

論文の内容の要旨

論文題目 S100A1・S100B の骨格系組織の発生及び関節軟骨の維持に対する機能の解析

氏名 森 芳史

【要旨】

S100 ファミリータンパクは低分子の調節タンパクで、標的タンパクと結合して多彩な生理的機能を発揮するが、細胞内で標的タンパクと結合して機能を発揮する細胞内作用と、細胞膜表面受容体への結合を介して機能を発揮する細胞外作用の双方がある。細胞内作用としては、リン酸化の抑制、酵素活性の調節等が知られ、細胞外作用としては、炎症機構の活性化等が知られる。以前の研究で我々は、S100 ファミリータンパクのうちの S100A1 と S100B が、軟骨発生分化のマスター転写因子 SOX9 とその co-factor である SOX5 と SOX6 からなる SOX trio により発現誘導される事を発見した。更に、軟骨系細胞株 ATDC5 を用いた *in vitro* での機能解析で、S100A1 と S100B は肥大分化や石灰化を抑制する作用を持つ事を明らかにした。SOX trio により直接誘導される事から、S100A1 と S100B は軟骨発生・分化に重要な分子である可能性がある。更に、変形性関節症の発症・進行の過程では、軟骨細胞に発生過程における肥大分化の際と類似した表現型や遺伝子発現の変化が現れる事が知られているが、この事から、*in vitro* で肥大分化を抑制すると示されている S100A1 と S100B は、変形性関節症治療に有用である可能性がある。しかしながら、S100A1 と S100B が *in vivo* で軟骨の発生・分化や軟骨変性疾患の病態にどのように関与しているかは、未だに解明されていない。

本研究は、S100A1 と S100B の軟骨発生・分化及び軟骨変性病態との関わりを検証し、運動器疾患の新規治療法開発に発展させうる知見を得る事を目標として行った。

まず、軟骨組織発生に対して S100A1・S100B がどう関与するか検討するため、*S100a1*・*S100b* のダブ

ルノックアウトマウスの軟骨組織を継時的に解析した。胎生 12.5 日で Alcian Blue 染色により軟骨原基の形成を解析したが、*S100a1*・*S100b* ダブルノックアウトマウスと野生型とで明らかな違いは見られなかった。次いで、胎生 16.5 日で Alcian Blue / Alizarin Red による二重染色を行ったが、この時点でも明らかな軟骨形成や石灰化の異常は見られなかった。長管骨・腰椎の長さも、*S100a1*・*S100b* ダブルノックアウトマウスと野生型との間で差が無かった。生後 1 日の脛骨を用いて組織切片を作製して Hematoxylin-Eosin 染色や von Kossa 染色により組織学的解析を行ったが、*S100a1*・*S100b* ダブルノックアウトマウスの成長板軟骨の増殖層・肥大層の長さや構造・石灰化の程度に明らかな異常はなかった。さらに、生後に表現型が出現してくる可能性を考え、性成熟に達する生後 8 週齢のマウスでの解析を行った。軟 X 線撮影を用いた放射線学的解析や組織染色により解析したが、*S100a1*・*S100b* ダブルノックアウトマウスと野生型との間で差を見出す事は出来なかった。これらの結果から、*S100A1* と *S100B* は骨格系の形成にとって必ずしも必要ではないと結論した。我々が以前行った *in vitro* での研究の結果に反して *S100a1*・*S100b* ダブルノックアウトマウスに明らかな骨格系の異常が見られなかった原因として、他の *S100* ファミリータンパクが代償的に発現上昇し、*S100a1* や *S100b* の機能を代償している可能性を考えた。これを検証するため、野生型および *S100a1*・*S100b* のシングル及びダブルノックアウトマウスの肋軟骨から mRNA を採取し、マウスで知られている全 17 種の *S100* ファミリー遺伝子の発現量を調べたが、*S100a1* や *S100b* のノックアウトマウスで有意に発現上昇している *S100* ファミリー遺伝子は無かった。しかし、この発現解析により、*S100a1* や *S100b* のノックアウトの有無に関わらず、軟骨組織で高発現しているサブタイプが複数存在すると判明した。これらの軟骨細胞で高発現しているサブタイプのうち *S100A2*、*S100A4*、及び *S100A11* を ATDC5 細胞で過剰発現させて分化誘導後した所、コントロールに比してアリザリンレッド S の染色性が低下し、また、アルカリフォスファターゼ活性が低下しており、これら 3 つのサブタイプには *S100A1*・*S100B* 同様の肥大分化・石灰化を抑制する作用があると考えられた。以上より、石灰化を抑制する作用のある *S100A1*・*S100B* 以外の *S100* のサブタイプが軟骨細胞で発現しており、このため、肥大分化や石灰化を抑制する作用のある *S100a1* や *S100b* をノックアウトしても、骨格系の表現型が出なかった可能性があると考えた。

次いで、*S100A1*・*S100B* の、軟骨変性病態への関与について解析を行った。我々は以前行った研究で、*S100A1*・*S100B* が *in vitro* で ATDC5 の肥大分化・石灰化を抑制する作用を持つ事を発見している。この事と、変形性関節症病態の進展に関節軟骨の肥大分化様の変化が関与している事とを併せ、*S100A1*・*S100B* が肥大分化抑制作用を介して変形性関節症に対し抑制的に作用している可能性が考えられた。この仮説をマウス変形性膝関節症モデルによる *in vivo* 解析で検証した。野生型と *S100a1* ノックアウト、野生型と *S100b* ノックアウト、及び *S100a1* ノックアウトと *S100a1*・*S100b* ダブルノックアウトの 3 組について、変形性関節症進行の程度を術後 12 週で比較した。その結果、*S100a1* ノックアウトマウスで

