

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 堀米 洋二
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 892 号
学位授与の日付 令和元年 9 月 20 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Loss of autophagy in chondrocytes causes severe growth retardation
(軟骨細胞におけるオートファジー欠損は重度の成長障害を引き起こす)

論文審査委員 主査 教授 神吉 智丈
副査 教授 佐藤 昇
副査 准教授 川島 寛之

博士論文の要旨

【背景と目的】軟骨組織形成は、軟骨細胞の細胞内容物の刷新と代謝ストレスを伴うことからオートファジーの関与が予想される。実際、軟骨組織形成過程においてオートファジーを抑制したマウスは、軽度の成長障害を来すことが報告されている。しかし、軟骨細胞分化におけるオートファジーの役割は未だ不明な点が多い。

【方法】(実験 1) 間葉系細胞から軟骨細胞までの分化過程を再現できるマウス奇形腫由来 ATDC5 細胞のオートファジー必須遺伝子の一つ *Atg7* を CRISPR/Cas9 システムにより欠失させた *atg7* KO ATDC5 細胞を作製した。この *atg7* KO ATDC5 細胞を分化誘導し、軟骨細胞への分化能をウェスタンブロッティングにより検証した。(実験 2) Cre リコンビナーゼ依存的に *Atg7* が欠失する *Atg7^{flax/flax}* マウスと初期軟骨細胞である round proliferative chondrocyte において Cre リコンビナーゼを発現する *Coll1a2-Cre* マウスとを掛け合わせ、軟骨細胞特異的 *Atg7* 欠損マウス *atg7^{flax/flax}; Coll1a2-Cre* マウス (変異マウス) を作製した。この変異マウスの体長、体重および長管骨長の測定、骨端線の免疫染色、軟骨組織のウェスタンブロッティング、そして軟骨細胞の電子顕微鏡的解析を行った。

【結果】(実験 1) 野生型 ATDC5 細胞は分化誘導に応じて増殖軟骨細胞の分化マーカーである II 型コラーゲンの発現が認められた一方、*atg7* KO ATDC5 細胞はその発現が顕著に抑制されていた。(実験 2) 大腿骨遠位骨端線を用いた *Atg7* 抗体および SQSTM1 抗体による二重免疫染色は、変異マウスの静止軟骨細胞層からの *Atg7* の消失とオートファジー選択的基質である SQSTM1 陽性構造体の蓄積を示した。変異マウスはコントロールマウスである *Atg7^{flax/flax}* マウスと比較して、3、6 週齢のいずれにおいても体長、体重および長管骨長が有意に低下しており、重大な成長障害が認められた。MKI67 抗体を用いた免疫染色および TUNEL 染色により、それぞれ変異マウスの増殖軟骨細胞層における分裂細胞の減少と軟骨細胞層全般に渡っての細胞死、特に増殖軟骨細胞層における顕著な細胞死の増加が明らかになった。II 型および X 型コラーゲン抗体を用いた免疫染色は、変異マウスの増殖軟骨細胞内における II 型および X 型コラーゲンの蓄積を認めた。透過電子顕微鏡像では、変異マウスの増殖軟骨細胞内に粗面小胞体の膨化部位の増加を認め、小胞体ストレスが疑われた。しかし、軟骨組織を用いたウェスタンブロッティングおよび骨端線の免疫染

色では、変異マウスの軟骨組織において、小胞体ストレスマーカーである DDIT3 や HSPA3 の増加は認められなかった。一方、骨端線のグリコーゲン抗体を用いた免疫染色において、変異マウスの静止軟骨細胞および肥大軟骨細胞層のグリコーゲン蓄積が顕著であり、透過電子顕微鏡像では変異静止軟骨細胞および早期の増殖軟骨細胞の細胞質面積あたりのグリコーゲン面積比の増加を認めた。

【考察と結論】本研究では、軟骨形成過程におけるオートファジーについて、以下のことを示した。1) オートファジーは、間葉系細胞から増殖軟骨細胞への分化に重要な役割を担う。2) 静止軟骨細胞層以降のオートファジー欠損は重度の成長障害を来す。3) オートファジー不全軟骨細胞は増殖軟骨細胞層で細胞死を来し、これに小胞体ストレスは関与しない。4) オートファジー不全軟骨細胞層は大量のグリコーゲン顆粒を蓄積する。変異マウスの成長障害の程度は、軟骨細胞におけるオートファジー不全マウスに関する他の報告で用いられた *atg7^{lox/lox}; Col2a1-Cre* マウス、*atg7^{lox/lox}; TamCol2a1-Cre* マウス および *atg7^{lox/lox}; Prdx1-Cre* マウスよりも極めて重度だった。これら *Col2a1-Cre* マウス、*TamCol2a1-Cre* マウスおよび *Prdx1-Cre* マウスは、本研究で用いられた *Coll1a2-Cre* マウスよりも、分化過程の早期の段階（軟骨細胞への分化前）で Cre リコンビナーゼを発現するにもかかわらず、変異マウスが最も重度の成長障害を呈した。このことより、軟骨細胞への分化より早期の段階でオートファジー不全を生じた場合、なんらかの代替機構が働くと考えられた。それではオートファジー不全はなぜ軟骨細胞のアポトーシスを起こすのか。本研究では小胞体ストレスは主因ではないと考えられた。骨端線は無血管構造であり、軟骨細胞では、細胞のエネルギー源としてグリコーゲンが貯蔵されている。同じくグリコーゲンを大量に貯蔵する肝細胞において、グリコーゲンはオートファジーの一種であるグライコファジーと呼ばれる機構で分解されることが知られている。オートファジー不全軟骨細胞におけるグリコーゲンの蓄積は、このグライコファジーによるグリコーゲン分解が阻害されていることを反映しているものと考えられた。そしてグリコーゲンをエネルギー源として利用できなくなったことが、軟骨細胞のアポトーシスと増殖能の低下を招いたと考えられた。

審査結果の要旨

軟骨組織形成は、軟骨細胞の細胞内容物の刷新と代謝ストレスを伴うことからオートファジーの関与が予想される。実際、軟骨組織形成過程においてオートファジーを抑制したマウスは、軽度の成長障害を来すことが報告されている。しかし、軟骨細胞分化におけるオートファジーの役割は未だ不明な点が多い。本研究では、軟骨細胞分化におけるオートファジーの役割を、オートファジー不全細胞およびマウスを用いて解析した。

野生型 ATDC5 細胞は分化誘導に応じて増殖軟骨細胞に分化することができたが、*atg7* 欠損 ATDC5 細胞は分化が顕著に抑制された。初期軟骨細胞特異的 *atg7* 欠損マウスでは、野生型と比較して、体長、体重および長管骨長が有意に低下しており、重大な成長障害が認められた。また、この変異マウスでは、増殖軟骨細胞層における分裂細胞の減少と軟骨細胞層全般に渡っての細胞死が認め、増殖軟骨細胞内における II 型および X 型コラーゲンの蓄積を認めた。さらに、この変異マウスの静止軟骨細胞および肥大軟骨細胞層に顕著なグリコーゲン蓄積が認められた。

これらから、オートファジーは間葉系細胞から増殖軟骨細胞への分化に重要な役割を担うこと、静止軟骨細胞層以降のオートファジー欠損は重度の成長障害を来すことが示され、その原因として、オートファジーによるグリコーゲン分解によって得られるエネルギーが利用でき無くなることが考えられた。

以上の結果は学位論文として価値があると審査した。