

論文内容要旨

論文題目

マウス四肢骨格形成過程における ATF5 の発現

責任講座：代謝再生統御学講座
(運動機能再建・回復学分野)

氏 名：佐竹 寛史

内容要旨

【緒言】骨格形成は、骨格の予定領域に未分化間葉系細胞が凝集し、軟骨原基が形成され、内軟骨性骨化を経て完成する。間葉系細胞が凝集し軟骨原基が形成される軟骨分化の初期過程については、いまだ分子レベルでの解明がなされていない。我々は生体内の軟骨細胞と同じ多段階の分化過程をたどる培養軟骨細胞を用い、軟骨の初期分化に関与する遺伝子を効率よく単離できる方法を開発した。Activating transcription factor 5 (ATF5) は、この方法で選別された転写因子の一つである。これまでに ATF5 が軟骨分化に関与しているという報告はない。そこで我々はマウス ATF5 の骨格形成過程における発現様式を観察し、軟骨形成のマスター遺伝子である Sox9 や、ATF ファミリーの中で軟骨分化に関与することが報告されている ATF2 との比較検討を行った。【対象と方法】胎生 12.5 日から 18.5 日の ICR マウス胎児、および生後 3 ヶ月までのマウス四肢のパラフィン切片を作製し、*in situ* hybridization (ISH) 法により Atf5、軟骨分化のマーカである II 型コラーゲン (Col II)、および X 型コラーゲン (Col X) の発現の変化を観察した。さらに Sox9 や Atf2 の ISH も行い、Atf5 との発現部位や時期の相違について検討した。プローブにはジゴキシゲニンで標識した cRNA プローブを用いた。【結果】Atf5 は胎生 12.5 日前肢芽において、凝集した間葉系細胞に発現がみられた。この領域での Col II の発現はわずかにみられた。Sox9 と Atf2 は、Atf5 と同様にこの領域での発現がみられた。Atf5 は、胎生 14.5 日の前肢では Col II と同様に静止軟骨細胞と増殖軟骨細胞に発現がみられ、Col X の出現する肥大軟骨細胞には発現していなかった。さらに胎生 15.5 日の前肢では、Atf5 の発現は一次海綿骨の骨梁および骨膜上の骨芽細胞に認められた。また、生後には Atf5 は骨髄細胞にも発現が確認された。Sox9 および Col II の発現は、骨端軟骨では Atf5 と同様のパターンだったが、骨芽細胞や骨髄細胞には認められなかった。生後 14 日から Atf5 は、関節軟骨、成長軟骨板の軟骨細胞にも発現がみられた。生後 3 ヶ月の成熟マウスでは、Atf5 の関節軟骨細胞における発現は非常に弱くなっていた。【考察】マウス ATF5 は、軟骨分化の初期に発現し、分化とともに発現様式が大きく変化していた。さらに ATF5 は骨芽細胞や骨髄細胞にも発現しており、Sox9 や ATF2 と異なる発現パターンを示していた。ATF ファミリーのなかでは、ATF2 と ATF4 がそれぞれの遺伝子欠損マウスの解析から骨格形成において重要な役割を担っていることが明らかにされている。ATF5 も ATF2 や ATF4 とともに骨格形成において何らかの役割を担っている可能性があると考えている。

平成19年 1月 30日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 佐竹寛史

報告書題目： マウス四肢骨格形成過程における *Activating transcription factor 5* の発現

審査委員：主審査委員

内藤 輝



副審査委員

早 乙 2 (青)



副審査委員

加藤 丈夫



審査終了日：平成19年1月29日

【 論文審査結果要旨 】

骨格形成は、予定領域に未分化間葉系細胞が凝集して軟骨原基が形成され、静止、増殖、肥大軟骨に分化後、内軟骨性骨化を経て完成する。本研究では、未だ報告のない *Activating transcription factor 5* (*Atf5*) の遺伝子 *Atf5* の *in vivo* 骨格形成過程における発現様式を調べることを目的として、以下の解析を行った。

胎生 11.5, 12.5, 13.5, 14.5, 15.5, 16.5, 18.5 日および生後 1, 7, 14, 28 日、3 ヶ月の ICR マウスを材料として四肢のパラフィン切片を作製し、*in situ* hybridization 法により、*Atf5*、軟骨分化のマーカーである II 型コラーゲン (*Col II*) と X 型コラーゲン (*Col X*)、軟骨形成のマスター遺伝子である *Sox9*、ATF ファミリーの中で軟骨分化に関与する *Atf2* の発現部位や時期について観察した。プローブにはジゴキシゲニンで標識した cRNA プローブを用いた。

その結果、胎生 12.5 日で、*Atf5* は、*Sox9*、*Atf2* と同様に、前肢芽の軟骨原基周囲に凝集した間葉系細胞に発現し、*Col II* は軟骨原基に発現するようになること、胎生 14.5 日で、*Atf5* は、*Sox9*、*Atf2*、*Col II* と同様に、静止および増殖軟骨細胞に発現するようになるが、*Col X* の発現する肥大軟骨細胞には発現してこないこと、胎生 15.5 日で、*Atf5* だけが骨芽細胞に発現するようになること、生後 14 日で、*Atf5* は、*Col II* と同様に、成長軟骨板と関節軟骨の細胞にも発現するようになり、前者での発現は生後 28 日と 3 ヶ月でもみられるが、後者では 28 日でみられ 3 ヶ月で殆ど消失することなどを明らかにした。

以上の結果は、*Atf5* が四肢骨格形成の早期から何らかの重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。

本研究には新知見が含まれており、これらの結論を導き出す過程についても熟慮され、結果に対する考察も十分なされていた。本研究で得られた成果は、骨格形成における *Atf5* の役割を知る上で有用な情報を与えるものである。本審査委員会では、全員一致して、博士 (医学) の申請に十分に値するものと判定した。

(1, 200字以内)