

# 博士論文

論文題目 転写因子Hes1による関節軟骨変性のメカニズム

氏 名 杉田 守礼

## 目次

要旨	4 頁
第 1 章 序文	5 頁
第 2 章 研究材料および方法	13 頁
2-1. 細胞培養	
2-2. 初代軟骨細胞採取	
2-3. 実験動物	
2-4. マウスの遺伝子型の同定	
2-5. マウスの骨格二重染色	
2-6. 発現ベクターの作成	
2-7. ルシフェラーゼレポーターアッセイ	
2-8. リアルタイム RT-PCR	
2-9. 全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス	
2-10. 免疫組織化学染色	
2-11. 実験的マウス変形性膝関節症モデルの作出	
2-12. タモキシフェン注射	
2-13. 放射線学的解析	
2-14. 骨構造解析	
2-15. 統計学的解析	

第3章 結果 20 頁

3-1. Hes1 の骨格形成への関与

3-1-1. *Sox9-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスの骨格

3-1-2. *Sox9-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスの組織

3-2. Hes1 の変形性関節症への関与

3-2-1. 変形性関節症進行過程における関節軟骨  
での Hes1 の発現

3-2-1. *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスの  
外科的 OA モデルの検討

小括 1

3-3. Hes1 による変形性関節症発症調節作用メカニズム

3-3-1. 全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンスによる  
Hes1 の作用点の確認

3-3-2. *Camk2* による Hes1 の転写活性化作用

小括 2

第4章 考察 41 頁

第5章 結論 47 頁

謝辞 49 頁

引用文献 50 頁

## 要旨

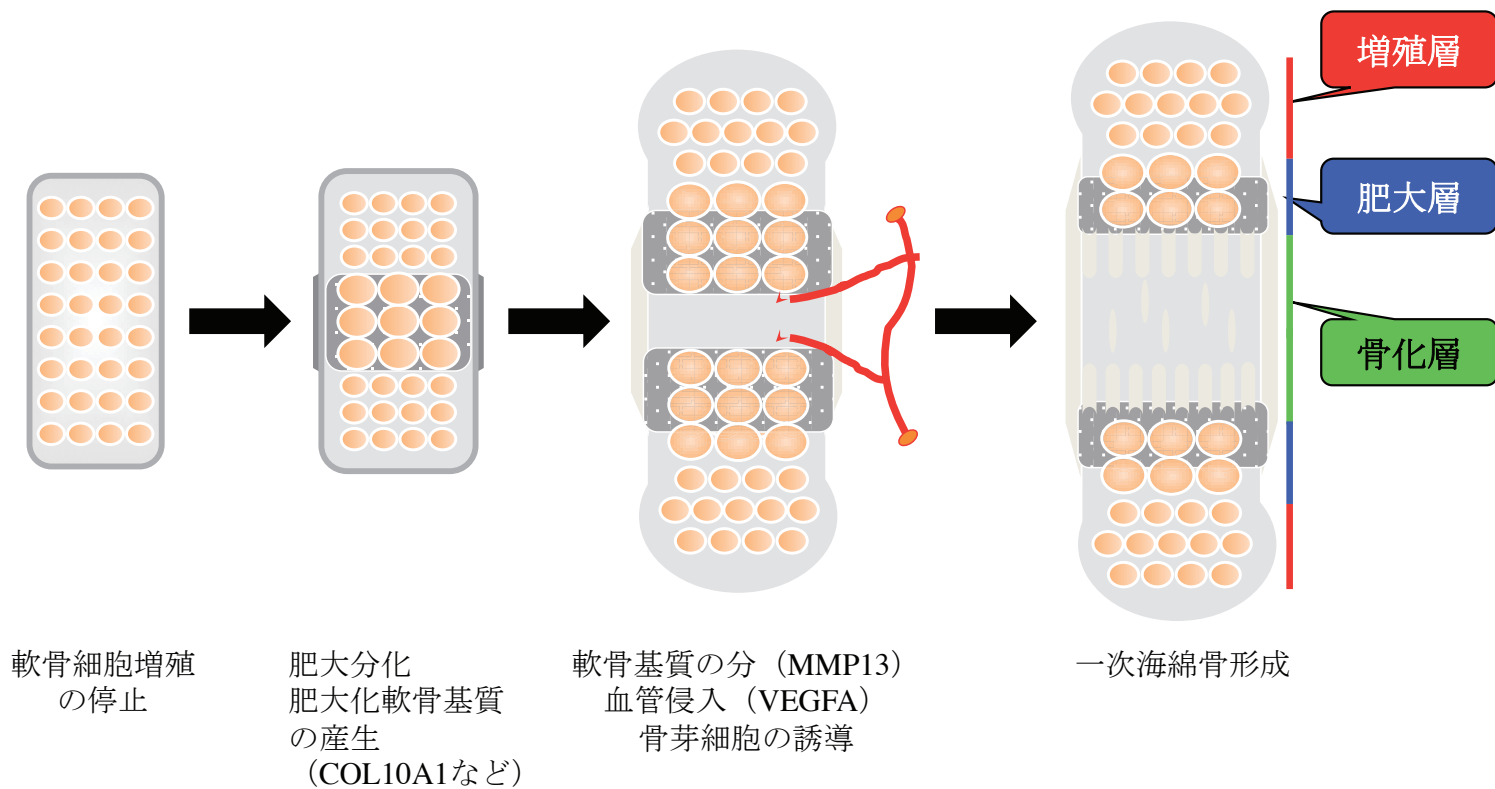
本研究では軟骨細胞における転写因子Hes1の軟骨内骨化および変形性膝関節症への関与について*in vitro*・*in vivo*の両面から検討した。Hes1の軟骨細胞における発現解析、およびそのコンディショナルノックアウトマウスを用いた骨格成長、実験的変形性膝関節症モデルの解析、初代軟骨細胞および各種細胞株を用いた機能解析を行った。その結果、Hes1は骨格形成に対する影響は見られなかったものの、軟骨内骨化の後期分化以降の過程において基質分解酵素であるMmp13およびADAMTS5の発現をCamk2と共同して促進することによって変形性膝関節症へ関与していることが示された。

## 序文

近年の日本では高齢化が急速に進んでおり、高齢者の要支援・要介護者の増加、およびそれに伴う医療コストの増大が社会問題となっている。高齢者に介護が必要となる原因としては運動器疾患が多く、中でも変形性関節症に代表される軟骨変性を基盤とした関節変性疾患は上位に位置しており、関節変性疾患に対する新規の予防・治療法の開発は整形外科に課せられた急務と言える。しかしながら、軟骨の分化・変性・再生のメカニズムについての知見は極めて乏しいのが現状である。

軟骨内骨化は膜性骨化とならび骨形成様式の一つとして知られるが、骨格形成のみならず[1]、変形性関節症における軟骨の変性と病的骨化においてもその関与が指摘されている[2]。その過程において軟骨細胞はさまざまなシグナルの制御を受けながら増殖、肥大分化を経てアポトーシスへと至る[1]。この肥大分化において、軟骨細胞はまず増殖を停止し、X型コラーゲンなどの肥大軟骨細胞固有の基質を産生する。その一方でmatrix metalloproteinase13 (MMP13) を中心とした基質分解酵素により基質を分解し[3, 4]、vascular endothelial growth factor A (VEGFA) などのサイトカインを分泌することにより血管侵入を促し[5]、軟骨から骨への置換が起こる(図1)。このように起きている軟骨細胞分化の最終段階である基質の変性と血管侵入が、軟骨内骨化において多くの部分を占め重要な役割を果たしているという報告はあるが[3-6]、その分子メカニズムはほとんど解明されていない。

