



Title	Nkx3.2 Promotes Primary Chondrogenic Differentiation by Upregulating Col2a1 Transcription
Author(s)	川戸, 良能
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59799
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

氏 名	かわ 戸 良 能
博士の専攻分野の名称	博 士（医学）
学 位 記 番 号	第 2 5 6 6 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 24 年 9 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Nkx3.2 Promotes Primary Chondrogenic Differentiation by Upregulating Col2a1 Transcription (Nkx3.2 は、Ⅱ型コラーゲン転写活性を上昇させることで初期軟骨分化を促進する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 秀樹 (副査) 教 授 大藁 恵一 教 授 仲野 徹

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

The Nkx3.2 transcription factor promotes chondrogenesis by forming a positive regulatory loop with a crucial chondrogenic transcription factor, Sox9. Previous studies have indicated that factors other than Sox9 may promote chondrogenesis directly, but these factors have not been identified. Here, we test the hypothesis that Nkx3.2 promotes chondrogenesis directly by Sox9-independent mechanisms and indirectly by previously characterized Sox9-dependent mechanisms.

〔 方 法 なら び に 成 績 〕

C3H10T1/2 pluripotent mesenchymal cells were cultured with bone morphogenetic protein 2 (BMP2) to induce endochondral ossification. Overexpression of wild-type Nkx3.2 (WT-Nkx3.2) upregulated glycosaminoglycan (GAG) production and expression of type II collagen $\alpha 1$ (*Col2a1*) mRNA, and these effects were evident before WT-Nkx3.2-mediated upregulation of Sox9. RNAi-mediated inhibition of Nkx3.2 abolished GAG production and expression of *Col2a1* mRNA. Dual luciferase reporter assays revealed that WT-Nkx3.2 upregulated *Col2a1* enhancer activity in a dose-dependent manner in C3H10T1/2 cells and also in N1511 chondrocytes. In addition, WT-Nkx3.2 partially restored downregulation of GAG production, Col2 protein expression,

and *Col2a1* mRNA expression induced by Sox9 RNAi. ChIP assays revealed that Nkx3.2 bound to the *Col2a1* enhancer element.

〔 総 括 〕

Nkx3.2 promoted primary chondrogenesis by two mechanisms: Direct and Sox9-independent upregulation of *Col2a1* transcription and upregulation of Sox9 mRNA expression under positive feedback system.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

脊椎動物の内軟骨性骨化では、まず間葉系細胞が凝集し、TypeⅡ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、TypeⅩコラーゲンを発現する肥大軟骨細胞へと最終分化する。転写因子Sox9は、内軟骨性骨化における初期軟骨分化に必須であると言われているが、Sox9単独では正常に軟骨分化が起こらないため、コファクターの存在が示唆されているが、未だはっきりとは判明していない。本研究では、Nkx3.2が直接的に軟骨分化を促進するのではないかという仮定のもとに、未分化間葉系細胞株であるC3H10T1/2に骨形成因子BMP（Bone Morphogenetic protein）-2を添加して内軟骨性骨化を誘導するin vitro軟骨分化系において、Nkx3.2の機能を評価した。Nkx3.2を遺伝子導入により過剰発現すると軟骨分化は促進し、軟骨分化マーカーであるⅡ型コラーゲン遺伝子（*Col2a1*）、アグリカン遺伝子（*Agc1*）などの遺伝子発現は上昇した。一方、RNAi法を用いてNkx3.2遺伝子をノックダウンすると軟骨分化は抑制され、軟骨分化マーカー遺伝子発現は減少した。また、Nkx3.2が直接*Col2a1*や*Agc1*のエンハンサーに結合し、転写を活性化して軟骨分化を正に制御していることがわかった。以上の結果は、軟骨分化のメカニズムに新たな知見を加えるだけでなく、Nkx3.2を標的とした研究が、変形性関節症や関節リウマチなど、軟骨の変性や分化を進める疾患に対する治療への一端を担う可能性が示唆された。よって、本研究は臨床的に意義のあるものであり、博士（医学）の学位授与に値するものとする。