

## 論文の内容の要旨

論文題目 ルブリシンによる関節軟骨最表層細胞の制御機構の解明

氏名 前之原 悠司

### 【要旨】

変形性膝関節症(Osteoarthritis, OA)は高齢者の生活の質を脅かす代表的な運動器疾患であり、膝関節だけでも国内でも有病者数は2530万人、有症状患者数が800万人と推測されており、高齢人口の増加とともに患者数は増加しつつある。OAに対して内服・ヒアルロン酸注射・リハビリテーションなど保存療法は存在するが、手術以外の根本的な治療法は未だなく、病態をコントロールする手段も乏しい。

関節軟骨は4層からなる層構造を有しており、中でも関節軟骨最表層(Superficial zone, SFZ)は2-4層の平坦な細胞と関節面に平行なコラーゲン配向性を併せ持つ特徴的な組織である。SFZは高度な潤滑性を維持しOAに抵抗する防御機構として重要な役割を果たしているが、潤滑性の維持においては滑膜細胞やSFZで産生されるプロテオグリカンの1種、Proteoglycan4(Prg4)遺伝子にコードされるルブリシンが主役を担っている。ルブリシンは潤滑性の維持に重要であるムチンドメインを有するムチン型のタンパク質であり、Prg4ノックアウトマウスではルブリシンの欠失に伴う関節軟骨の潤滑性の低下に伴いSFZが出生後早期に破綻し、変形性関節症が起こることが報告されている。

近年ルブリシンがシグナル分子としての側面を持ち合わせており、潤滑性の維持以外の機能を発揮する事が報告されている。ルブリシンはムチンドメイン以外にもN末端にはソマトメジンBドメインを有し、C末端にはヘモペキシンドメインと多くのシステイン残基を有しており、前者には細胞増殖に関わるという報告が、後者にはルブリシンの高次構造の維持や関節表面への吸着に関与しているという報告がある。これらの報告からルブリシンは軟骨においても潤滑性の維持以外の機能を持つと推察されるが、関節軟骨やSFZにおけるルブリシンの機能の全貌はいまだに解明されていない。本研究では軟骨におけるルブ

リシンの潤滑性の維持以外の機能を解析した。

初めに野生型マウス(WT マウス)と *Prg4* の coding sequence を含む exon2 に GFP-Cre<sup>ERT2</sup> カセットをノックインした *Prg4-GFP-Cre<sup>ERT2</sup>* マウスをホモアレルとしたルブリシン機能欠失マウス(Prg4KO マウス)のサフラニン O 染色とピクロシリウスレッド染色を用いた組織学的観察を行なった。出生後 5 日においては WT マウス、Prg4KO マウスの膝蓋大腿関節において明らかな差は見られなかったが、出生後 2 週以降においては Prg4KO マウスにおいて SFZ の消失と軟骨の肥厚が見られた。そして、高齢(1 年 6 ヶ月齢)Prg4KO マウスでは腱附着部を中心とした顕著な異所性石灰化が見られた。これら *In vivo* の表現型(SFZ の消失と軟骨の肥厚)と SFZ に含まれる Prg4 陽性細胞が軟骨前駆細胞としての性格を持っているという報告、ルブリシンが潤滑性の維持以外の機能を持ち合わせているという報告を合わせて、ルブリシンは潤滑性の維持以外の機能で SFZ に含まれる軟骨前駆細胞の分化を抑制しているのではないかと考察した。

この仮説を検証するべく、1 週齢の同胞 Prg4<sup>GFP-CreERT2/GFP-CreERT2</sup>;Rosa26tdtomato<sup>fl/+</sup>(Prg4KO-Tomato)マウスと Prg4<sup>GFP-CreERT2/+</sup>;Rosa26tdtomato<sup>fl/+</sup>(Prg4Ht-Tomato)マウスに対してタモキシフェンを腹腔内注射し Prg4 陽性細胞のセルトラッキングを行なったところ、Prg4KO-Tomato マウスでは Prg4Ht-Tomato マウスと比較して Prg4 陽性細胞がより深層まで至っていた。これはルブリシンの機能が欠失することで、SFZ に含まれている Prg4 陽性細胞、つまり軟骨前駆細胞が深層まで分化しているということを示唆する結果であると考えられた。

*In vivo* のような荷重環境ではルブリシンの機能欠失に伴う摩擦の増加の影響が避けられないため、非荷重環境下である *Ex vivo* においても WT マウス、Prg4KO マウスの大腿骨頭の器官培養を行い *In vivo* と同様に SFZ の消失、菲薄化が起こるかを検討した。すると *Ex vivo* で 3 週間培養した Prg4KO マウス大腿骨頭において *In vivo* の膝蓋大腿関節軟骨と同様に SFZ が菲薄化していた。

