

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 張 成虎

本研究は変形性関節症の発症要因である過剰な力学的負荷で誘導される *Grem1* の機能解析をマウス初代軟骨細胞、軟骨細胞特異的 *Grem1* ノックアウトマウスなどを用いて *in vitro* および *in vivo* の両面で試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス初代軟骨細胞に過剰な伸展負荷を与えると *catabolic factor* である *Mmp13* が上昇することが判明した。Micro array による網羅的遺伝子解析においてマウス初代軟骨細胞への過剰な伸展負荷後に分泌蛋白 *Grem1* の発現が上昇することが判明し、*Grem1* は過剰な3次元の静水圧負荷後にも発現が上昇することが示された。また、*Grem1* はマウス変形性膝関節症モデルにて変形性関節症が進行するに伴い発現が上昇することが組織学的免疫染色で示された。
2. ATDC5 細胞で *Grem1* を過剰発現させてもマウス初代軟骨細胞で recombinant human *GREM1*(rh*GREM1*)を投与しても *catabolic factor* である *Mmp13*、*Adamts5* の発現が上昇し *anabolic factor* である *Col2a1*、*ACAN*、*Sox9* の発現が抑制されることが示された。また、マウス大腿骨頭に rh*GREM1* を投与すると大腿骨頭からの *Aggrecan* の放出が増加し *Grem1* は関節軟骨に対して *catabolic* に働くことが示唆された。
3. *In vivo* で *Grem1* の作用を解析するために変形性膝関節症モデル手術を実施した野生型マウスに rh*GREM1* の膝関節内注射を週に2回8週間継続投与した結果、マウスの膝関節軟骨の変性が PBS 注射群に比較して有意に進行した。
4. 変形性関節症モデル手術を実施した野生型マウスに *Grem1* 中和抗体の膝関節内注射を週に2回8週間継続投与した結果、マウスの膝関節軟骨の変性が PBS 注射群に比較して有意に抑制された。また、軟骨細胞特異的 *Grem1* ノックアウトマウスに変形性膝関節症モデル手術を実施したところ有意に関節軟骨の変性が抑制され *Grem1* は *in vivo* でも変形性関節症に対して *catabolic* に作用することが示された。
5. ルシフェラーゼアッセイにて *Grem1* により活性化されるシグナルを調べたところ、NF- κ B signal が同定された。p65/Rela ノックアウトマウスの大腿骨頭では rh*GREM1* による *Aggrecan* 放出の増加は全くみられず、NF- κ B signal の阻害剤 IKK inhibitor (BMS-345541) を添加しても同様の結果が得られ *Grem1* は NF- κ B signal を介して軟骨に *catabolic* に作用することが示唆され

た。

以上、本論文はマウスの初代軟骨細胞への過剰な力学的負荷に伴い分泌蛋白 **Grem1** が誘導され、**Grem1** が関節軟骨に *catabolic* に作用することをマウス初代軟骨細胞、軟骨細胞特異的 **Grem1** ノックアウトマウスなどを用いて *in vitro* および *in vivo* の両面で明らかにした。また、**Grem1** の *catabolic* な作用が **NF- κ B signal** を介していることが示された。本研究はこれまで不明な部分が多かった過剰な力学的負荷が関節軟骨に及ぼす作用の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。