって抑制された。

5. 軟骨細胞分化におけるTRPV4の役割

4α-PDDはATDC5細胞のインスリン依存性軟骨細胞分化を促進した。また4α-PDDはBMP-2と協調してC3H10T1/2細胞の軟骨細胞分化を亢進させ、その亢進作用はTRPV4に対するshRNAによって抑制された。

6. TRPV4活性化によるⅡ型コラーゲン遺伝子レポーターの応答におけるカルシウムイオンの重要性

ATDC5細胞において4α-PDDは$CaCl_2$濃度依存的にⅡ型コラーゲン遺伝子レポーター活性を上昇させた。EGTAあるいはカルモジュリン阻害剤W-7の添加は、4α-PDD依存性のⅡ型コラーゲン遺伝子レポーターの活性化を阻害した。

【結論・考察】

本研究により、Sox9の発現や活性の制御に関与する分子のクローニングシステムの構築に成功し、その候補分子を多数分離同定することができた。特に、陽イオンチャネルTRPV4が細胞内カルシウムシグナルの活性化を介してSox9の発現を誘導し、軟骨細胞の初期分化を促進することが初めて明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究においては哺乳動物の骨格形成の基盤である軟骨細胞の分化において陽イオンチャンネルＴＲＰＶ４が果たす役割について解析を加えた。本研究により、ＴＲＰＶ４が軟骨細

胞の初期分化過程において促進的な機能を果たすことが示され、内軟骨性骨形成を制御する分子メカニズムの一端が明らかとなった。以上の結果は、哺乳動物の骨格形成における陽イオンチャンネルの役割を初めて示したのみならず、将来的に軟骨性疾患の病態解明および治療法開発にも指針を与えるものであり、博士（学術）を授与するに値すると認める。