

Title	CREB activation in hypertrophic chondrocytes is involved in the skeletal overgrowth in epiphyseal chondrodysplasia Miura type caused by activating mutations of natriuretic peptide receptor B
Author(s)	山本, 景子
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/73525
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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"> 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

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 山本 景子

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 大園 恵一
	副 査	大阪大学教授 湖山 理夫
	副 査	大阪大学教授 齋藤 謙一

論文審査の結果の要旨

ナトリウム利尿ペプチド受容体B (NPRB) の機能獲得型変異により発症するEpiphyseal Chondrodysplasia Miura type (ECDM) は過成長を呈する。C型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) /NPRBシグナルは、軟骨伸長に関与するといわれるが、その機序の詳細は不明であるため、本研究の目的はECDMの細胞分子機序を解明することとした。

ECDMのモデルマウスでは脛骨軟骨成長板の肥大軟骨層が肥厚化し、同部位には増殖を継続している細胞が存在した。次に、軟骨細胞モデルでは、NPRBを活性化するとCREBのリン酸化やCyclin D1遺伝子の発現が誘導され、NPRBの活性化による効果はCREB阻害剤やCyclin D1阻害剤によりキャンセルされた。また、免疫染色にてECDMのモデルマウスの脛骨成長板の肥大軟骨層ではリン酸化CREBやCyclin D1のシグナルの増加を認めた。以上の結果から、ECDMでは肥大軟骨細胞におけるNPRBの活性化がCREBのリン酸化やCyclin D1の発現を誘導することで、肥大軟骨細胞を増殖へ向かわせ、肥大軟骨層の肥厚化を介して過成長を惹起すると考えられた。本論文はECDMの細胞分子機序を初めて示したことから、学位論文に値する。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	山本 景子
論文題名 Title	CREB activation in hypertrophic chondrocytes is involved in the skeletal overgrowth in epiphyseal chondrodysplasia Miura type caused by activating mutations of natriuretic peptide receptor B (ナトリウム利尿ペプチドレセプターBの機能獲得型変異により発症するepiphyseal chondrodysplasia Miura typeにおける骨格過成長には肥大軟骨細胞におけるCREBの活性化が関与する)
論文内容の要旨	<p>【目的(Purpose)】 ナトリウム利尿ペプチド受容体B (NPRB) はCNPの結合によりcGMPを産生する。CNP/NPRBシグナルは、ヒトとマウスにおいて軟骨の伸長に関与することが知られており、NPRBの機能獲得型変異は骨格過成長を呈するepiphyseal chondrodysplasia, Miura type (ECDM)を引き起こす。CNP/NPRBシグナルによる軟骨伸長作用の詳細についてはまだ不明な点が多く残されているため、本研究ではECDMの骨格過成長の細胞分子機構の解明を試みた。</p> <p>【方法ならびに成績(Methods/Results)】 ECDMのモデルマウスである機能獲得型NPRBを軟骨特異的に発現させたマウス(以下変異マウス)と軟骨分化の細胞モデルであるATDC5、野生型マウス由来初代軟骨細胞を用いて解析を行った。</p> <p>過成長が明確となる生後4週齢の変異マウスの軟骨成長板において、内因性NPRBとtransgene由来NPRBは共に肥大軟骨細胞に発現しており、NPRBシグナルの細胞標的が肥大軟骨細胞であることが示唆された。また、変異マウスでは肥大軟骨層の肥厚化を認めたことから、変異マウスの過成長は肥大軟骨層の肥厚化に基づくことが明らかになった。さらに肥大軟骨層の肥厚化の原因を検討したところ、BrdUラベリング実験の結果から、変異マウスの軟骨細胞は、本来増殖の停止する肥大化後も増殖を継続していることが示唆された。なお、肥大軟骨細胞のアポトーシスは野生型マウスと同等であった。次に軟骨細胞モデルを用いて分子機序の検討を行った。軟骨細胞株ATDC5を分化誘導し、各分化段階でCNPを添加してNPRBを活性化させ、種々のシグナル経路の変化をスクリーニングしたところ、分化後期でのNPRB活性化によりCREB(cAMP response element binding protein)がリン酸化されることが分かった。また、ATDC5の遺伝子発現に対するNPRB活性化の影響についても包括的に解析したところ、CREBの標的であることが知られているCyclin D1遺伝子の発現が、ATDC5分化後期でのNPRB活性化により誘導された。野生型マウス由来初代軟骨細胞においても同様の実験結果を得た。また、細胞透過性cGMPの添加によってもCREBのリン酸化は増強した。野生型マウス由来初代軟骨細胞へのCNP添加によりNPRBを活性化してもcAMPの産生は増加せず、またNPRB活性化によるCREBのリン酸化はPKA阻害剤によって阻害されなかった。これらの結果から、NPRB活性化によるCREBのリン酸化はcAMPではなくcGMPを介していることが示唆された。さらに、NPRBシグナルが実際にCREB-Cyclin D1を介して細胞増殖制御に関与しているかどうか検討した。野生型マウス由来初代軟骨細胞においては、CNP添加で誘導されるNPRBの活性化により細胞増殖の促進をみると、この作用はCyclin D1阻害剤やCREB阻害剤を同時添加することにより阻害された。</p> <p>細胞モデルで得られた結果が、in vivoにおいてもあてはまるかどうか検討するため、生後4週齢の変異マウスの軟骨成長板に対し免疫染色を行った。細胞増殖マーカーであるKi67のシグナルは、野生型マウスと変異マウスにおいてほとんどは増殖軟骨層に存在したが、変異マウスでは肥大軟骨層にも陽性細胞を認め、BrdUラベリングと一致した結果であった。また、リン酸化CREB、Cyclin D1に対する抗体を用いた免疫染色においても同様に、ほとんどのシグナルは増殖軟骨層に存在したが、変異マウスでは肥大軟骨層にも陽性細胞を認めた。また、連続切片を用いた解析では、Ki67とリン酸化CREB、リン酸化CREBとCyclin D1が共局在する細胞が確認された。これらの結果から、in vivoにおいても、NPRBの活性化は肥大軟骨細胞におけるCREBのリン酸化とCyclin D1の発現を誘導し、増殖を継続させることが示唆された。</p> <p>【総括(Conclusion)】 ECDMでは、NPRBの活性化が肥大軟骨細胞でCREBのリン酸化を誘導し、cyclin D1の発現誘導を介して細胞増殖を継続させることにより骨格過成長を起こすと考えられた。</p>