Notchシグナル伝達経路は種々の細胞の発生・分化・増殖など細胞の運命決定に重要な役割を果たしているシグナル伝達経路で、胚形成のみならず、神経、造血などの様々な分化過程に関与する、ヒトを含め脊椎動物から節足動物まで多くの



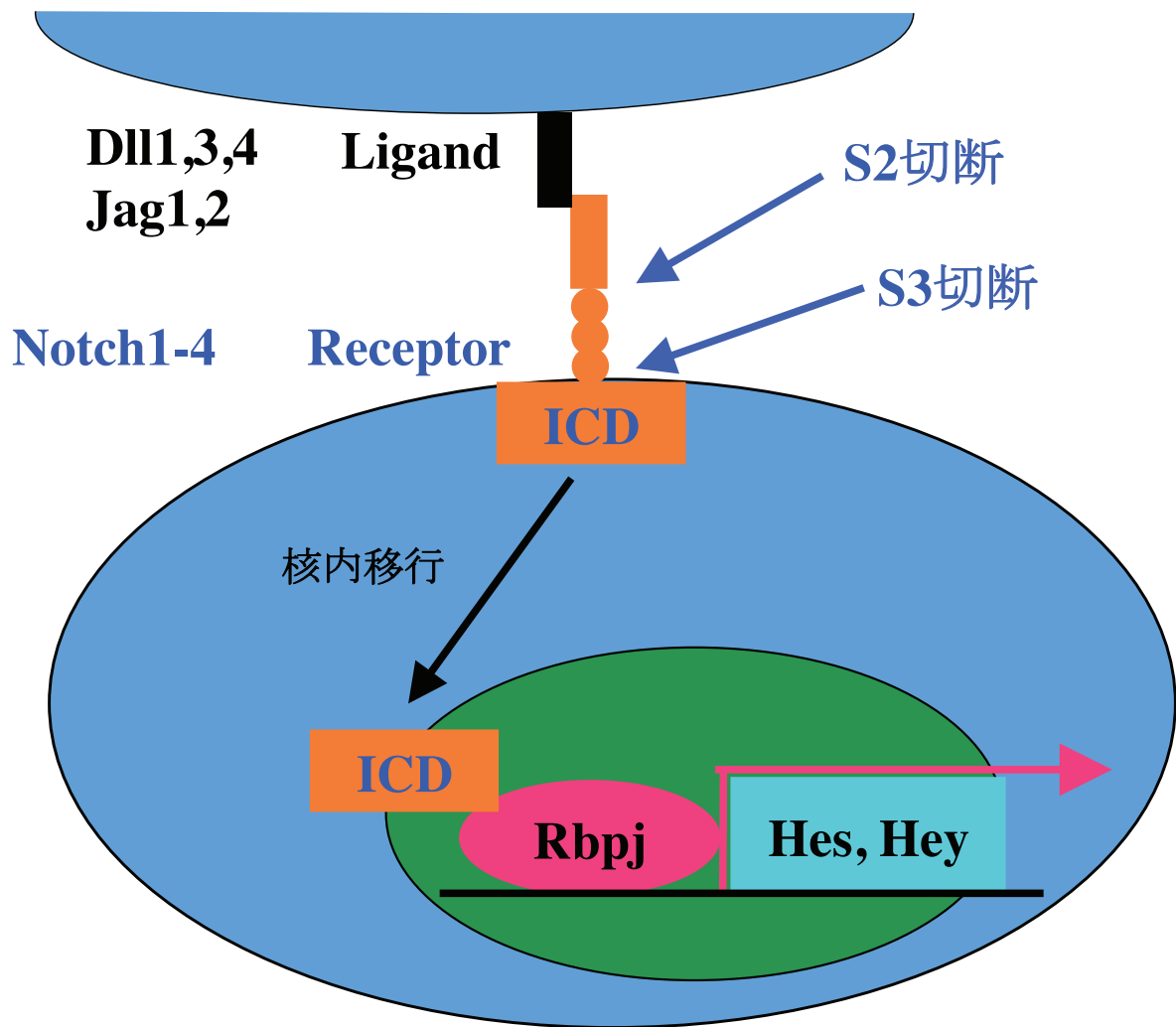
### 図1. 軟骨内骨化における肥大分化過程

軟骨細胞はまず増殖を停止し、COL10A1などの肥大軟骨細胞固有の基質を産生する。その一方でMMP13を中心とした基質分解酵素により基質を分解し、VEGFAなどのサイトカインを分泌することにより血管侵入を促し、軟骨から骨への置換が起こる。

後生動物でよく保存されたシグナル伝達経路である[7, 8]。Notchシグナルは、細胞膜表面に存在するDelta-like (Dll)、Jagged (Jag) などのリガンドが、隣接する細胞膜に存在する1回膜貫通型Notch受容体 (Notch1~4) に結合することでシグナル伝達が始まる[9]。リガンドが結合した受容体は細胞外ドメインが切り出されるS2切断、細胞内ドメイン (intracellular domain ; ICD) が切り出されるS3切断の2段階の切断をうけ、細胞質内に切り出されたICDは核内に移行し、転写因子である recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J (Rbpj) と結合する。これにより転写が開始され、Hes1、Hes5、Hes7、Hey1、Hey2、HeyLなどの下流因子の発現が起こる[10, 11] (図2)。

軟骨分化におけるNotchのシグナルの役割に関する研究としては初期分化に関するものが多く、ほとんどがNotchシグナルは軟骨細胞の初期分化を抑制すると報告している[12-14]。近年後期分化に関する報告もあり、Hiltonらの骨芽細胞分化に関する発表において、Paired-related homeobox gene 1 (Prx1) プロモーター下に間葉系組織特異的にNotch受容体をノックアウトしたマウスでは、軟骨分化の肥大軟骨層の延長を伴って骨化が遅延し、さらに前駆細胞から軟骨細胞や骨芽細胞への分化が抑制され結果として軟骨および骨形成が抑制されていることや[15]、同じく間葉系組織特異的にNotchシグナルを強制発現すると間葉系前駆細胞の増殖を促進するが分化は抑制し正常な骨格形成が起きないことが報告された[15, 16]。また、軟骨細胞の分化過程は核内転写因子Rbpj依存的なシグナル伝達経路で調節されていることが報告された[17]。

Notch シグナル関連分子は成長板軟骨において強く発現しているが[12, 18, 19]、永久軟骨である成人の関節軟骨においても発現していることが分かっており[20-22]、



**図2. Notchシグナル伝達経路**

細胞膜に存在する受容体と、隣接する細胞膜に存在するリガンドが結合した後、受容体がS2切断、S3切断の2段階の切断を受けて、細胞内ドメインであるICDが核内に移行する。移行したICDは核内転写因子であるHes1と結合し、下流分子であるHes、Heyファミリーの発現が誘導される。



関節軟骨の表層に存在する軟骨細胞ではその 70%以上に Notch1 受容体が発現しているとの報告もある[23]。これらの報告は Notch シグナルが成人の関節軟骨の恒常性維持においても重要な役割を果たしている可能性を示唆している。さらに近年、Notch シグナルと変形性関節症の関連が報告されており、変形性関節症軟骨組織では非変性関節軟骨に比べて Notch シグナル関連分子の発現が上がっていることが示された[19, 21]。また、我々の研究室における先行研究として先述した核内転写因子 Rbpj をマウスにて軟骨前駆細胞特異的にノックアウトすると軟骨後期分化が遅延する事による四肢短縮型のドwarf を呈する事が判明し、かつ成体にて軟骨細胞特異的に Rbpj をノックアウトすると変形性関節症の発症が抑制される事が示された。また Notch シグナルにて Notch 受容体の細胞内ドメインを切り離す役割を果たしている  $\gamma$  セクレターゼの選択的阻害剤を関節内に注射すると変形性関節症の発症が予防される事が示された[24]。変形性関節症の発症に関わる Notch シグナルのリガンドは Jag1 である可能性が示され、また、Rbpj の下流分子でこれらの現象を担うのは Hes1 の可能性が高い事も示された[24]。これらの報告はいずれも Notch シグナルが軟骨内骨化や変形性関節症発症に重要な役割を果たしている事を示している。

