

## 論文の内容の要旨

論文題目 過剰な力学的負荷による関節軟骨変性機序の解明

氏名 張 成虎

### 【要旨】

現在の高齢社会で高齢者のADLを大きく低下させ、その結果医療費の負担を増大させる変形性関節症の克服は喫緊の課題となっている。変形性関節症は遺伝的要因、代謝疾患要因、環境的要因、そして力学的負荷など様々な要因からなる多因子疾患であるが、中でも過剰な力学的負荷は変形性関節症の最大の誘因と考えられている。しかしながら、力学的負荷に伴う軟骨変性のメカニズムはほとんど解明されていない。

今回我々は力学的負荷に伴う軟骨の変性メカニズムの解明に取り組むべく細胞に過剰な伸展負荷を与える実験から開始した。マウス初代軟骨細胞を用いて、0.5Hz、10%伸展率、30分の過剰な伸展負荷後にcatabolic factorである*Mmp13*を上昇させる系を確立した。そして、過剰な力学的負荷により軟骨細胞で発現が上昇する分子をmicro arrayを用いて網羅的に解析した。多くの候補分子の中から過剰な力学的負荷で誘導され軟骨に発現が多く変形性関節症関連分子でありながらその機能の詳細は明らかではない*Gremlin1*(以下*Gem1*)に着目した。

*Grem1*はDAN familyに属する20.7kDa、184アミノ酸glycoproteinでcystein knot分泌蛋白である。*Grem1*はもともと胎生期の四肢の発生においてBMPのantagonistとして有名である。*Grem1*はBMP-2, BMP-4, BMP-7などとheterodimerを形成してBMPのligand-receptor signalingを阻害してBMPの働きを抑制する。またBMPと結合する機能とは別に*Grem1*は直接細胞に働きかけ細胞増殖や浸潤を誘導、または単球の遊走を抑制するという報告もある。しかし、その多彩な機能と作用機序は十分には解明されていない。変形性関節症においては変形した関節軟骨で健常人よりも*Grem1*の発現が増えることは報告されているが、その軟骨に対する分子生物学的な報告はほとんど存在しない。

本研究で我々は、細胞伸展装置を用いて過剰な力学的負荷に伴い発現する遺伝子の網羅的解析を行い、その中で*Grem1*を有力な候補遺伝子として着目した。*Grem1*は過剰な伸展負荷後にmRNAの上昇を認め、細胞免疫染色でも蛋白レベルで発現の上昇が確認された。しかし、実際の関節内では3次元的な圧縮負荷が主体である。そこで、より詳細に関節内の環境を再現するために圧縮による力学的負荷を再現できる周期的静水圧負荷装置を作成し*Grem1*の力学的負荷後の発現を解析した。

結果、5MPaの生理的な負荷では*Grem1*の明らかな発現上昇は認めなかったが、20MPaの過剰な圧縮負荷では*Grem1*の上昇を確認した。次に、変形性関節症での*Grem1*の発現を確認するためにマウス膝変形性関節症モデルを用いて経時的な発現を解析したところ軟骨の変性にもなって*Grem1*の発現が上昇することを確認した。以上から*Grem1*は生理的な力学的負荷では誘導されないが過剰な力学的負荷で誘導さ

れ、変形性関節症で発現が上昇することが示唆された。次に、*In vitro*で分泌蛋白Grem1の関節軟骨に対する作用をマウス軟骨系cell lineへのrhGREM1投与やGrem1の過剰発現を通じて解析したところ、*Mmp13*や*Adamts5*などのcatabolic factorをGrem1は誘導し、anabolic factorである*Col2a*、*Acan*、*Sox9*を抑制することが確認された。また、rhGREM1をマウス大腿骨頭に投与したところrhGREMの濃度依存性に培養液中のAggrecanの放出が増え、Grem1は関節軟骨に対してcatabolicに働くことが示された。rhGREM1をマウス初代軟骨細胞に投与して発現をmicro arrayで解析したところ*Mmp13*や*Adamts5*以外にも*Mmp3*、*Il1b*、*Il6*などのあらゆるcatabolic factorの上昇を確認した。

*In vivo*ではマウス変形性膝関節症モデルを用いてrhGREM1をモデル術後のマウスの関節内に投与したところrhGREM1を投与した群では変形性関節症の進行が確認された。一方、Grem1中和抗体を変形性関節症モデル術後のマウスに関節内投与したところ変形性関節症の進行が抑制された。また、tamoxifen誘導性に軟骨特異的にGrem1をノックアウトできる*Col2a1-Cre<sup>ERT2</sup>;Grem1<sup>fl/fl</sup>*マウスを用いて内因性のGrem1の発現を抑制しマウス膝変形性関節症モデルを作成したところ*Col2a1-Cre<sup>ERT2</sup>;Grem1<sup>fl/fl</sup>*マウスは*Grem1<sup>fl/fl</sup>*マウスと比較して変形性関節症の進行が抑制されていた。以上から*in vivo*においてもGrem1は軟骨変性に対してcatabolicに働くことが示された。

関節軟骨に過剰な力学的負荷が加わるとTGFβシグナル、Wntシグナル、MAPKシグナルなど様々なシグナルが活性化され軟骨の変性を進めることが報告されているが、その中でもNF-κBシグナルは主要なシグナル経路であり、過剰な力学的負荷に伴うNF-κBシグナルの活性化により様々な炎症性サイトカインが誘導され軟骨変性が進む事が明らかとなっている。またGrem1の血管新生や線維化を促す作用はNFκBシグナルを介して行われるという報告があることから、我々はGrem1の軟骨へのcatabolicな作用はNF-κBシグナルを介して行われるのではないかという予想を立ててGrem1のシグナル解析を進めた。まず、NF-κBシグナルの他にTGFβシグナルやWntシグナルなどの代表的シグナル応答エレメントを含むレポーターコンストラクトを用いたluciferase assayによるGrem1のシグナル経路の解析を行ったところ、細胞内からGrem1を過剰発現させても細胞外からrhGREM1を投与してもNF-κBシグナルが有意に活性化することが示された。次に、軟骨特異的にNF-κBシグナルの代表的転写因子であるRelaをノックアウトさせる*Col2a1-Cre;Rela<sup>fl/fl</sup>*マウスの大腿骨頭にrhGREM1を投与したところ、*Rela<sup>fl/fl</sup>*マウスと比較して有意に培養液中のAggrecan放出が抑制されていることが確認された。その大腿骨頭のmRNAの発現を解析したところ*Col2a1-Cre;Rela<sup>fl/fl</sup>*マウスの大腿骨頭ではrhGREM1による*Mmp13*や*Adamts5*などcatabolic factorの誘導が抑制されていた。最後に、NF-κBシグナル阻害剤であるIKK-inhibitorをrhGREM1と同時にマウス大腿骨頭に投与するとrhGREM1による培養液中のAggrecan 放出が抑制された。以上よりGrem1はNF-κBシグナルを介して関節軟骨にcatabolicに作用することが明らかとなった。

本研究の結果から過剰な力学的負荷によって分泌タンパクであるGrem1が誘導されNF-κBシグナルを介してcatabolic factorを誘導し、またGrem1の作用によりanabolic factorも抑制され関節軟骨を変性に導くことが示された。