

## 学位審査結果報告書

学位申請者氏名 中富 千尋

学位論文題目 Constitutive activation of the alternative NF- $\kappa$ B pathway disturbs endochondral ossification.

審査委員 (主査) 瀬田 祐司



(副査) 竹内 弘



(副査) 有吉 渉



### 学位審査結果の要旨

骨の形成過程は膜内骨化と軟骨内骨化の 2 つの骨化様式に分類され、四肢骨格や椎骨、その他多くの骨が軟骨内骨化により形成される。Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)は免疫応答や炎症、細胞増殖、骨形成を制御する転写因子群であり、古典的経路と非古典的経路の 2 つの別の経路により活性化され、それぞれ様々な遺伝子の発現を制御する。

近年、古典的経路を構成する p65 分子が軟骨細胞の増殖および分化を誘導し、アポトーシスを抑制するという報告がなされ、NF- $\kappa$ B 古典的経路が軟骨内骨化で重要な役割を担うことが明らかにされている。しかし非古典的経路の軟骨細胞分化における役割は明らかにされていない。本研究では、非古典的経路が恒常的に活性化している p100-deficient (*p100*<sup>-/-</sup>)マウスの軟骨組織における表現型を詳細に解析することにより、NF- $\kappa$ B 非古典的経路の軟骨細胞における役割を解明することを目的として行った。

野生型マウス成長板軟骨におけるリン酸化 NF- $\kappa$ B2、RelB の発現局在を確認したところ、関節周囲の軟骨細胞において核移行が認められ、NF- $\kappa$ B 非古典的経路が活性化していることがわかった。また、*p100*<sup>-/-</sup>マウスは野生型と比較して体が小さく、骨化遅延も認められた。*p100*<sup>-/-</sup>マウスでは、増殖軟骨細胞で NF- $\kappa$ B2、RelB の核移行が認められ、非古典的経路が恒常的に活性化している可能性が示唆された。*p100*<sup>-/-</sup>マウス成長板軟骨を組織学的に比較したところ軟骨細胞カラム構造の乱れと、顕著に狭い肥大軟骨細胞層が認められた。*in situ* Hybridization 法を用いて軟骨細胞分化マーカーの発現パターンを解析したところ、*p100*<sup>-/-</sup>マウスでは肥大軟骨細胞マーカー遺伝子である type X collagen (ColX) と metalloproteinase13 (Mmp13)の発現が低下していた。BrdU 標識実験を行い、軟骨細胞の細胞増殖能を検討したところ、*p100*<sup>-/-</sup>マウスでは軟骨細胞の細胞増殖能が低下していた。TUNEL 染色によりアポトーシス活性を評価したところ、*p100*<sup>-/-</sup>マウスではアポトーシス活性に変化はなかった。過去の研究では *p100*<sup>-/-</sup>マウスにおいて RelB を欠失させると、NF- $\kappa$ B 非古典的経路の恒常的活性化が抑制され、*p100*<sup>-/-</sup>マウスの B 細胞分化異常や骨形成の異常が部分的に回復されることが報告されている。そこで *p100*<sup>-/-</sup>マウスで RelB を欠失させることで成長板軟骨の異常が回復されるかどうかを解析するために *p100*<sup>-/-</sup>;*RelB*<sup>-/-</sup>マウスを作製し、レスキュー実験を行った。*p100*<sup>-/-</sup>;*RelB*<sup>-/-</sup>マウスでは成長板軟骨の異常が回復し、軟骨細胞分化マーカー遺伝子の発現と細胞増殖活性も回復していた。

これらの結果から、NF- $\kappa$ B 非古典的経路が軟骨細胞の増殖および分化を制御し、軟骨内骨化過程を維持している可能性が示唆された。

本研究内容について申請者の中富氏に対し、主査と 2 名の副査による試問を行い、実験手法ならびに結果の解釈についての質疑応答に対して適切な回答が得られた。本研究の成果は NF- $\kappa$ B 非古典的経路の軟骨細胞における役割を明らかにしたものであり、今後の研究に大きな影響を与える価値のある論文である。以上のことから、審査委員会では本研究が学位論文に十分に値すると判断した。