本研究においてはこの Notch シグナルにおいて軟骨内骨化および変形性関節症における関与を担っている可能性があるとして示されている Hes1 についての解析を行った。まず軟骨前駆細胞特異的に Hes1 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作成し、表現型および組織学的解析から骨格形成における Hes1 の関与を検討した。さらにタモキシフェン誘導性軟骨特異的 Hes1 ノックアウトマウスを用いて変形性関節症モデルを作出し、変形性関節症における Hes1 の関与を検討した。次に、Hes1 の軟骨内骨化調節メカニズムの機能解析を行い、Hes1 が基質分解酵素である Mmp13、Adamts5 をカルモジュリン依存性キナーゼである

Camk2 と共同して誘導する事を示した。

## 第2章 研究材料および方法

### 2-1. 細胞培養

マウス未分化軟骨細胞株ATDC5細胞（RIKEN Cell Bank）は1%

Penicillin/streptomycin solution（P/S solution、Sigma-Aldrich）と5%Fetal bovine serum（FBS、Sigma-Aldrich）を添加したDulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）/F-12（1:1）（Wako）にて培養した。

ヒト子宮頸部癌由来細胞株Hela細胞（RIKEN Cell Bank）およびヒト軟骨肉腫由来細胞株SW1353（American Type Culture Collection）は1% P/S solutionと10%FBSを添加した DMEM（WAKO）にて培養した。

### 2-2. 初代軟骨細胞採取

初代肋軟骨細胞は、胎生18.5日齢のマウス肋軟骨を取り出し、軟部組織を除去した後、0.3%コラゲナーゼ（Wako）を含んだDMEM/F-12（1:1）（Wako）を加え、転倒混和しながら37℃で3時間インキュベートし、濾過・遠心して採取した。初代関節軟骨細胞は生後6日のマウスより大腿骨遠位、脛骨近位、大腿骨頭を取り出し、軟部組織を除去した後、0.3%コラゲナーゼD（Roche）を含んだDMEM/F-12（1:1）を加え、45分インキュベート後攪拌を2回繰り返した後、0.06%コラゲナーゼDを含んだDMEM/F-12（1:1）を加えovernightでインキュベートし、攪拌・濾過・遠心して採取した[25]。

初代軟骨細胞の培養は以下の2種類の方法で行った。

(1) 1% P/S solutionと10%FBSを含むDMEM/F-12（1:1）に細胞を浮遊させ、2000rpmで5分間遠心してpelletを形成し、その形状を保ったまま培養した。

(2) 1% P/S solutionと10%FBSを含むDMEM/F-12 (1:1) 培地で1週間単層培養した。

上記の培養は全て37℃の炭酸ガス培養器中 (5%CO<sub>2</sub>) で行った。

### 2-3. 実験動物

*Sox9-Cre*マウスは京都大学の秋山治彦博士より供与された。*Hes1-floxed*マウスは京都大学の影山龍一郎博士より供与された。*Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>*マウスはWashington UniversityのFanxin Long博士より供与された。これらのマウスはC57BL/6 backgroundで維持した。

全ての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（総理府告示）」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って行った。

### 2-4. マウスの遺伝子型の同定

生後 10 日から離乳時期である 21 日までの間に、尾を約 0.5 cm 切断した。尾断片よりアルカリブレップ法を用いて、ゲノム DNA を抽出した。これを用いて遺伝子上の以下の配列を用いた PCR により、DNA 断片の有無を電気泳動で確認した。*Hes1 flox* マウスに関しては、*Hes1* 遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子上の以下の配列を用いた PCR により、野生型 allele と floxed allele の識別を行った。

<i>Hes1</i>	forward primer: 5'-CAGCCAGTGTCAACACGACACCGGACAAAC-3'
	reverse primer: 5'- TGCCCTTCGCCTCTTCTCCATGATA -3''
	WT : 224bp、 <i>Hes1 floxed</i> : 272bp
<i>Cre</i>	forward primer: 5'- GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC -3'

reverse primer: 5'- GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT -3'

Cre : 100bp

#### PCR 条件

1. 94°C (3 min)
2. 94°C (1 min) , 60°C (30 sec) , 68°C (30 sec) × 30 cycles
3. 68°C (5 min)

#### 2-5. マウスの骨格二重染色

胎生 18.5 日における各遺伝子型のマウス胎仔を帝王切開にて取り出し、皮膚・内臓・その他軟部組織を可及的に取り除き、その骨格全体を 100%エタノールで 1 週間固定した。これをまず 0.3%アルシアンブルー8GX (Sigma) 溶液に浸し、37°C で 2 日間振盪した。エタノールリンスを 2 日間行った後、次に 0.1%アリザリンレッド S (Sigma) 溶液に浸し、遮光・室温で 12 時間振盪した。その後はグリセリン/1%水酸化カリウム溶液に浸して振盪させ、残存した軟部組織を溶解させた。保存のため、グリセリン濃度は段階的に 50%、80%、100%と上げていった。

#### 2-6. 発現ベクターの作成

解析を行った分子の発現ベクターの作成は、以下のような手順で行った。まず目的遺伝子のcDNA全長の塩基配列をヒトcDNAライブラリーを鋳型としてKOD-plusポリメラーゼ (Takara bio) を用いたPCR法によって増幅した。PCR条件は目的遺伝子塩基配列長・デザインしたプライマーの特性に基づいてそれぞれ調節した。次いでこれをサブクローニングした後、目的に応じてPCMV-HAベクター

(Clontech) PCMV-3Tag-1ベクター (Agilent Technologies) にそれぞれ適切な制限酵素サイトを用いて組み込んだ。得られたクローンの塩基配列はサイクルシーケンシング法を用いて確認し、正しく増幅されているものを発現ベクターとしてアッセイに使用した。レトロウィルスベクター作成は、適切な制限酵素サイトを用いてpMxベクター (東京大学 北村俊雄教授より供与) に組み込んだ後、PlatE細胞 (北村俊雄教授より供与) を用いてパッケージングを行った[26]。トランスフェクションは目的の細胞にレトロウイルス液とポリブレンを添加し行った。pMxベクターにはpuromycin耐性遺伝子を組み込み、薬剤はレトロウイルス感染後に安定発現細胞を選択する際に培養培地に添加して使用した。レンチウイルス発現ベクターはpLVX-Tight-puroベクター (Clontech) を使用して目的遺伝子をクローニングした後、Lenti-X HTX Packaging System (Clontech) を使用して作成した。

Gene Bankへのアクセスナンバーは以下の通りである。

Hes1 (NM\_005524) 、 Camk2d (NM\_001221)

