



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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【1】

氏 名	村 松 周 治
博士の専攻分野の名称	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	第 2 4 0 8 2 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、4 α -phorbol-12,13-didecanoate (4 α -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 4 α -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

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 4 α -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 4 α -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 4 α -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
4 α -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 4 α -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 4 α -PDD は CaCl₂ 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、4 α -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

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。