

氏名	竹下信郎
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 2977 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	転写調節因子 <i>Zac1</i> の軟骨基質代謝に及ぼす影響
論文審査委員	教授 山本 敏男 教授 山本 照子 助教授 久保田 聡

学位論文内容の要旨

【緒言】

頭蓋底や下顎骨頭を含むほとんどの骨格組織は、主として内軟骨性骨化により形成される。内軟骨性骨化ではまず、骨の形成予定領域で未分化間葉系細胞が凝集して、さらにそれらが軟骨細胞へと分化して軟骨原基を作る。軟骨原基は軟骨細胞の活発な増殖ならびに、多量の軟骨基質産生によって成長する。その後、軟骨細胞は肥大軟骨細胞へと分化して、周囲の軟骨基質の分解と石灰化を誘導する。最終的に同部は破軟骨細胞によって吸収されて、骨へと置換される。これら一連の内軟骨性骨化の過程における分子レベルでの分化調節メカニズムについては、いまだ十分に解明されていない。

最近、転写調節因子である *Zac1* が軟骨で発現することが報告された。本遺伝子は、細胞分裂の抑制とアポトーシスの促進、さらにガン細胞でしばしば認められる同遺伝子の機能欠損などの知見より、ガン抑制因子の一つと考えられている。その作用機構としては、直接 DNA に結合して標的遺伝子の発現を調節する場合と、様々な核内ホルモン受容体に結合して、その作用を調節する場合が報告されている。また、*Zac1* は軟骨組織に加えて神経、肺、肝臓、腎臓などの器官形成過程で時期特異的に発現することが報告されており、正常な個体発生において何らかの生理的な役割を演じていると予想される。そこで本研究では、骨格成長、特に内軟骨性骨化の過程における *Zac1* の機能を検討した。

【材料と方法】

in situ ハイブリダイゼーション

ニワトリ胚の前肢およびマウス胚の後肢を分離して、4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定した後、通法に従ってパラフィン包埋した。そして6 μ mの薄切切片をシランコートしたスライドガラスに貼り付けた。その後、ジゴキシジェニンにより標識されたアンチセンス RNA プローブを用いて in situ ハイブリダイゼーションを行った。

ニワトリ *Zac1* のクローニング

ヒトおよびマウスの *Zac1* に高度に保存されていた塩基配列部分をもとに、ニワトリゲノムデータベースを検索した結果、ニワトリ *Zac1* 様の遺伝子の存在が予測されていることが判明した。そこで、胎

生17日齢ニワトリ胚胸骨の軟骨細胞より精製したトータルRNAを試料として、5' -RACEおよび3' -RACE法を行ない、塩基配列を分析した。

細胞培養とウイルス感染

胎生17日齢ニワトリ胚の腹膜より線維芽細胞を分離し培養を開始して、細胞が70%コンフルエントに達した時点で、ヒトZac1のDNA断片を組み込んだRCASベクターを遺伝子導入した。遺伝子導入7日後に、培地中に放出された組み換えウイルスの粒子を超遠心にて回収した。軟骨細胞は、胎生17日齢ニワトリ胚の胸骨より分離した。ウイルス感染実験においては、分離直後の軟骨細胞に濃縮ウイルスを加えて培養を開始した。

【結果】

1. Zac1 遺伝子の軟骨における発現パターン

種々の日齢のマウスおよびニワトリ胚肢芽組織において、Zac1は軟骨特異的な基質であるIX型コラーゲンならびにプロテオグリカンコアプロテインと同様のパターンで発現した。

2. ニワトリ軟骨細胞におけるZac1の発現

胎生17日齢ニワトリ胚胸骨より軟骨細胞を分離して3週間培養したところ、経時的にZac1の発現は減少した。また、軟骨基質の産生減少と分解を促進することが知られているレチノイン酸(RA)およびインターロイキン-1(IL-1)を培地中に加えたところ、Zac1の発現を著明に低下させた。

3. 軟骨細胞機能に及ぼすZac1の強制発現の影響

Zac1遺伝子を導入した軟骨細胞における各種遺伝子の発現は、対照群と比べてADAM-TS5の発現が若干低下した以外は、顕著な変化を認めなかった。しかし、それらの細胞にRAを作用させたとき、対照群ではIX型コラーゲンの発現の減少と、MMP-13およびADAM-TS5の発現の増加が認められたが、Zac1遺伝子導入群ではそれらの変化が顕著に抑制された。

【考察】

軟骨におけるZac1遺伝子の発現様式は、軟骨特異的な細胞外基質の遺伝子の発現様式に類似した。さらに、培養軟骨細胞を用いた実験より、1) RAやIL-1により、軟骨基質の産生減少や分解の促進が起こるときには、Zac1の発現も減少すること、2) Zac1は、ADAM-TS5の発現を抑制すること、3) Zac1はRAによる軟骨基質遺伝子の発現の低下や、MMP-13およびADAM-TS5発現の促進を抑制することが明らかになった。これらのことから、Zac1は、軟骨細胞において軟骨基質の産生を維持するとともに、基質分解の亢進を抑制する作用を保持することが示唆され、Zac1の持続的な発現は軟骨細胞の恒常性維持と密接に関連していることが考えられた。

【結論】

転写調節因子Zac1は、軟骨基質代謝を調節することにより軟骨発生制御に関与することが明らかになった。

論文審査結果の要旨

転写調節因子である *Zac1* は、胎生マウスの軟骨で発現することが報告されており、正常な骨格形成において何らかの生理的な役割を演じていると予想される。そこで本研究では、骨格成長、特に内軟骨性骨化の過程における *Zac1* の機能を検討した。

その結果、種々の日齢のマウスおよびニワトリ胚肢芽組織において、*Zac1* は軟骨特異的な基質である IX 型コラーゲンならびにアグリカンと同様のパターンで発現した。次に、胎生 17 日齢ニワトリ胚胸骨より軟骨細胞を分離して 3 週間培養したところ、経時的に *Zac1* の発現は減少した。また、軟骨基質の産生減少と分解を促進することが知られているレチノイン酸 (RA) およびインターロイキン-1 β を培地中に加えたところ、*Zac1* の発現を著明に低下させた。さらに *Zac1* 遺伝子を軟骨細胞に導入して、各種遺伝子の発現を検討したところ、対照群と比べて ADAM-TS5 の発現が若干低下した以外は、顕著な変化を認めなかった。しかし、それらの細胞に RA を作用させたとき、対照群では IX 型コラーゲンの発現の減少と、MMP-13 および ADAM-TS5 の発現の増加が認められたが、*Zac1* 遺伝子導入群ではそれらの変化が顕著に抑制された。

以上の結果より、転写調節因子 *Zac1* は、軟骨基質代謝を調節することにより軟骨発生制御に関与することが明らかになった。

よって、本研究は、軟骨の発生メカニズムを解明するうえで、有用な基礎的研究であることが高く評価され、本申請論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。