

論文審査の要旨

報告番号	総研第 640 号	学位申請者	城光寺 豪
審査委員	主査	奥野 浩行	学位
	副査	岸田 昭世	副査
	副査	谷本 昭英	副査
			博士 (医学)
			古川 龍彦
			田川 義晃

CDC5L promotes early chondrocyte differentiation and proliferation by modulating pre-mRNA splicing of SOX9, COL2A1, and WEE1

(CDC5LはSOX9, COL2A1, WEE1のpre-mRNAスプライシングを調整し、初期軟骨細胞分化と増殖を促進する)

脊椎後縦靭帯骨化症(以下 OPLL)は脊柱管内の後縦靭帯の骨化により脊髄を圧迫し脊髄麻痺を来す原因不明の難病である。OPLLの日本人での有病率は2-4%程度と欧米人と比較して高く、発症予防や骨化進展予防などの新規治療法の開発が望まれるが、現状では骨化発症のメカニズムは不明な点が多い。過去の報告から、OPLLは内軟骨性骨化様の骨化様式をとると報告されている。また、OPLLには強い遺伝要因の関与が指摘されており、OPLL研究班ではOPLL患者血液サンプルを用いたゲノムワイド関連解析(GWAS)を行い、6つの疾患感受性領域を同定し、その近傍にある遺伝子(OPLL原因候補遺伝子)の解析を行っている。学位申請者らは、RNA splicing complexの一員としてpre-mRNA splicingに関与するという報告や細胞周期G2/M移行を促進するという報告があるCDC5L(cell division cycle 5-like)に着目し、CDC5Lの内軟骨性骨化(軟骨細胞分化)への関与について検討した。方法としては、まずOPLL患者より手術で得られた組織、マウス胎仔上腕骨(E17.5)を用いて免疫組織化学染色や二重蛍光免疫染色によるCDC5Lの発現確認を行った。また、ATDC5, C3H/10T1/2, primary chondrocytes, primary mesenchymal stem cellsを用いて、RNA干渉による遺伝子発現抑制やアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いた強制発現を行い、細胞増殖の評価や軟骨細胞分化の評価を行った。さらに、ex vivoの実験として、マウス胎仔中足骨(E15.5)を用いた実験(レンチウイルスを用いて)も行った。その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) CDC5LはOPLL組織のPCNA陽性の増殖軟骨様変性靭帯細胞、マウス胎仔上腕骨でも増殖軟骨細胞に存在する。
- 2) Cdc5lノックダウンによりG2/M期移行を抑制し、細胞増殖を抑制する。
- 3) マウス胎仔中足骨の実験において、BMP-2投与で促進した軟骨成長はCdc5lノックダウンにより抑制される。
- 4) AAVによるCDC5Lの過剰発現はアポトーシスを誘導し、細胞増殖を抑制する。
- 5) Cdc5lノックダウンにより軟骨細胞分化を抑制する。
- 6) CDC5LはSox9, Col2a1のpre-mRNA splicingを促進し、Weelのpre-mRNA splicingを抑制する。
- 7) RNA Immunoprecipitation(IP)実験において、CDC5L蛋白質と標的mRNA(Sox9, Col2a1, Weel)が結合する。

CDC5LはSox9, Col2a1, Weelのpre-mRNA splicingを正にも負にも巧妙に調整することで軟骨細胞の増殖と分化を同時に促進すると考えられる。他のOPLL原因候補遺伝子であるRSP02の報告も検討すると、OPLLが内軟骨性骨化を介して形成される、という概念をサポートする結果であると言える。本研究は、OPLLのGWASによって得られたOPLL原因候補遺伝子CDC5Lの機能解析を行い、軟骨細胞分化への関与を検討し、pre-mRNA splicingの調整により軟骨細胞の増殖と分化に関与するという特異な機構を見出した。軟骨分化の機序の一端を明らかにし、OPLLの原因の解明・治療法の発展にも貢献できる成果である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。