



Title	Vinculin Functions as a Regulator of Chondrogenesis
Author(s)	越水, 隆雄
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59804
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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	越 水 隆 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 5 6 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 5 月 16 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Vinculin Functions as a Regulator of Chondrogenesis (Vinculinは軟骨細胞分化制御因子として機能する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 和田 芳道 (副査) 教 授 大菌 恵一 教 授 吉川 秀樹

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

これまで、種々の液性因子や転写因子が軟骨細胞の増殖や分化に関わることが示されているが、軟骨細胞分化の分子基盤の全体像は明らかになっていない。著者らはこれまで、マウス間葉系細胞株ATDC5にジーントラップによる変異体作製法を適用することにより、軟骨細胞分化に関わる遺伝子の同定及び解析を試みてきた。今回、*vinculin*遺伝子がトラップされた

クローン#4-17が軟骨細胞分化の異常を示したことから、vinculinの軟骨特異的な機能及びその分子機序について明らかにすることを目的とし、解析を行った。

〔方法ならびに成績〕

トラップベクターpPT1-geoは、自身のプロモーター領域、エンハンサー領域を持たず、レポーター及び選択マーカーとして*lacZ*遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子との融合遺伝子*geo*を有する。電気穿孔法によりpPT1-geoをATDC5細胞に導入し、得られたネオマイシン耐性クローンのうち、高い β -galactosidase活性を示したクローンを選択し、軟骨分化誘導培地にて8週間培養し、アルシアンブルー染色により基質産生能を、アリザリンレッド染色により石灰化能を評価した。今回、軟骨基質産生能、石灰化能が共に低下していたクローン#4-17を解析対象とした。5' rapid amplification of cDNA ends法により、#4-17においては、pPT1-geoは*vinculin*遺伝子のイントロン13に挿入されていることが判明し、トラップアレルからは、C端側を欠く切断変異型*vinculin*が産生されることが推察された。#4-17においては*vinculin*をノックダウンした細胞と同様に、接着で誘導されるFAKやERK1/2のリン酸化亢進を認めた。また、トラップアレル由来の変異型*vinculin*は、野生型*vinculin*とtalinsとの結合を阻害した。このことから、変異型*vinculin*はdominant-negative作用を有することが推察された。

次に、vinculinの機能障害が軟骨細胞分化過程における遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。その結果、クローン#4-17においては軟骨細胞分化に必須の転写因子である*Sox9*の発現は保持されていたが、軟骨初期分化のマーカーである*Col2a1*や*aggrecan*、後期分化のマーカーである*Col10a1*や*Runx2*の発現の低下を認めた。Vinculinをノックダウンした初代軟骨細胞においても同様の遺伝子発現変化を認めた。また、マウス中足骨器官培養系におけるvinculinのノックダウンは、軟骨成長を抑制し、*Col2a1*や*aggrecan*の発現減少をもたらした。

Vinculinによる軟骨細胞分化制御のメカニズムを解明するため、vinculinの機能障害がシグナル伝達に及ぼす影響を検討したところ、軟骨細胞分化過程におけるERK1/2のリン酸化上昇の抑制、SHP2及びAktのリン酸化亢進が認められ、IGF-Iシグナルの攪乱が示唆された。この観察と一致して、マウス中足骨におけるvinculinノックダウンは、IGF-Iによる軟骨成長の促進や*Col2a1*、*aggrecan*の発現上昇を阻害し、IGF-Iに対する応答性の減弱が推察された。また、vinculinの機能障害は軟骨細胞分化過程におけるp38MAPK経路の活性化も抑制した。

〔総括〕

以上の結果から、vinculinは細胞外基質からのシグナルと液性因子からのシグナルとを統合することにより、軟骨細胞分化制御因子として多面的に機能することが示唆され、これまで十分に解析されていなかった軟骨組織特異的なvinculinの機能が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本論文は、これまで十分に解析されていなかったvinculinの軟骨組織特異的な機能を示したものである。申請者は、軟骨細胞への分化能を有するマウス間葉系細胞株ATDC5にジーントラップによる変異体作製法を適用することにより、vinculin遺伝子がトラップされたクローンを単離した。本クローンにおいて、変異型vinculinが産生されることが確認され、#4-17において、vinculinをノックダウンした細胞と同様に、細胞外基質への接着で誘導されるFAKやERK1/2のリン酸化亢進を認めた。変異型vinculinは、野生型vinculinとtalinsとの結合を阻害した。このことから、本クローンで産生される変異型vinculinはdominant-negative作用を有することが推察された。さらに、マウス初代軟骨細胞や中足骨において、vinculinノックダウンを行い、軟骨細胞分化過程における遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。その結果、vinculinの機能低下により、軟骨特異的な遺伝子である*Col2a1*や*aggrecan*、*Col10a1*の発現低下を認めた。一方、軟骨細胞分化に必須の転写因子である*Sox9*の発現は保持されていた。また、vinculinによる軟骨細胞分化制御のメカニズムを解明するため、vinculinの機能障害がシグナ

ル伝達に及ぼす影響を検討することにより、vinculinは細胞外基質からのシグナルと液性因子のシグナルとを統合し、多面的に軟骨細胞分化を制御することを見出した。今回、得られた成果は、軟骨細胞分化の分子機序について新たな知見を提供するとともに、軟骨再生医療における技術革新につながると期待される。よって、本論文は研究手法、論理の進め方ともに、優れたレベルに達しており、学位の授与に値すると考えられる。