は、野生型に比して有意に変形性関節症が進行していた。*S100b* ノックアウトマウスや *S100a1*・*S100b* ダブルノックアウトマウスでは、それぞれの対照群に比して変形性関節症の進行度に有意な差は無かった。このことから、*S100A1* と *S100B* のうち *S100A1* のみが変形性関節症病態に保護的に作用している可能性があると考え、*S100A1* についてのみ更に解析を進める方針とした。

変形性関節症病態にある関節軟骨での *S100A1* の発現を解析するため、マウス膝関節の組織切片に対して抗 *S100A1* 抗体による組織免疫染色を行った。無処置の膝関節では、関節軟骨全層・全横位で染色が見られ、*S100A1* はユビキタスに発現していると考えられた。変形性関節症手術を行った膝関節では、本手術で変性が誘導される荷重部の軟骨細胞で、継時的に *S100A1* の染色性が低下していた。このことから、*S100A1* の発現の強さと軟骨変性の進行度とは負の相関を持つと考えられた。

軟骨分化の master regulator として知られている *SOX9* は、*in vitro* で *S100A1* を発現誘導すると知られており、かつ、関節軟骨変性に対して保護的に作用している事も報告されている。そのため、*S100A1* の関節軟骨保護作用に *SOX9* が何らかの関与をしている可能性があると考え、*SOX9* についても変形性関節症誘導手術を行ったマウスの膝関節を用いた免疫染色によって発現を解析した。*SOX9* は変形性関節症導入手術後 2 週では、関節軟骨の比較的浅い層で発現が見られたが、比較的軟骨変性が進行している荷重部では発現が弱かった。術後 4 週、8 週と軟骨変性が進むにつれて、荷重部で相対的に発現が低いという空間的パターンを維持したまま、術後早期に比して発現が低下していき、術後 12 週ではほぼ発現が見られなくなった。以上より、*S100A1* と *SOX9* は、変形性関節症の進展とともに、軟骨変性の強い部位から発現が低下していくという類似した発現パターンを示しており、*S100A1* の関節軟骨保護作用に *SOX9* が関与している可能性があると考えられた。

S100a1 ノックアウトマウスで変形性関節症が有意に進行したメカニズムを *in vitro* で解析した。マウス関節軟骨細胞に対し siRNA を投与して *S100a1* をノックダウンした所、*Sox9*、及びその下流で働く主要な軟骨マトリクス分子である *Col2a1*、*Aggrecan* の mRNA の発現が低下していた。それに加え、関節軟骨表面での潤滑を司る *Prg4* (*Proteoglycan4*) の mRNA も発現低下していた。*SOX9* についてはタンパクレベルでも発現が低下していた。これらから、*S100A1* は関節軟骨に対する pro-anabolic な作用を介して、軟骨変性に対して保護的に働いている可能性が示唆された。

以上までに行った *S100a1* ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 解析、及び *S100a1* の siRNA によるノックダウンを行った *in vitro* 解析によって *S100A1* が軟骨変性に対して保護的に作用している可能性が示唆されたため、逆に、*S100A1* の細胞内での過剰発現及び細胞外からの投与により軟骨変性に対する抑制作用が得られる可能性があると考え、*in vitro* での検証を行った。マウス関節軟骨細胞に対しヒト *S100A1* 遺伝子をコードするアデノウイルス (Ax-*S100A1*) を投与した所、*Sox9*、*Col2a1*、*Aggrecan* の mRNA の発現上昇が見られた。一方、*Prg4* の発現には変化が無かった。*SOX9* については更にタンパクレベル

でも発現上昇が確認された。続いて、マウス関節軟骨細胞に対しヒトリコンビナント S100A1 タンパク (recombinant human S100A1, rhS100A1) を 0 ng/ml、100 ng/ml、及び 1 µg/ml の 3 段階の濃度で投与した所、*Sox9*、*Col2a1*、*Aggrecan* の mRNA の発現が rhS100A1 の濃度依存性に段階的に減少し、1 µg/ml では発現低下は有意であった。*Prg4* の発現は、100 ng/ml では有意に低下していたが、1 µg/ml では変化が無かった。*SOX9* については、タンパクレベルでも rhS100A1 投与で発現が低下していた。S100 タンパクには細胞内作用と細胞外作用があるが、細胞内作用と細胞外作用の比率は、アデノウイルスでの過剰発現では相対的に細胞内作用寄りとなり、リコンビナントタンパクの投与では相対的に細胞外作用寄りとなると考えられる。この事を踏まえると、S100A1 の過剰発現は、*Sox9*、*Col2a1*、*Aggrecan* の発現を細胞内作用としては亢進し、細胞外作用としては抑制すると推定された。*Prg4* については、これら 3 つの遺伝子とは異なる制御を受けていると考えられ、低濃度の S100A1 の細胞外作用により発現が抑制されると推定された。抗 S100A1 抗体によって S100A1 の細胞外作用を抑制した上で Ax-S100A1 を投与した際は、IgG と Ax-S100A1 を投与した群に比して、*Sox9* が mRNA レベルでもタンパクレベルでも発現上昇していたが、この事は、S100A1 が細胞内作用としては *Sox9* の発現を亢進し、細胞外作用としては *Sox9* の発現を抑制するという仮説を支持する。

本研究の結果から、S100A1 と S100B は骨格系の発生には必ずしも必要で無いが、S100A1 は細胞内作用としての pro-anabolic な遺伝子の発現上昇を介して、軟骨変性病態に対して保護的に作用すると考えられた。臨床応用へ向けた今後の研究の進展に期待したい。