## 2-7. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ヒトゲノムDNAを鋳型として、MMP13は転写開始点より2,082bpから2,182bpまで、ADAMTS5は 転写開始点より37,134bpから37,623bpまでの配列をPCRにて増幅し、ベーサルプロモーター付pGL4.23ベクター (Promega) に組み込み、プロモータールシフェラーゼベクターを作成した。遺伝子導入においてはSW1353細胞およびHela細胞を48-well プレートに播種し、24時間後にFugene-6 (Roche) を用いて0.1 µgのpGL4レポーターベクターと0.05 µgのGFP、HES1発現ベクターを遺伝子導入した。また、内在性コントロールとして4 ngのpRL-TK (Promega) を合わせて導入し

た。細胞は導入後48時間にて回収した。ルシフェラーゼアッセイは、PicaGene Dual SeaPansy Luminescence Kit（東洋インキ）とGloMax96 Microplate Luminometer（Promega）を用いて行った。Firefly luciferase活性はRenilla luciferase活性で標準化した。

## 2-8. リアルタイムRT-PCR

RNAはTRIzol（Invitrogen）を用いて回収し、RNeasy Mini Kit（QIAGEN）を用いて精製した。1 µgのRNAをQuantiTect reverse transcription Kit（Qiagen）により逆転写してsingle-stranded cDNAを得た。Mx3000P QPCR System（Agilent Technologies）を使用し、QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix（Qiagen）、各種プライマーを用いてPCRを行った。スタンダードプラスミドはTOPO TA cloning kit（Invitrogen）を用いて合成し、希釈系列を調整し、各種のスタンダードカーブを得た。Rodent total RNA（Applied Biosystems）でマウスβ-Actinを測定し、内因性コントロールとした。これらによりそれぞれの遺伝子のmRNAコピー数を測定した。各サンプルの測定値は、3 wellでの計測値の平均値とした。

リアルタイムRT-PCR用のプライマーは表1のとおりである。

## 2-9. 全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス

HES1遺伝子を先述した方法によりPCMV-3Tag-1bベクターにクローニングした後に、制限酵素を用いて切り出し、pMXベクターの適切な制限酵素サイトに組み込んだ。ヒトの軟骨肉腫由来の細胞であるSW1353細胞に先述した方法によりこの3×FLAGタグ付HES1遺伝子をレトロウイルス感染により安定導入した。これを15

表1. real-time RT-PCRに使用したプライマー配列

Gene title	Forward primer	Reverse primer
<b>β-actin</b>	5'-AGATGTGGATCAGCAAGCAG-3'	5'-GCGCAAGTTAGGTTTTGTCA-3'
<b>Col2a1</b>	5'-GCCAAGACCTGAAACTCTGC-3'	5'-GCCATAGCTGAAGTGGAAGC-3'
<b>Col10a1</b>	5'-CATAAAGGGCCCACTTGCTA-3'	5'-TGGCTGATATTCCTGGTGGT-3'
<b>Mmp13</b>	5'-AGGCCTTCAGAAAAGCCTTC-3'	5'-TCCTTGGAGTGATCCAGACC-3'
<b>Adamts5</b>	5'-GCTACTGCACAGGGAAGAGG-3'	5'-TGCATATTTGGGAACCCATT-3'
<b>Hes1</b>	5'-GGTCCCAGACATTTCTGCAT-3'	5'-GGAGTTGGCTCTGAGAATCG-3'



cmdishで平面培養5日間した後にホルムアルデヒドでクロマチンとDNAのクロスリンクを行い、Bioruptor UCD-250 (コスモ・バイオ株式会社)による超音波破碎（出力250w、run 30秒、インターバル30秒、15分継続）でDNAの断片化を行い、抗FLAG抗体（anti-FLAG M2 F3165; Sigma）で認識後にDynal Magnetic beads (Invitrogen)で回収した。回収した検体は受託検査（タカラバイオ株式会社、クロマチン免疫沈降サンプルの解析）によりChIPシーケンスを行い、HES1の転写相互作用領域推定を行った。データの処理はUCSC genome browser上で行った[27]。

## 2-10. 免疫組織化学染色

組織切片はキシレンにて脱パラフィン後エタノール置換して親水化し、室温で0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と30分間反応させて内因性ペルオキシダーゼを除去した。さらに室温で1% BSAと30分間反応させてブロッキングし、4℃で一次抗体；Hes1（1:100; Santa Cruz Biotechnology）、Col10a1（1:500; LSL）、Mmp13（1:200; Chemicon）、Adamts5（1:250; Chemicon）、と一晩反応させた。翌日室温でHRP標識二次抗体（Promega）と1時間反応させた後にCSA II Biotin-Free Catalyzed Amplification System（Dako）を使って増感させた。

## 2-11. 実験的マウス変形性膝関節症モデルの作出

8週齢の雄マウスに対し、アバーチン麻酔下に右膝関節を展開して内側側副靱帯および内側半月板を切除し、人為的な不安定性を誘導して変形性膝関節症を誘発した[28]。術後4および8週にてマウスを安楽死させ、固定液（リン酸緩衝液4%パラホルムアルデヒド、pH7.4）で灌流固定の後、膝関節を摘出、10%EDTA（pH7.4）、

4℃で3週間ほど脱灰を行い、パラフィン包埋した。その後4μm スライスの組織切片を作成した。切片はHE染色の他、Safranin O と Fast green の二重染色を行った。

変形性関節症の組織学的評価には OARSI (Osteoarthritis Research Society International) の定める grading system を用いて評価した[28]。

## 2-12. タモキシフェン注射

7週齢の雄の同胞 *HesI<sup>fl/fl</sup>* マウスと *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;HesI<sup>fl/fl</sup>* マウスに対し、コーンオイルに溶解したタモキシフェン (Sigma) を 100μg/g body weight/day にて5日間連続で腹腔内注射した[29]。

## 2-16. 放射線学的解析

アバーチン麻酔下に、X線撮影装置CMB-2 (ソフテックス株式会社) にてマウスの全身X線撮影を行った。撮影条件は電圧35 kV、電流3.5 mA、時間90秒、撮影距離65 cmとして工業用フィルムIX FR (Fuji film) を使用した。

## 2-17. 骨構造解析

8週齢の *HesI<sup>fl/fl</sup>* マウスと *Col2a1-Cre;HesI<sup>fl/fl</sup>* マウスから採取した大腿骨を100%エタノールで固定し、マイクロフォーカスX線CT装置 Scan Xmate-L090 (コムスキャンテクノ社) にて電圧75kV、電流100μA、拡大率10.970倍、解像度9.116μm/pixel、スライス厚9.116μmの条件で大腿骨遠位を撮影した。解析には解析ソフト TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング社) を使用し、American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) の nomenclature report[30]に則り解

析を行った。

## **2-18. 統計学的解析**

各実験から得られた結果は、平均±標準偏差として表記した。2 群間の比較には、  
t 検定を用いて有意水準 0.01、および 0.05 で検定した。

## 第3章 結果

### 3-1. Hes1の骨格形成への関与

骨格形成におけるHes1の役割を検討するため、Hes1を軟骨前駆細胞特異的に欠損させたマウスの解析を行うこととした。まずHes1遺伝子領域をCreリコンビナーゼ標的配列loxPで挟み込んだalleleを有する*Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウス[32]とSox9プロモーター下にCreを発現する*Sox9-Cre*マウス[33]を交配し、得られた*Sox9-Cre;Hes1<sup>fl/+</sup>*マウスを*Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスと交配し、得られた*Sox-Cre9;Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスを解析した。

