

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 歯学 )	氏名	池田 和隆
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Expression and functional role of sclerostin in the fibrocartilaginous enthesis (線維軟骨性エンテシスにおけるスクレロスチンの発現と機能的役割)			
論文審査担当者			
主 査	教授 吉子 裕二	印	
審査委員	教授 宮内 睦美		
審査委員	教授 水野 智仁		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>軟骨は、組織学的には、硝子軟骨、線維軟骨、弾性軟骨の 3 種類に分類される。軟骨性骨原基や関節軟骨は、II 型コラーゲンやアグリカンなどを豊富に含む。一方、II 型コラーゲンだけでなく I 型コラーゲンを発現する線維軟骨は、椎間板、顎関節の関節円板、半月板、腱・靭帯の骨への付着部であるエンテシスなどに存在し、可動性の大きな滑膜関節を覆う硝子軟骨と同様、硬組織連結には欠かせない組織である。線維軟骨は、腱・靭帯などの密性線維組織と硝子軟骨との中間的な組織で、腱・靭帯と骨の連結を橋渡しする役割を果たしている。椎間板、関節円板、半月板は、胚発生の過程で形成されるが、エンテシスでは、生後、硝子軟骨が骨へ置換される過程で、力学的負荷に応答するように線維軟骨が形成される。最終的には、骨・石灰化線維軟骨・非石灰化線維軟骨・腱/靭帯という 4 層構造が構築される。エンテシス原基は、<math>Scx^{+}/Sox9^{+}</math> 前駆細胞に由来し、発生過程で、腱・靭帯と硝子軟骨の連結部として形成される。関節軟骨以外の硝子軟骨では、肥大化・石灰化すると血管が侵入し骨へ置換されるが、石灰化線維軟骨は無血管に保たれ、骨へリモデリングされない。線維軟骨性エンテシスにおける組織統合性は、内因性因子と腱から伝わる機械的刺激によって協調的に制御されていると考えられているが、その分子メカニズムは明らかにされていない。本研究では、骨細胞で発現し骨形成を抑制するスクレロスチンが、石灰化線維軟骨でも発現していることに着目し、アキレス腱のエンテシスにおけるその機能的役割を遺伝子改変マウスを用いて解析した。</p> <p>エンテシスの解析には、野生型、<math>ScxGFP</math> トランスジェニックマウス、<math>Scx</math> 欠失マウス、Platinum TALEN を用いて作製した <math>Sost</math> 欠失マウスを用いた。細胞系譜解析を行うために、<math>Sox9^{CreERT2}</math> ノックイン (KI) マウスと <math>Rosa^{Tomato}</math> マウスを交配して得られた <math>Sox9^{CreERT2/+};Rosa^{Tomato}</math> マウスに 4-ヒドロキシタモキシフェンを投与したレポーターマウスを使用した。これらのマウスを、4% PFA/PBS あるいは 20% Sucrose を含む 4% PFA/PBS で灌流後、アキレス腱付着部位を含む非脱灰標本は SCM で、Morse 液によって脱灰した標本はパラフィンで包埋した。非脱灰標本は、クリオスタットでクライオフィルムとタングステンカーバイド刃を用いて、脱灰パラフィン標本は、マイクロトームを用いて薄切した。得られた切片を用いて、トルイジンブルー染色、ALP/アリザリン染色、免疫染色を行った。また、<math>Sost</math> 欠失マウスと野生型マウスの <math>\mu</math>CT を行い、3D 可視化解析ソフトウェア Amira を用いて三次元再構築した。</p> <p>Wnt 及び BMP シグナル伝達経路のアンタゴニストであるスクレロスチンは、石灰化線維軟骨において、オステオカルシンを産生する線維軟骨細胞に共発現し、最終分化した線維軟骨細胞の新たなマーカー分子であると考えられた。エンテシスの非脱灰切片において、メタクロマジーを示す領域とアリザリンで染色される石灰化領域を経時的に観察すると、石灰化線維軟骨の拡大後、ALP 陽性細胞の減少に伴って非石灰化線維軟骨の拡大を認めた。<math>ScxGFP</math> トランスジェニックマウスの免疫染色と <math>Sox9^{CreERT2/+};Rosa^{26Tomato}</math> マウスを用いて、<math>Sox9</math> 陽性細胞の系譜解析を行った結果、スクレロスチン陽性細胞は、<math>Sox9</math> 陽性細胞に由来することが示されたが、<math>Sox9</math> の発現は線維軟骨細胞の成熟に伴って、急速に低下した。アキレス腱の形成不全によって、筋収縮によって生じる機械的刺激の伝達が損なわれ</p>			

ている *Scx* 欠失マウスでは、線維軟骨がほとんど形成されず、骨端硝子軟骨細胞の分化も遅延しており、野生型マウスで観察される線維軟骨性エンターシスにスクレロチンの発現が検出されなかった。従って、機械的刺激が線維軟骨の形成だけでなく骨端硝子軟骨の成熟にも不可欠であると示唆された。ゲノム編集によって作成した *Sost* 欠失マウスでは、スクレロチン陽性の細胞は確認されず、ALP 陽性細胞の増加に伴って、軟骨下骨の骨化だけでなく線維軟骨の石灰化が亢進していた。以上の結果より、最終分化した石灰化線維軟骨細胞で発現するスクレロチンは、軟骨下骨の骨化のみならず、線維軟骨の石灰化や骨形成の亢進を防ぎ、エンターシスの組織統合性を維持する役割を果たしていることが示唆された。

これらの所見はマウスアキレス腱のエンターシスにおけるスクレロチンの新たな機能を示唆するものであり、審査委員会委員全員は本論文が池田 和隆に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。