

審査の結果の要旨

氏名 小林 寛

本研究は、免疫反応、炎症、細胞増殖、細胞分化、アポトーシスなど生体内の様々な現象に関わっている NF- κ B ファミリーメンバー RelA の軟骨細胞における機能を明らかにするため、骨格形成や変形性膝関節症について、マウスモデルによる *in vivo* の解析および初代軟骨細胞を用いて *in vitro* の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. RelA は、マウス成長板において静止細胞層、増殖層、肥大層いずれにおいても発現がみられた。四肢間葉系細胞特異的に RelA をノックアウトした *Prx1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスと軟骨細胞特異的に RelA をノックアウトした *Col2a1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスは、コントロールの *RelA^{fl/fl}* マウスに比べ同程度の四肢の短縮がみられた。一方で、肥大軟骨特異的にノックアウトする *Col10a1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスでは、成長障害は見られなかった。以上のことから、RelA は骨格形成において初期分化に重要な働きを持つことが示された。
2. RelA の軟骨初期分化における作用を *Col2a1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスを用いて解析した。サフラニン O 染色および Col2a1 の免疫染色の結果、軟骨基質産生能は、*RelA^{fl/fl}* マウス *Col2a1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスで差はなかった。Cell counting kit-8 を用いて軟骨細胞の増殖について解析を行うと、RelA ノックアウトによって時間経過における細胞の増殖率は低下していた。In vivo および *in vitro* において軟骨細胞による BrdU の取り込み率は両遺伝子型間で差がなかったのに対して、TUNEL 染色による解析の結果、*Col2a1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスでは、増殖層～前肥大層にかけて異所性のアポトーシスがみられた。以上のことから、RelA ノックアウトによる四肢成長障害は、成長板における軟骨細胞の異所性のアポトーシスの亢進が原因であることが示唆された。
3. 実験的変形性関節症モデルおよび自然経過における変形性関節症の解析のいずれにおいても、*Col2a1-Cre^{ERT}; RelA^{fl/fl}* マウスでは、*RelA^{fl/fl}* マウスに比較して、軟骨細胞のアポトーシスの亢進を伴って変形性関節症の進行が見られた。
4. RelA コンディショナルノックアウトマウス由来軟骨細胞では、コントロールと比較して低濃度でも TNF α 投与によるアポトーシスの誘導が見られ、マイクロアレイと遺伝子発現解析の結果から Traf2、c-IAP1、c-IAP2、Pik3r1、Prkar1a の 5 つの遺伝子が RelA の下流因子として候補に挙げられた。

5. *RelA^{fl/fl}*由来軟骨細胞では、TNF α 投与によって、Aktのリン酸化が誘導されるのに対して、RelAノックアウトマウス由来軟骨細胞では、その誘導は阻害されていた。PI3K-Aktシグナルは、TNF α の下流において活性化し、NF- κ Bシグナルを活性化することが知られており、RelAがPik3r1の発現調節を介して、PI3K-Aktシグナルに対してpositive feedbackな経路を有している可能性が示唆された。さらに、Pik3r1のプロモーター解析を行ったところ、RelAは、Pik3r1を直接転写誘導していることがわかった。
6. PKAは、Bimをリン酸化して安定化させることでアポトーシスに関与しているが知られているが、本研究では、Prkar1aの発現変化に伴うBimの発現変化が見られなかったため、少なくともこの経路を介したアポトーシスへの関与は否定的であった。
7. 変形性膝関節症モデルの関節軟骨における発現を免疫染色で見ると、Traf2、c-Iap1、c-Iap2、Pik3r1いずれも*RelA^{fl/fl}*マウス関節軟骨での発現が見られるのに対して、*Col2a1-Cre^{ERT}; RelA^{fl/fl}*マウスでは、その発現が抑制されていた。

以上、本論文は、RelAが、軟骨細胞において抗アポトーシス作用によって骨格形成および変形性膝関節症へ関与していることを明らかにした。本研究は、変形性関節症の発症メカニズムとして重要な軟骨細胞のアポトーシス、軟骨変性の機序の解明、さらにその新規治療法の開発に貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。