#### 3-1-1. *Sox-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスの骨格

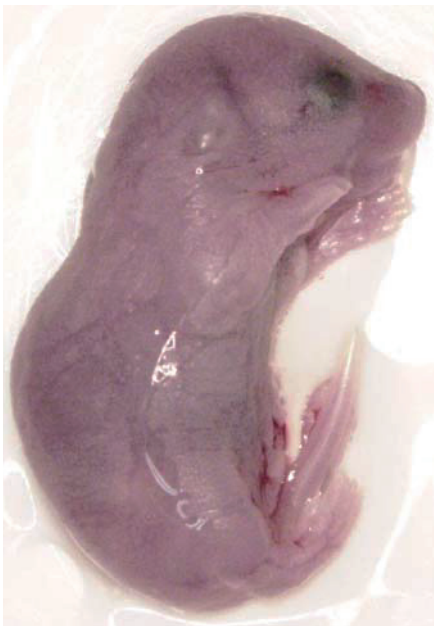
*Sox-Cre;Hes1<sup>fl/+</sup>*マウスでは成長障害はみられなかったが、*Sox-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスは生直後に死亡した。胎生18.5日齢の胎仔を観察したところ外表上にコントロールの*Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスと比して大きな異常は見られなかった(図3)。胎生17.5日齢において骨格二重染色を行ったところ*Sox-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスには骨格上の成長障害は見られなかった(図4)。軟骨内骨化を経て形成される上腕骨、尺骨、大腿骨、脛骨、腰椎(L1~L5)の長さを測定したところ、やはり*Sox-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスではコントロールと比較し四肢脊椎で有意な測定長の差は存在せず、骨格形成における差は見られなかった(図5)。

#### 3-1-2. *Sox-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスの組織

次に、上記のコンディショナルノックアウトマウスの正常な骨格形成を詳細に確認するため、組織学的検討を行った。胎生17.5日齢のマウス胎仔において、下腿全長をHE染色し、遺伝子型間で比較したところ、いずれのマウスでも、全長および全長に占める増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層、骨化層の割合に大きな差は見られなかった(図6)。

また各種軟骨分化マーカーの発現を調べるため、免疫組織化学染色を行ったところ、両遺伝子型間で軟骨基質を示すSafranin-Oの染色性や肥大分化のマーカー

*Hes1<sup>fl/fl</sup>*



*Sox9-Cre; Hes1<sup>fl/fl</sup>*



図3. 胎生期軟骨前駆細胞特異的Hes1ノックアウトマウスの外表所見  
胎生18.5日齢において同胞*Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスと*Sox-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスの骨格を比較した。双方を比較して大きな表現型の差はなかった。

*Hes1<sup>fl/fl</sup>*

*Sox9-Cre; Hes1<sup>fl/fl</sup>*

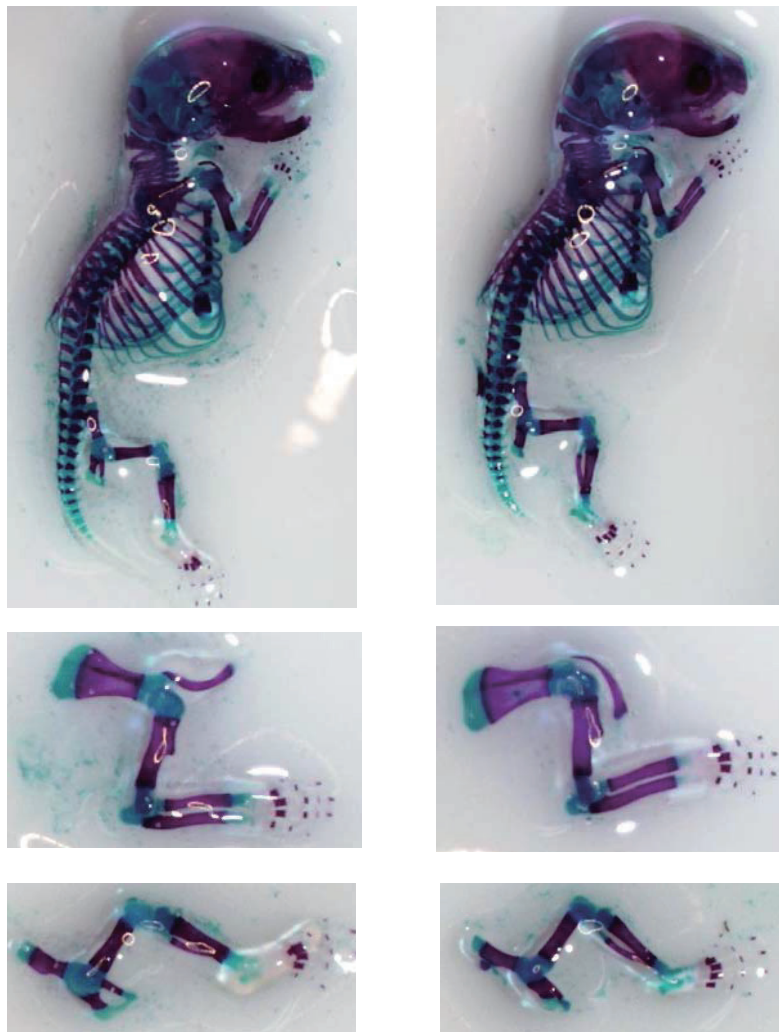


図4. 胎生期軟骨前駆細胞特異的Hes1ノックアウトマウスの骨格の表現型  
：アルシアンブルー・アリザリンレッド骨格二重染色  
胎生17.5日齢において同胞*Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスと*Sox-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>*マウスの骨格を  
比較した。体幹、四肢骨格における表現型の差はなかった。

