

審査の結果の要旨

氏名 中元 秀樹

本研究は関節軟骨細胞におけるメカノセンサー候補分子として、**Transient receptor potential (TRP) channel** のメンバーの1つである **TRPV2** に着目し、またそのノックアウトマウスを利用し、関節軟骨における **TRPV2** の機能の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 軟骨特異的 **Trpv2** ノックアウトマウスは、2種類の手術変形性膝関節症モデルおよび加齢による変形性関節症モデルにおいて、軟骨変性の促進および関節軟骨周辺部における異所性の軟骨内骨化を来し、また関節軟骨の潤滑に重要な分泌タンパク **lubricin** の関節軟骨での発現が低下していた。
2. マウス培養関節軟骨細胞における **Trpv2** のチャネル活性についてカルシウムイメージングを用いて解析した。低浸透圧刺激、伸展刺激、**shear stress** 刺激のいずれに対しても軟骨細胞において細胞内カルシウム流入が惹起され、**Trpv2** 阻害剤や **Trpv2** ノックアウトにより細胞内カルシウム流入が抑制されていた。従って、マウス培養関節軟骨細胞において、各力学的刺激に応答して生じる細胞内カルシウム流入は一部 **Trpv2** を介していることが示された。
3. マウス培養関節軟骨細胞における **shear stress** 負荷は **lubricin** をコードする **Prg4** の mRNA 発現を増加させるが、**Trpv2** のノックアウトによりこの発現増加が一部抑制された。網羅的な **luciferase assay** にて **Trpv2** agonist **2APB** 投与により **CREB** 経路が活性化されることが示された。**ATDC5** 細胞において **2APB** 投与による **Prg4** 発現増加、及び **CREB** のリン酸化亢進が見られ、またその効果は **CREB** 阻害剤 **666-15**、カルモジュリン阻害剤である **KN-93** によってそれぞれ抑制された。**Trpv2** の軟骨細胞における **lubricin** の誘導は、**Calmodulin / CREB** シグナルを介していることが示された。
4. 培養関節軟骨細胞を用いて肥大分化を誘導させる系において、**Trpv2** のノックアウトによる軟骨細胞の石灰化の亢進、また軟骨肥大分化マーカーである **Col10a1** の発現が mRNA レベルの増加がみられた。従って、**Trpv2** は軟骨細胞の肥大分化を抑制していることが示唆された。

以上、本論文は **Trpv2** ノックアウトマウスの解析から、**Trpv2** は **calmodulin / CREB** シグナルを介して **lubricin** を誘導し関節軟骨恒常性維持に関与することを明らかにした。さらに、**Trpv2** が軟骨細胞の肥大分化が抑制される可能性が示唆された。本研究はこれまで

未知に等しかった **Trpv2** の関節軟骨恒常性維持の機序解明および関節軟骨におけるメカノセンシングの機序解明、引いてはそれらを介した変形性関節症治療法樹立に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。