

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	崔 旻
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
<p>OASIS modulates hypoxia pathway activity to regulate bone angiogenesis （小胞体ストレスセンサーOASIS は HIF1α と協調して骨組織の血管新生に関与する）</p>			
論文審査担当者			
主査	教授	安達 伸生	印
審査委員	教授	田代 聡	
審査委員	教授	吉栖 正生	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>新しく合成された膜タンパク質や分泌タンパク質は小胞体の中で折り畳まれて高次構造を形成する。細胞が虚血、酸化ストレス、感染などの様々な異常環境に曝されると、小胞体の働きに破綻が生じ、不完全なタンパク質が小胞体に大量に蓄積する。この状態を小胞体ストレスと呼ぶ。細胞はこの様な異常事態を感知する小胞体ストレスセンサータンパク質を有しており、このセンサータンパク質から発するシグナルを介して異常タンパク質の修復や分解を行うシステムを積極的に駆動させて細胞傷害から身を守る。この応答機構は小胞体ストレス応答と呼ばれ、酵母から哺乳細胞まで広く保存されている。Old astrocyte specifically induced substance (OASIS)は小胞体膜貫通型転写因子の構造を持つ小胞体ストレスセンサーの一つである。OASIS は小胞体ストレスを感知すると、小胞体からゴルジ体へと移行し、そこでプロテアーゼの作用により膜内切断を受ける。切断されて生じたアミノ末端側断片（N 末）は核へ移行し転写因子として働く。当研究室の先行研究によって OASIS は骨芽細胞に強く発現し、Bone morphogenetic protein 2 と骨芽細胞分化のマスター転写因子 RUNX2 の下流で発現し、I 型コラーゲンの転写を誘導することが明らかにされている。OASIS 欠損マウスでは骨芽細胞の分化異常により、骨形成不全を呈することから、OASIS は骨形成に必須の遺伝子であることがわかっていた。最近、興味深いことに OASIS 欠損骨芽細胞では hypoxia-inducible factor 1α (HIF1α)のターゲット遺伝子の多くが発現低下していることが見出された。本研究では、OASIS による HIF1α ターゲットの転写制御機構と骨形成における OASIS-HIF1α 間のシグナルクロストークの解明を目的して解析が行われた。</p> <p>野生型および OASIS 欠損マウスから単離した骨芽細胞におけるジーンチップデータ</p>			

を詳細に解析した結果、HIF1 α のターゲット遺伝子 45 種のうち、30 種の遺伝子の発現レベルが OASIS 欠損骨芽細胞において低下していることがわかった。実際に RT-PCR および Real time PCR で遺伝子発現を検討した結果、OASIS 欠損骨芽細胞で HIF1 α のターゲット遺伝子の発現が低下していることが確認できた。ウエスタンブロットティングにより HIF1 α の発現量を調べたところ、OASIS 欠損細胞と野生型の間で HIF1 α の発現量に差は認められなかった。すなわち、HIF1 α の発現制御は OASIS に依存していないことを意味し、OASIS が HIF1 α へ作用することで HIF1 α ターゲット遺伝子の転写調節に関与しているものと考えられた。次に、低酸素下における OASIS の活性化と細胞内局在が調べられた。OASIS は低酸素下で膜内切断を受けて活性化し、活性化した OASIS N 末が核に蓄積していた。OASIS N 末の免疫沈降を行うと HIF1 α が共沈してきたことから、両者は核内で結合することが明らかになった。HIF1 α は低酸素応答エレメント (HRE) を介して標的遺伝子の転写を制御する。HRE 配列を用いたレポーターアッセイでは、OASIS が HIF1 α に対して作用し、HRE レポーターの転写を相加的に促進することがわかった。

軟骨内骨化による骨形成は低酸素状況下で起こる。低酸素下の軟骨細胞や骨芽細胞から HIF1 α 経路を介して、血管内皮増殖因子 VEGF が分泌され血管新生を誘導することで、骨形成を促進する。大腿骨成長板の詳細な組織学的解析の結果、OASIS 欠損マウスでは血管新生が抑制されていることが明らかとなった。また、野生型に比べて OASIS 欠損マウスでは成長板と骨内膜で VEGF の発現が著しく低下していた。野生型マウスおよび OASIS 欠損マウス胎仔から中足骨を摘出し、metatarsal angiogenesis assay を行ったところ、骨から伸出する血管の長さが OASIS 欠損によって短縮しており、血管形成が抑制されていることもわかった。

以上の結果から本研究では、OASIS が HIF1 α と協調し VEGF などの HIF1 α ターゲットを誘導して骨形成時の血管新生を促進する働きがあることを見出した。この発見は小胞体ストレス応答シグナルによる骨形成制御の新しいメカニズムを見出しただけでなく、生体内での小胞体ストレス応答と低酸素ストレス応答とのクロストークが生理的に極めて重要な役割を果たしていることを証明する研究成果である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。