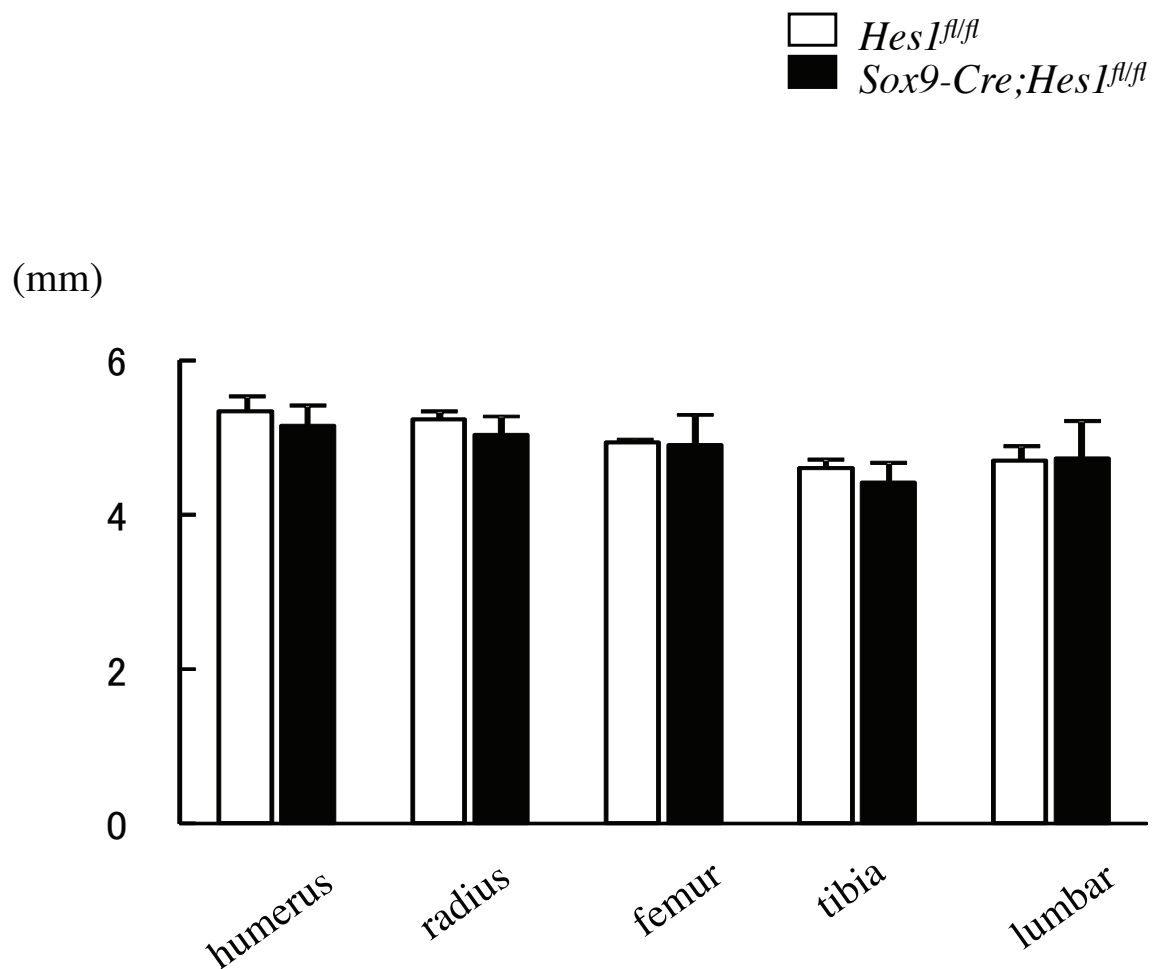


図5. 胎生期軟骨前駆細胞特異的**Hes1**ノックアウトマウスの四肢・脊椎の骨長計測  
胎生17.5日齢において骨格標本を作成し、四肢長管骨、脊椎の骨長を実体顕微鏡下に計測した。いずれの部位においても有意差が付く程度の差はなかった。  
データは平均値 (bars)  $\pm$ s.d. (error bars)、n=4/group、

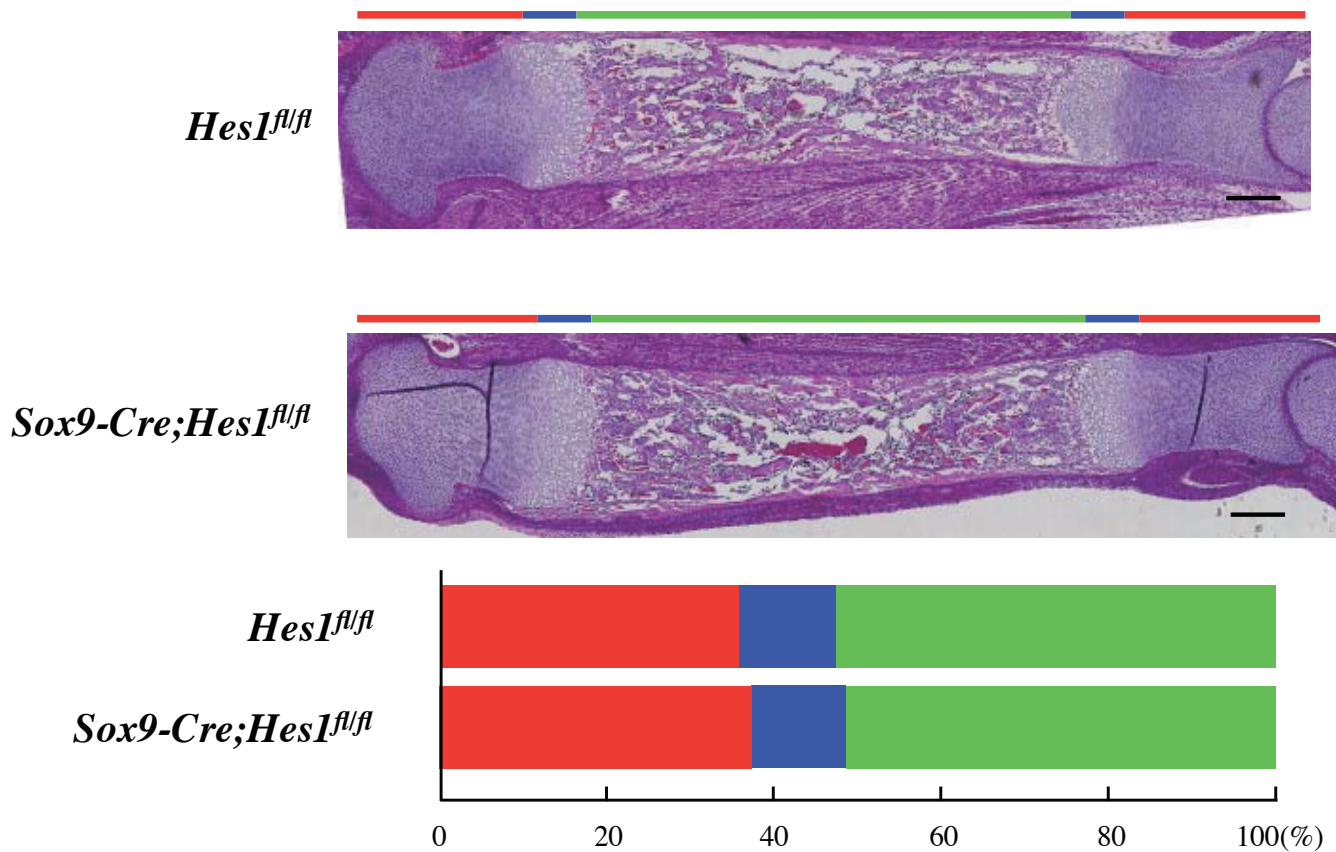


図6. 胎生期軟骨前駆細胞特異的Hes1ノックアウトマウスの組織学的解析：HE染色  
胎生18.5日齢マウスの大腿骨全長における増殖軟骨細胞層（赤線）、肥大軟骨細胞層（青線）、骨化層（緑線）の割合を計測した。各層の割合において有意な差は存在しなかった。  
Scale bars; 200  $\mu$ m



であるX型コラーゲン (Col10a1) の発現、肥大分化以降の石灰化や血管新生の過程のマーカーである Mmp13 や Vegfa の発現はいずれも差が見られなかった。しかし、変形性関節症発症に重要な役割を Mmp13 同様果たしているアグリカネースの Adamts5 はコンディショナルノックアウトマウスで発現が低下していた (図 7)。

### 3-2. Hes1の変形性関節症への関与

骨格形成において Hes1 のノックアウトは影響を及ぼさない事が前述の結果より判明したが、先行研究により Rbpj 依存性の Notch シグナルによる変形性関節症発症のメカニズムにおいて Hes1 が作用している可能性が示されているため[24]、Hes1 が変形性関節症発症に果たす役割を解析する方針とした。軟骨前駆細胞特異的 Hes1 ノックアウトマウス (*Sox-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>*) は前述の通り生直後に死亡するため、軟骨特異的 Hes1 ノックアウトマウスを用いて実験的変形性関節症モデルを作成することとした。

#### 3-2-1. 変形性関節症進行過程における関節軟骨での Hes1 の発現

変形性関節症進行過程での関節軟骨における Hes1 の発現を調べるため、野生型の 8 週齢マウスに変形性関節症モデルを作成し[27]、術直後 (0 週)、術後 2 週、4 週、6 週、8 週でそれぞれ膝関節を回収し、組織学的検討並びに免疫組織化学染色による Hes1 の発現を検討した。Hes1 は変形性関節症進行に伴い関節軟骨での発現が術後 6 週をピークに増加していた (図 8)。

#### 3-2-2. *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスの外科的変形性関節症モデルの検討

正常な骨格形成発達後に Cre の発現を操作できるタモキシフェン誘導性の *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>* マウス[29]を用いて検討を行った。

*Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>* マウスと *Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスを交配し、得られた *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/+</sup>* マウスを *Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスと交配し、得られた *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスを用いた。

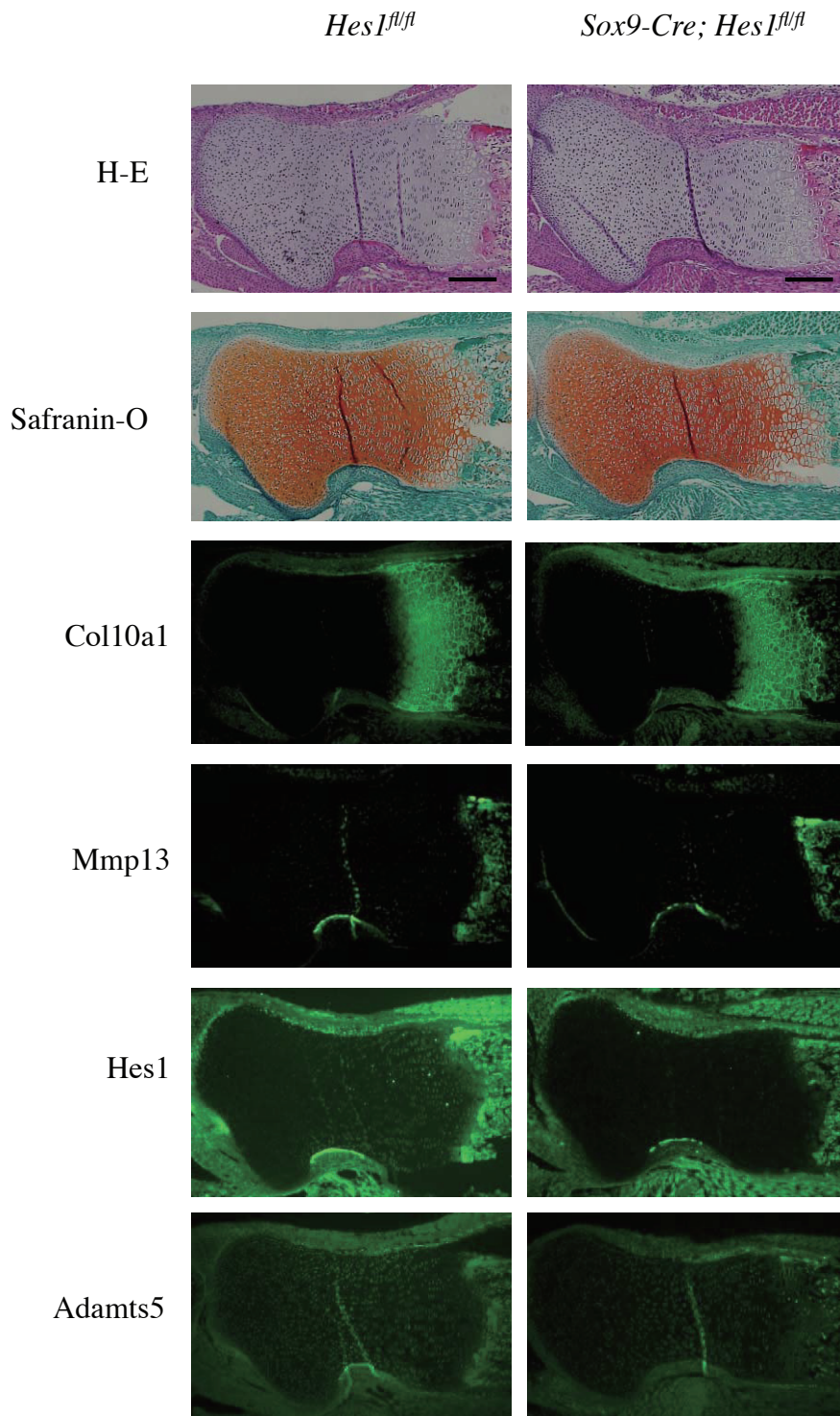


図7. 胎生期軟骨前駆細胞特異的Hes1ノックアウトマウスの組織学的解析：

#### 免疫組織化学染色

胎生18.5日齢マウスの大腿骨近位において各種マーカーおよびNotchシグナル関連分子の免疫組織化学染色を行った。Safranin-Oの染色性やCol10a1、Mmp13の発現は変化なかったが、Adamts5の発現が低下していた。

Scale bars; 200  $\mu$ m

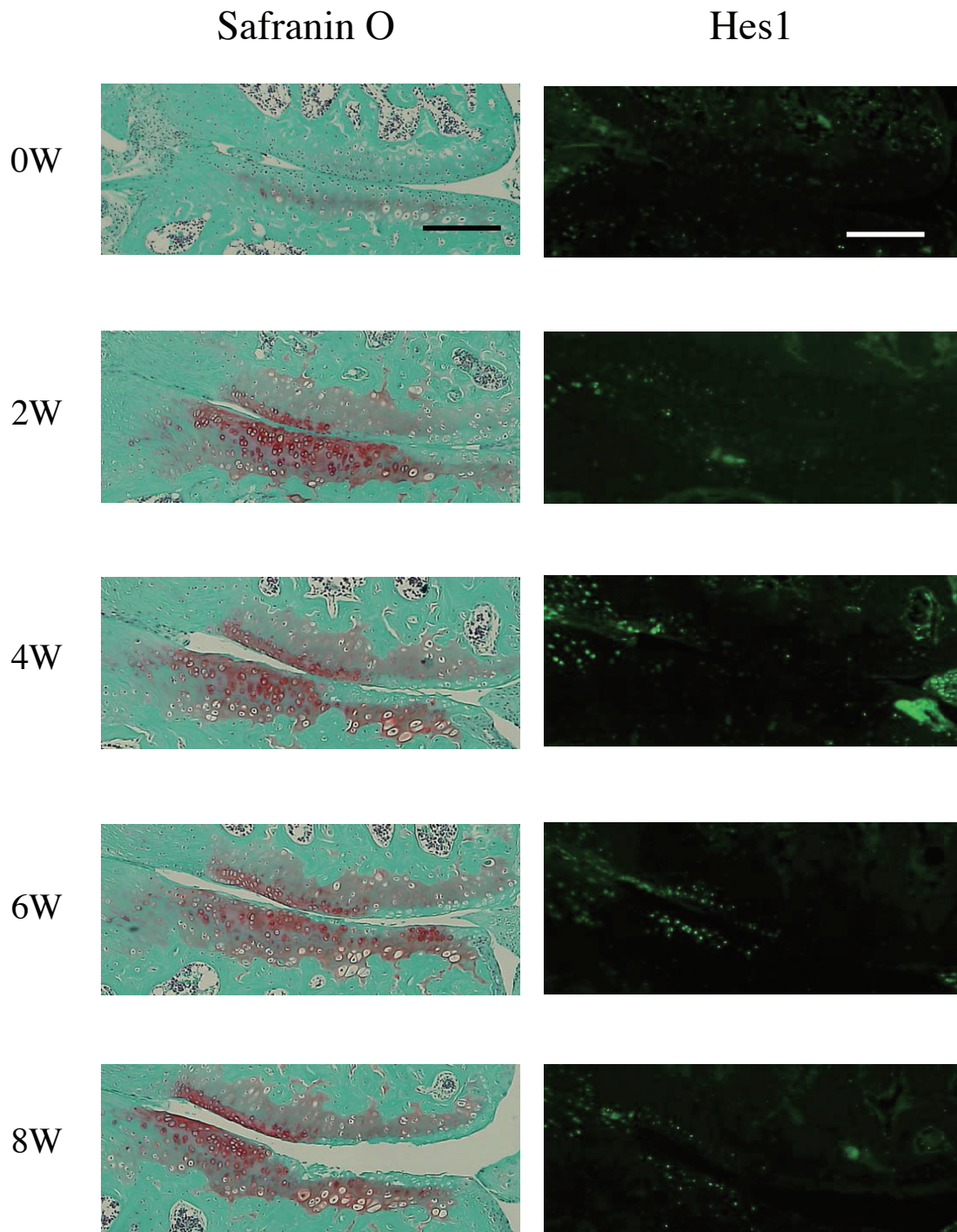


図8. 変形性関節症進行に伴うHes1の関節軟骨での発現パターン

#### 免疫組織化学染色

外科的変形性関節症モデルの術後0,2,4,6,8週におけるHes1の関節軟骨における発現を免疫組織化学染色で確認した。Hes1の発現は変形性関節症の進行に伴い増加していた。術後6週でピークを迎え、8週ではやや低下していた。