*In vivo* と *Ex vivo* の結果はルブリシンが潤滑性の維持以外の機能を有し、軟骨前駆細胞の

分化を抑制しているという仮説を支持する結果であった。

*In vitro* においては、ルブリシンの機能解析を行うためマウス未分化軟骨細胞株 ATDC5 細胞において潤滑性の維持に重要とされる Exon6 を有しないマウス Prg4 transvariant type2(Prg4-tv2)をレンチウイルスを用いてテトラサイクリン誘導性に過剰発現させ、軟骨分化・石灰化を行なった。Prg4-tv2 を過剰発現させた ATDC5 細胞では Green fluorescent protein(GFP)を過剰発現させたコントロールと比較して mRNA 発現、細胞染色のいずれにおいても軟骨分化、石灰化共に抑制されていた。続いて WT マウスと Prg4KO マウスから採取した SFZ 細胞を用いたペレット培養を行なったところ、Prg4KO マウスのペレットでは WT マウスのペレットと比較して mRNA レベル、サフラニン O 染色のいずれにおいても軟骨分化が亢進していた。*In vitro* の結果からルブリシンが SFZ 細胞の軟骨分化を抑制する機能を有していること、そしてムチンドメインを有しない Prg4-tv2 の過剰発現でも軟骨分化が抑制されたことからルブリシンのムチンドメイン以外の部分も機能的に重要である可能性が示唆された。

*In vivo, In vitro* 実験によって見られた結果がどのような分子シグナルを介しているのか調査するため、RNA シークエンスを用いて WT マウス・Prg4KO マウスの SFZ 細胞の発現遺伝子の網羅的解析を行ったところ Prg4KO マウスの SFZ 細胞では WT マウス SFZ 細胞と比較して 240 の遺伝子が 2 倍以上増加しており、34 の遺伝子が 2 倍以上減少していた。増加している遺伝子群に着目し DAVID を用いて Gene Ontology(GO)解析を行ったところ、Biological Process において positive I $\kappa$ B kinase/ NF-kappaB signaling などの炎症に関連する term が検出されていた。個々の遺伝子に関しては、遺伝子発現量の指標である Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments sequenced(FPKM)値が 5 以上のもの、かつ Prg4KO マウスの SFZ 細胞で増加している遺伝子の中から GO 解析の結果と増加幅が最大であることを合わせて Matrix Metalloproteinase 9(Mmp9)に着目した。

Prg4KO マウスの表現型や SFZ 細胞における軟骨分化の亢進は Mmp9 の上昇だけでは説

明困難であるため、Mmp9の上昇がどのような分子シグナルに関与しているかをPrg4遺伝子変異による疾患である屈指-関節症-内反股-心外膜炎症候群(CACP syndrome)の病態やMmp9、ルブリシンに関する既報から検討し、本研究においてはTGFβシグナルに着目した。WTマウス、Prg4KOマウスSFZ細胞のペレット培養におけるTGFβシグナルの差異をpSmad2の免疫組織染色を用いて比較検討したところ、Prg4KOマウスのペレットでのpSmad2の陽性細胞率はWTマウスのペレットと比較して有意に高値であり、TGFβシグナルが亢進していることが示唆された。

続いて、これまでの結果からルブリシンがNF-κBシグナルを介してMmp9の発現を抑制しTGFβシグナルの異常な活性化を抑制しているのではないかと考察し、IκBαキナーゼ阻害剤(BMS345541)を用いてSFZ細胞のペレット培養を行ったところ、Prg4KOマウスのペレットにおける軟骨分化の亢進だけでなくMmp9の発現とpSmad2の陽性細胞率もWTマウスと同程度まで抑制された。

最後にTGFβシグナルがSFZ細胞の軟骨分化にどの程度関与しているか調査するためTGFβ1受容体阻害剤(SB525334)を用いた培養を行うと、Prg4KOマウスのSFZ細胞ペレットの軟骨分化の亢進がWTマウスのSFZ細胞ペレットと比較しても有意に抑制されていた。この結果よりSFZ細胞の軟骨分化にはTGFβシグナルが重要であることが示唆された。

以上の結果をまとめるとルブリシンはNF-κBシグナルを介してMmp9の発現をコントロールし、TGFβシグナルの異常な活性化の抑制することで軟骨・関節全体のホメオスタシスに関与している事が示唆された。本研究で得られた知見が変形性関節症やCACP syndromeの新たな治療の開発や病態解明の一助となることを切に願う。