

学位論文の要旨

| | | | |
|--|-----------------------------------|----|-------|
| 所属 | 三重大学大学院医学系研究科 生命医科学専攻 病態解明医学講座 | 氏名 | 中空 繁登 |
| 主論文の題名 The cleavage of N-cadherin is essential for chondrocyte differentiation | | | |
| 主論文の要旨 | | | |
| 【背景】 軟骨分化の最も初期の段階で間葉系細胞の凝集が観察されるが、それには neural cadherin (N-cadherin) が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。一方、近年、a disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM10) を介した N-cadherin の切断が細胞間接着、遊走、分化、シグナル伝達に重要であることが報告されている。しかしながら、軟骨分化における N-cadherin 切断の重要性は明らかにされていない。そこで、N-cadherin の切断が軟骨分化に及ぼす影響に対して検討を行った。 | | | |
| 【方法】 マウス軟骨前駆細胞株：ATDC5 の分化誘導時における N-cadherin の遺伝子発現量の変化を real-time RT-PCR 法、ウエスタンブロット法にて検出した。ADAM10 による N-cadherin の切断は細胞外ドメインの R ⁷¹⁴ I ⁷¹⁵ 間で生じることから、その切断部位を他のアミノ酸で置換した GD mutant (R714G,I715D)・IRD mutant (D713I,I715D)と、wild type (WT) N-cadherin を作成した。この際、カルボキシ末端（細胞内ドメイン）に HA-tag を付加した。次に、作成した遺伝子を pcDNA3.1 発現ベクターに組み込み ATDC5 に導入することにより、安定的に N-cadherin、N-cadherin mutant を発現する ATDC5-NCAD(WT)、ATDC5-NCAD(GD)・ATDC5-NCAD(IRD) を作成した。同時にベクターのみ導入した ATDC5-mock も作成した。これらの細胞株を用いて ADAM10 による N-cadherin の切断が軟骨分化に及ぼす影響を検討した。軟骨基質合成はアルシアンブルー染色にて、軟骨関連遺伝子（Ⅱ型コラーゲン・X型コラーゲン・アグリカン）の発現量は定量的 real-time PCR にて評価した。また、免疫蛍光染色法にて各々の細胞株の N-cadherin の局在も調べた。 | | | |
| 【結果】 ①軟骨分化過程において、N-cadherin の mRNA 量は分化後 4 日目にピークを迎え、その後、漸減した。切断を受けていない N-cadherin 蛋白量は軟骨分化中、一定の値を保つが、切断された N-cadherin 断片は分化誘導後 7～14 日の期間において 2～3 倍の上昇を認めた。②作成した ATDC5-NCAD 細胞株(WT、GD、IRD)において、N-cadherin が切断されるかどうかを確認するため抗 HA-tag 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、ATDC5-NCAD(GD)・ATDC5-NCAD(IRD) では N-cadherin が切断を受けないことを確認した。③それぞれの細胞株にインスリンによる分化誘導刺激をしたところ、ATDC5-mock は分化誘導後、多数の凝集塊を形成し軟骨基質を合成するが、ATDC5-NCAD(WT)は凝集塊の形成・軟骨基質合成が ATDC5-mock に比し低下した。 | | | |

(注) 2, 000字以内にまとめて記入すること。

ATDC5-NCAD(GD,IRD)は分化誘導後も凝集塊を形成せず、軟骨基質合成も抑制された。④軟骨関連遺伝子の発現は ATDC5-mock では分化誘導後、II型コラーゲン・X型コラーゲン・アグリカンの発現亢進を認めたが、ATDC5-NCAD(WT)では II型コラーゲン・アグリカンの発現は部分的に抑制され、X型コラーゲンの発現は強く抑制された。ATDC5-NCAD(GD,IRD)では分化誘導後も軟骨分化関連遺伝子の発現は強力に抑制された。⑤免疫蛍光染色により分化誘導後の N-cadherin の局在を調べたところ、ATDC5-NCAD(WT)は細胞質と核の両方に、ATDC5-NCAD(GD,IRD)では細胞質内のみに N-cadherin を認めた。

【考察】

ATDC5 細胞において分化誘導後 4 日目に N-cadherin の mRNA 量はピークを迎え、N-cadherin 蛋白の合成は亢進するが、同時に、ADAM10 による分解も亢進していることが明らかとなった。海馬の神経シナプスでは NMDA レセプター刺激に反応して、N-cadherin は ADAM10 による切断を受け N-cad/CTF1 となり、さらに PS1/ γ -secretase による切断を受け N-cad/CTF2 に分解される。この N-cadherin の切断は様々な細胞で報告されており、N-cad/CTF1 や N-cad/CTF2 は細胞間、細胞内でのシグナル伝達・分化に大きく関与する可能性が報告されている。本研究で、ADAM10 による切断を受けない変異型 N-cadherin 発現 ATDC5 細胞株では軟骨分化が大きく抑制されたことより、軟骨分化においては N-cadherin の切断が必須であることが証明された。このメカニズムを解明するため分化誘導後の N-cadherin の局在を調べたところ、ATDC5-NCAD(WT)は細胞質と核の両方に、ATDC5-NCAD(GD,IRD)では細胞質内のみに N-cadherin を認めた。近年、cadherin は切断された後、N-cad/CTF2 が β -catenin とともに核内移行することが報告されている。軟骨分化において N-cadherin の切断によって生じた N-cad/CTF2 が核に移行することで、細胞表面からの分化シグナルを核に伝達している可能性が推測された。

【結語】

N-cadherin の切断は軟骨分化に必須であることが明らかとなった。