

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	山下 美智子
審査委員	主査 山下 政克 副査 東山 繁樹 副査 江口 真理子 副査 尾形 直則 副査 岡本 健太郎

論文名

Uhrf1 は軟骨細胞分化を制御し正常な骨格形成に必須である

審査結果の要旨 (2,000 字以内)

【背景と目的】

軟骨の分化は、長管骨の長軸成長を担う内軟骨骨化において重要な役割を担っており、様々な転写因子やホルモンなどで細かく制御されている。また、その分化異常は、骨格形成の異常のみならず変形性関節症などの病因となりうる。軟骨の分化は、DNA やヒストンの化学修飾により規定されるエピゲノム状態の変化により制御されると考えられている。本研究における標的分子 Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 (Uhrf1) は、DNA メチル化の制御因子であり、がん細胞の増殖などに関与することが報告されている。しかしながら、骨格組織における役割は不明であった。そこで本研究では、骨格組織における Uhrf1 の役割を解明するため、四肢特異的 *Uhrf1* 遺伝子欠損マウスを用いて解析を行なった。

【材料と方法】

四肢間葉特異的 *Uhrf1* 遺伝子欠損 (*Uhrf1* cKO) マウスは、四肢間葉系細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する (Prx-Cre) マウスと *Uhrf1*-floxed マウスを交配し作製した。個体表現形の解析は、軟 X 線、マイクロ CT、骨密度測定 (DXA 法)、組織学的染色により行なった。新生仔膝関節由来初代培養軟骨細胞を用いた解析は、軟骨分化マーカーを qRT-PCR で、網羅的遺伝子発現変動については RNA-シーケンスで、軟骨基質産生をアルシアンブルー染色で行なった。

【結果】

Uhrf1 cKO マウスは、コントロール群に比べ 30%以上の四肢長の短縮を認め、関節部位は変形を呈した。また、組織学的解析では、*Uhrf1* cKO マウスにおいて有意な軟骨面積の減少、肥大軟骨幅の増加を認めた。さらに、*Uhrf1* cKO 初代培養軟骨細胞において、軟骨基質の著明な産生低下、比較的早期の分化マーカー*Col2a1*、*Col11a1* の発現低下傾向、後期分化マーカーの*Col10a1*、*Runx2*、*Mmp13* の発現上昇が認められた。RNA-シーケンスの gene ontology 解析の結果、糖タンパク質、分泌タンパク質、細胞接着に関与する遺伝子に発現変動が認められ、gene set enrichment 解析により focal adhesion シグナル伝達経路に関与する遺伝子の発現上昇が有意に抽出された。定量的 RT-PCR を用いたバリデーションにおいても、*Col5a3*、*Lamb3*、*Itga2*、や *Itga11* 遺伝子の発現上昇が確認された。これらの結果から、*Uhrf1* cKO マウスでは focal adhesion に関与するシグナル経路の活性化により軟骨分化に異常が生じ、骨格形成不全につながっている可能性が考えられた。

【結論】

DNA メチル化制御因子 *Uhrf1* は、軟骨分化においてエピジェネティック調節を介して転写ネットワークを制御し、正常な骨格の成熟において重要な役割を担っていることが示された。

本論文は、軟骨細胞分化のエピジェネティック制御において DNA メチル化制御因子 *Uhrf1* が重要な役割を担っていることを初めて明らかにしたものであり、明瞭な結果と十分な考察が提示されている。公開審査会は、平成 28 年 12 月 26 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表し、1) *Prx-Cre* マウスの発現特異性、2) 軟骨分化と focal adhesion の関係性、3) *Uhrf1* 相互作用分子 *Dnmt1* のノックアウトマウスの表現形との相違、4) *Uhrf1* heterozygote マウスの表現形、5) 正常マウスにおける軟骨分化に伴う *Uhrf1* 発現量変化、6) ヒトの先天性疾患との関係、7) *BMP2* シグナルに対する *Uhrf1* 欠損の影響、8) 骨強度や細胞外マトリクス産生に対する影響、9) 類似した表現形を示す他のノックアウトマウスの報告の有無、10) *Uhrf1* タンパク質の機能ドメインの役割について、11) 実験結果の統計学的処理 などに関する多くの質問に対し日本語で的確に応答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。