

審査の結果の要旨

氏名 前之原 悠司

本研究は関節軟骨最表層(Superficial zone; SFZ)において潤滑性の維持に重要とされている Proteoglycan4(Prg4)遺伝子にコードされるルブリシンの新たな機能を明らかにするために行われた研究であり、下記の結果を得ている。

1. *Prg4-GFP-Cre<sup>ERT2</sup>* 遺伝子をホモアレル(*Prg4<sup>GFP-CreERT2/GFP-CreERT2</sup>*)として、ルブリシンの機能を欠失したマウス(以下 Prg4KO マウス)において野生型マウス(WT マウス)と異なり SFZ の消失と軟骨の肥厚が見られた。*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)マウスを用いて行なった Prg4 陽性細胞のセルトラッキングでは Prg4KO-Tomato マウスにおいて Prg4Ht-Tomato マウスと比較して通常では SFZ に存在する Prg4 陽性細胞が深層に存在していた。さらに非荷重環境下である *ex vivo* で行なった大腿骨頭器官培養においても Prg4KO マウスにおいて WT マウスと比較して SFZ が菲薄化していた。これらの結果からルブリシンが SFZ 細胞の軟骨分化を抑制していることが示唆された。
2. ATDC5 細胞において潤滑性の維持に重要な Exon6 を有しないマウス Prg4 transvariant type2(Prg4-tv2)の過剰発現を行うと Green fluorescent protein(GFP)を過剰発現したコントロールと比較して軟骨分化が抑制されていた。続いて WT マウスと Prg4KO マウスの SFZ 細胞を用いたペレット培養では Prg4KO マウスのペレットにおいて WT マウスのペレットと比較して軟骨分化が亢進していた。これら *in vitro* の結果はルブリシンが SFZ 細胞の軟骨分化を抑制しているという 1.で示した仮説を支持する結果である。
3. p5 の WT マウスと Prg4KO マウスの SFZ 細胞を用いて RNA シークエンスを行なったところ Gene ontology 解析において positive IκB kinase/ NF-kappaB signaling など炎症に関連する term が検出されていた。個々の遺伝子においては Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments sequenced (FPKM 値)でカットオフ値を設定し抽出したところ Mmp9 の増加幅が最も大きかった。この結果から Prg4KO マウスの SFZ 細胞において Nuclear factor-kappa B (NF-κB)シグナルの亢進と Mmp9 の発現上昇が起こっている事が示唆された。
4. Prg4KO マウスの表現型は NF-κB シグナルの亢進と Mmp9 の発現上昇だけでは説明困難であることから、Mmp9 の発現上昇がさらに別の分子シグナルの調節に関与し、Prg4KO マウスの表現型を引き起こしていると考察した。考察を基に Mmp9 の種々のシグナルに関連する既報と Prg4KO マウスの表現型を勘案し、本研究においては TGFβ シグナルに着目し pSmad2 の免疫染色を SFZ 細胞のペレットを用いて行なったとこ

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 pSmad2 の陽性細胞率が増加していた。この結果から Prg4KO マウスの SFZ 細胞では TGF $\beta$  シグナルが亢進している事が示された。

5. Prg4KO マウス SFZ 細胞のペレットで見られた軟骨分化の亢進と Mmp9 の発現上昇、pSmad2 の陽性細胞率の増加は I $\kappa$ B $\alpha$  キナーゼ阻害剤 BMS345541 を用いた NF- $\kappa$ B シグナルの抑制により WT マウスのペレットと同程度まで抑制された。さらに TGF $\beta$ 1 受容体阻害剤(SB525334)を用いた TGF $\beta$  シグナルの抑制により Prg4KO マウス SFZ 細胞のペレットで見られた軟骨分化の亢進が WT マウスのペレットと比較しても有意に低下していた。従って Prg4KO マウスの SFZ 細胞の軟骨分化の亢進は NF- $\kappa$ B シグナルを介しており、TGF $\beta$  シグナルが重要であるということが示唆された。

以上、本論文はルブリシンが SFZ において NF- $\kappa$ B シグナルを介して Mmp9 の発現をコントロールし、TGF $\beta$  シグナルの異常な活性化を抑制することで SFZ 細胞の軟骨分化を抑制していることを明らかにした。本研究はこれまで未知であったルブリシンの SFZ における潤滑性の維持以外の機能とその分子生物学的機序の解明、ひいては変形性関節症の新たな治療法の開発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。