

論文の内容の要旨

論文題目 Notch シグナルによる関節軟骨細胞の制御機構

氏名 岩永 康秀

変形性膝関節症は関節軟骨の変性や骨棘形成を主体とした関節構成体の退行性疾患であり、中高年を中心にその有病率は高く、日常生活の活動度や生活の質に大きな影響を及ぼしている。変形性膝関節症の要因は、遺伝的因子、環境因子、代謝性疾患、肥満、力学的負荷など多岐にわたる。さらに、変形性膝関節症の病態は軟骨自体の退行性変化のみならず、半月板、靱帯、軟骨下骨、滑膜、骨格筋などの関節構成体の全てを含む退行性変化として捉えられ、その病態生理や分子メカニズムは複雑となることから、変形性膝関節症の発症メカニズムは現在でも部分的な解明に留まっている。

当研究室ではこれまで、変形性膝関節症の病態進行に関わる分子シグナルとして Notch シグナルに着目し、変性した軟骨では異常な Notch シグナルが活性化することで変形性膝関節症が進行することを明らかにした。しかし一方で、国外の研究室からは正常関節軟骨において Notch シグナルは軟骨恒常性に寄与する上で重要な分子シグナルであるとの報告もあり、Notch シグナルが軟骨に及ぼすメカニズムについては未だ解明されていなかった。

そこで本研究では、Notch シグナルが軟骨恒常性に及ぼすメカニズムを明らかにすることにした。これまでの報告から、軟骨表層細胞には軟骨前駆細胞として働く *Prg4* 陽性細胞が存在し、かつ軟骨表層には Notch シグナルが発現していることも明らかとなっていた。このことから、軟骨表層細胞における Notch シグナルが軟骨恒常性に重要であると仮説を立て実験をすすめた。

まず、軟骨表層における Notch シグナルの発現を明らかにするために、軟骨表層細胞と中間層～深層細胞での Notch シグナルの発現の違いを比較した。軟骨表層細胞と深層細胞は既存の報告にあるコラゲナーゼ処理により取り分けた。リアルタイム RT-PCR による解析の結果、軟骨表層細胞において Notch 関連遺伝子のレセプター (*Notch1~4*)、リガンド (*Jag1, 2, Dll1, 3, 4*)、転写因子 (*Hes/Hey*) のいずれも軟骨表層細胞で強く発現していることが明らかとなった。

次に、*in vivo* による検討を行った。軟骨表層細胞の特異的遺伝子マーカーである *Prg4* を発現する細胞で特異的に Notch シグナルをノックアウトする *Prg4^{GFP-CreERT2}; Rbpj^{fl/fl}* マウスを作成し、DMM (Destabilization of Medial Meniscus) 手術による検証を行った。DMM 手術から 3 ヶ月後に膝関節の組織を解析したところ、コントロール群では関節症性変化が軽度かほとんど進行していなかったが、Notch ノックアウト群では軟骨組織の高度な欠損や骨棘形成がみられ、変形性膝関節症が顕著に進行していた。このように DMM 手術を用いた実験では Notch ノックアウト群で軟骨の変性が著しくみられたが、一方で

Notch がノックアウトされた細胞の形態学的変化を観察することができなかった。そこで、Notch をノックアウトした細胞の経時的変化を観察するため *Prg4^{GFP-CreERT2}; Rbpj^{Δfl};Ai14* マウスを作成し、外科的侵襲を伴わないモデルで再度 2 週、4 週、8 週、12 週で膝関節の組織学的評価を行った。その結果、コントロール群では、*Prg4* 陽性細胞は軟骨表層に留まっていたが、Notch ノックアウト群では *Prg4* 陽性細胞は表層に留まらずに軟骨深層に散在していることが明らかとなった。

続いて、*in vitro* で検証した。*in vivo* の結果から、Notch ノックアウト群では軟骨表層細胞が深層細胞へ分化していくことが明らかとなったため、大腿骨頭を用いた器官培養で Notch ノックアウトによる軟骨分化が起こるかを検証した。実験には、生後 1 ヶ月の WT マウスから採取した大腿骨頭に DAPT を添加する系と生後 1 ヶ月の *Prg4^{GFP-CreERT2}; Rbpj^{Δfl}* マウスから採取した大腿骨頭に水溶性タモキシフェンを添加する系で 3 日、7 日、10 日の経時的変化を検証した。リアルタイム RT-PCR では、WT、*Prg4^{GFP-CreERT2}; Rbpj^{Δfl}* マウスの双方とも軟骨分化傾向が示された。組織学的にも、Notch ノックアウト群でサフラン染色の強い染色性が示されたことから、軟骨表層細胞は Notch をノックアウトすることで軟骨分化が促進されることが考えられた。

次に、軟骨表層細胞の未分化性を担う Notch シグナル下流の転写因子について検証した。軟骨表層細胞と深層細胞転写因子の解析を行ったところ、主に *Hes1* と *Hey1* が発現していた。特に *Hey1* は軟骨表層にのみ発現が確認されたため、*Hey1* は軟骨表層に特異的な転写因子であると考えられた。そこで、Notch シグナルが軟骨表層細胞の軟骨分化を抑制するかを検証するため、軟骨表層細胞で Notch シグナルを過剰発現させる *Prg4^{GFP-CreERT2}; CAG-CAT-Notch1* マウスを作成し、このマウスから採取した軟骨表層細胞で軟骨分化抑制作用を検証した。リアルタイム RT-PCR で軟骨分化マーカーを経時的に観察したところ、コントロール群では経時的に軟骨分化傾向が示されたが、ノックアウト群では軟骨分化が抑制されていた。さらに、*Hey1* による軟骨分化抑制作用を明らかにするため、Dox 誘導性 *Hey1* 発現遺伝子を ATDC5 細胞に導入し、ITS 分化誘導培地にて軟骨分化抑制作用を検証した。先程と同様に軟骨分化マーカーを経時的に観察したところ、特に *Col2a1*, *Sox9* において強い軟骨分化抑制作用が明らかになった。

以上の結果から、軟骨表層細胞は Notch シグナルによりその未分化性を維持し、関節軟骨の恒常性の制御機構に寄与していることが明らかとなった。