OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Sox9 in differentiated chondrocytes sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through p110α-Akt pathways
Author(s)	池上, 大督
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58187
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

【98】

氏名	池上大督（いけがみだいすけ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　24420　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	Sox9 in differentiated chondrocytes sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through p110α-Akt pathways （成熟軟骨細胞においてSox9はp110α-Akt pathwayを介して肥大化と生存を制御する）
論文審査委員	（主査） 教授　吉川　秀樹 （副査） 教授　大薗　恵一　　教授　菅本　一臣

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕

軟骨の発生は凝集した間葉系細胞が軟骨細胞へと分化することに始まる。Sox9は凝集する間葉系細胞に発現し、軟骨形成に必須であることが知られている。一方、Sox9は軟骨細胞への分化後も発現し続けるが、分化後の軟骨におけるSox9の機能の解析は不十分である。本研究では、Cre-loxPシステムを用い、軟骨形成後に軟骨細胞でSox9を欠失するconditional knockout mice(CKOマウス)を作製して分化後の軟骨細胞におけるSox9の役割の解析を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

軟骨特異的に発現する*Col11a2*遺伝子のプロモーターとエンハンサーを組み合わせて2種類のCre transgenic miceを作製した。*11Enh-Cre* transgenic miceは軟骨に分化した直後の円形の軟骨細胞で、*11Prom-Cre* transgenic mice Creリコンビナーゼはそれよりも遅れて扁平な軟骨細胞で、それぞれCre recombinaseを発現する。まず*11Enh-Cre* transgenic miceと$Sox9^{flox/flox}$ miceを交配させ、Sox9を軟骨分化後早期に欠失させる*11Enh-Cre; Sox9*$^{flox/flox}$ miceを作製し、解析した。胎生13.5日の*11Enh-Cre; Sox9*$^{flox/flox}$ miceでは上腕軟骨原器は形成されず、不規則な細胞の凝集を認めるのみであった。軟骨周膜周辺の軟骨細胞のみSox9を発現していた。Sox9の発現が消失している軟骨細胞では*Col2a1*の発現も消失していた。またTUNEL染色を行った所、CKOマウスの軟骨細胞はアポトーシスを生じていることが分かった。次に軟骨分化後後期におけるSox9の役割を調べる為、*11Prom-Cre* transgenic miceと$Sox9^{flox/flox}$ miceを交配させ*11Prom-Cre; Sox9*$^{flox/flox}$ miceを作製した。胎生14.5日の*11Prom-Cre; Sox9*$^{flox/flox}$ miceでは上腕軟骨原器の中心部の幅が著しくなっていた。Sox9の発現はflat chondrocyteで消失しており、同部での*Col2a1*の発現も消失していた。*Col10a1*の発現は消失しており、上腕軟骨原器中心部の細胞はアポトーシスに陥っていた。以上より分化後の成熟軟骨細胞ではSox9は細胞の生存と肥大化に必須と考えられた。さらにhuman chondrosarcoma cell lineであるSW1353にsiRNAを用いて、SOX9 knockdownを行ったところ、ここでも細胞のアポトーシスを認めた。Chondrosarcoma cell lineにおいても細胞の生存にSox9が必要と考えられた。Sox9が軟骨細胞の生存を制御するメカニズムを検討した。まずSW1353にSOX9の過剰発現とknockdownを行い、ウェスタンブロットでAKT,MAPKの活性を調べた所、SOX9の発現の変化に一致してリン酸化AKTシグナルも変化することがわかった。*11Prom-Cre; Sox9*$^{flox/flox}$ miceに対し免疫組織染色を行いin-vivoでもSox9の発現消失部位に一致してリン酸化Aktシグナルが低下することを確認した。そこで*11Prom-Cre; Sox9*$^{flox/flox}$*; Pten*$^{flox/flox}$ miceを作製した。このdouble CKOマウスではflat chondrocyteでSox9と同様にPtenの発現も消失しており、また*11Prom-Cre; Sox9*$^{flox/flox}$ miceで見られたリン酸化Aktシグナル低下の回復、上腕軟骨原器中心部狭小化の回復、Col10a1の発現及び軟骨細胞のアポトーシス亢進の部分的回復をみとめた。以上よりSox9はAktのリン酸化を介して軟骨細胞の生存を制御すると考えた。我々はさらにSox9がAktのリン酸化を調整するメカニズムを調べることとした。SOX9を過剰発現させたSW1353からmRNA、cell lysateを回収し、PI3K subunitの発現を調べたところ、p110αのみが、mRNAレベル、蛋白レベルともに発現が亢進していた。*11Prom-Cre; Sox9*$^{flox/flox}$ miceを用いて免疫組織染色を行ったところ、Sox9の発現が消失している細胞ではp110αの発現も低下していた。さらにpromoter assay, ChiP assayを行い、Sox9はp110αの転写開始位置より上流70bpに直接結合し、その転写活性を亢進させることが分かった。以上より成熟軟骨細胞においてSox9はPI3K subunitであるp110αの転写活性を、そのpromoter領域に直接結合することにより亢進させ、それによりPI3Kを活性化させAktのリン酸化を促すことにより細胞の生存と肥大化を制御すると考えられた。

〔　総　　括　〕

成熟軟骨細胞におけるSox9の役割を種々のconditional knockout miceを作製し、解析した。Sox9を欠失させた軟骨細胞はCol10a1を発現せず、アポトーシスに陥り、Aktの活性が低下していた。さらにPtenも欠失させることにより、Aktの活性の回復とともにCol10a1の発現も回復し、またアポト‐シスも減弱していた。Sox9による軟骨細胞の生存と肥大化の制御にはp110α-PI3K/Akt pathwayが関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

Cre-loxPシステムを用い、分化後の軟骨細胞でSox9を欠失するconditional knockout mice(CKOマウス)を作製して成熟軟骨細胞におけるSox9の役割の解析を行った論文である。軟骨特異的に発現する*Col11a2*遺伝子のプロモーターとエンハンサーを組み合わせた2種類のCre transgenic miceを用いており、*11Enh-Cre* transgenic miceは軟骨に分化した直後の円形の軟骨細胞で、*11Prom-Cre* transgenic miceはそれよりも遅れて扁平な軟骨細胞で、それぞれCre recombinaseを発現する。これらの2種類のCreマウスを用いて、それぞれ分化後早期と後期の軟骨細胞でSox9を欠失させるといずれにおいても軟骨細胞は肥大化せず、アポトーシスに陥ることを確認した。さらにhuman chondrosarcoma cell lineであるSW1353にSOX9のknockdownを行ったところ、ここでも細胞はアポトーシスに陥ることを確認した。Sox9が軟骨細胞の生存を制御するメカニズムを調べたところ、Sox9はPI3Kのsubunitであるp110αの発現を、それをコードする遺伝子であるPik3caのpromoter領域に直接結合することにより亢進させ、それによりPI3Kを活性化させAktのリン酸化を促すことにより細胞の生存と肥大化を制御することがわかった。軟骨細胞におけるSox9の役割

を、CKOマウスの表現型だけでなく、そのメカニズムまで含めて解析した研究内容であり、

学位の授与に値すると考えられる。