Scale bars; 200  $\mu$ m

7 週齢のマウスにタモキシフェンを 5 日間連続で腹腔内注射し、8 週齢で変形性関節症モデルを作成し[27]、術後 8 週（16 週齢）で sacrifice して組織学的な検討を行った。

*Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスと *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスにおいては、8 週齢の時点で成長および骨格形成に差は見られず、また関節構造にも異常はみられなかった（図 9）。マイクロ CT を用いた骨構造解析にても *Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスと *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスの間に差はみられなかった（表 2）。また、生後 16 週齢の両遺伝子型のマウスより関節軟骨を顕微鏡下に採取して、Hes1 の発現量を比較したところ、ノックアウトマウスにおいて Hes1 の発現は十分に抑制されていた（図 10）。

術後 8 週齢のマウスの膝関節の組織学的検討を行った。Safranin O と Fast Green の二重染色を行い脛骨内側関節面を観察すると *Col2a1-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスでは *Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスに比べて Safranin O の染色性が保たれており（図 11）、変形性関節症発症が抑制される傾向がみられた。各種マーカーの免疫組織化学染色を行ったところ *Col2a1-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスでは Col10a1 の発現には変化はなかったが、術後 4 週で Adamts5、術後 8 週で Mmp13 の発現が低下していた。OARSI スコアにても有意差をもって変形性関節症が抑制されていた[28]（図 12）。

## 小括1

転写因子 Hes1 を軟骨前駆細胞特異的に欠損させた *Sox-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスは正常な骨格発達を示した。組織学的にも成長板軟骨において軟骨分化各段階の代表的なマーカーの発現に差はなかった。

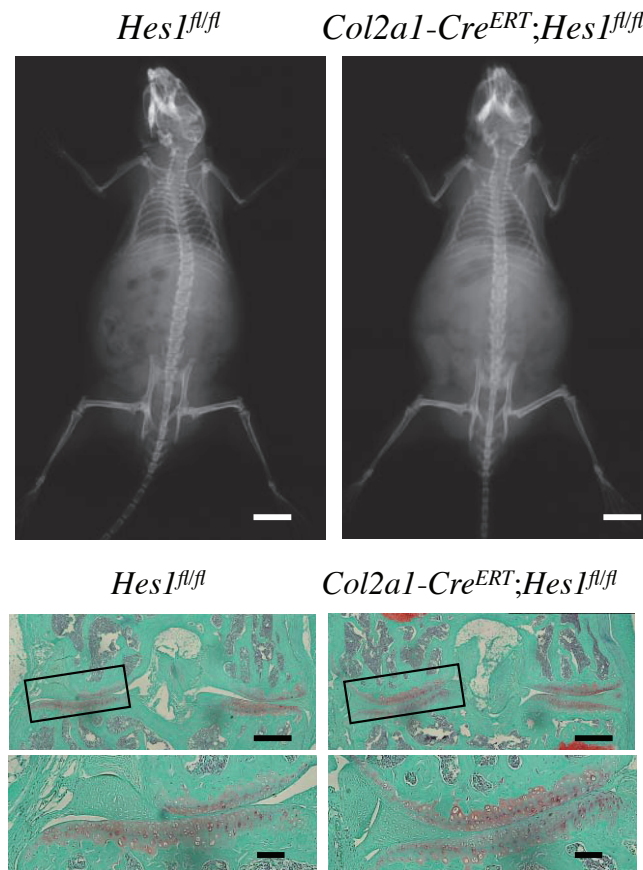
軟骨細胞特異的、かつ正常な発達後にタモキシフェン誘導性に Hes1 を欠損させた *Col2a1-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスは、コントロール群と比較して外科的変形性関節症発症モデルで変形性関節症の発症が有意に抑制されていた。



表2. タモキシフェン誘導性軟骨特異的Hes1ノックアウトマウスの骨構造解析  
8週齢の雄マウスより大腿骨を採取し、マイクロCTにて骨構造解析を行った。  
両遺伝子型において骨構造パラメーターに有意差はみられなかった。

BV/TV ; bone volume / tissue volume, Tb.Th ; trabecular thickness,  
Tb.N ; trabecular number, Tb.Sp ; trabecular spacing.

	<i>Hes1<sup>fl/fl</sup></i>	<i>Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup></i>
BV/TV (%)	13.48 ± 10.0	13.48 ± 4.24
Tb.Th (mm)	39.39 ± 13.77	41.52 ± 8.16
Tb.N (/mm)	3.02 ± 2.31	3.20 ± 0.50
Tb.Sp (mm)	430.24 ± 374.08	277.06 ± 60.88

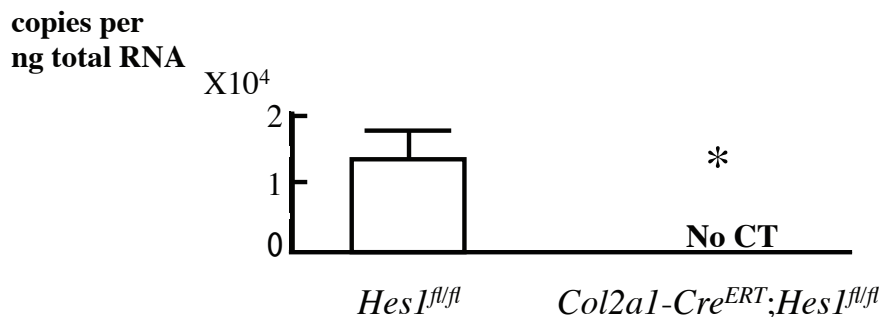


**図9. 軟骨特異的Hes1ノックアウトマウスの骨格および関節構造**  
：単純レントゲンおよび膝関節Safranin O染色

生後8週齢において同胞Hes1<sup>fl/fl</sup>マウスとCol2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>マウスの骨格および関節構造を比較した。Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>マウスは正常に成長し、Hes1<sup>fl/fl</sup>マウスと比較し骨格および関節構造に差はみられなかった。

各染色の下段は上段内黒枠の拡大像を示す

Scale bars; 10mm (単純レントゲン)、400μm (Safranin O上段)、100μm (Safranin O下段)



**図10. 軟骨特異的Hes1ノックアウトマウスのノックアウト効率**

生後16週齢の同胞Hes1<sup>fl/fl</sup>マウスとCol2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>マウスより採取した初代関節軟骨細胞を採取し、real-time RT-PCRにてHes1発現量を確認した。Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>マウスでは測定不能なレベルでHes1はノックアウトされていた。

\*P<0.01 vs Hes1<sup>fl/fl</sup>

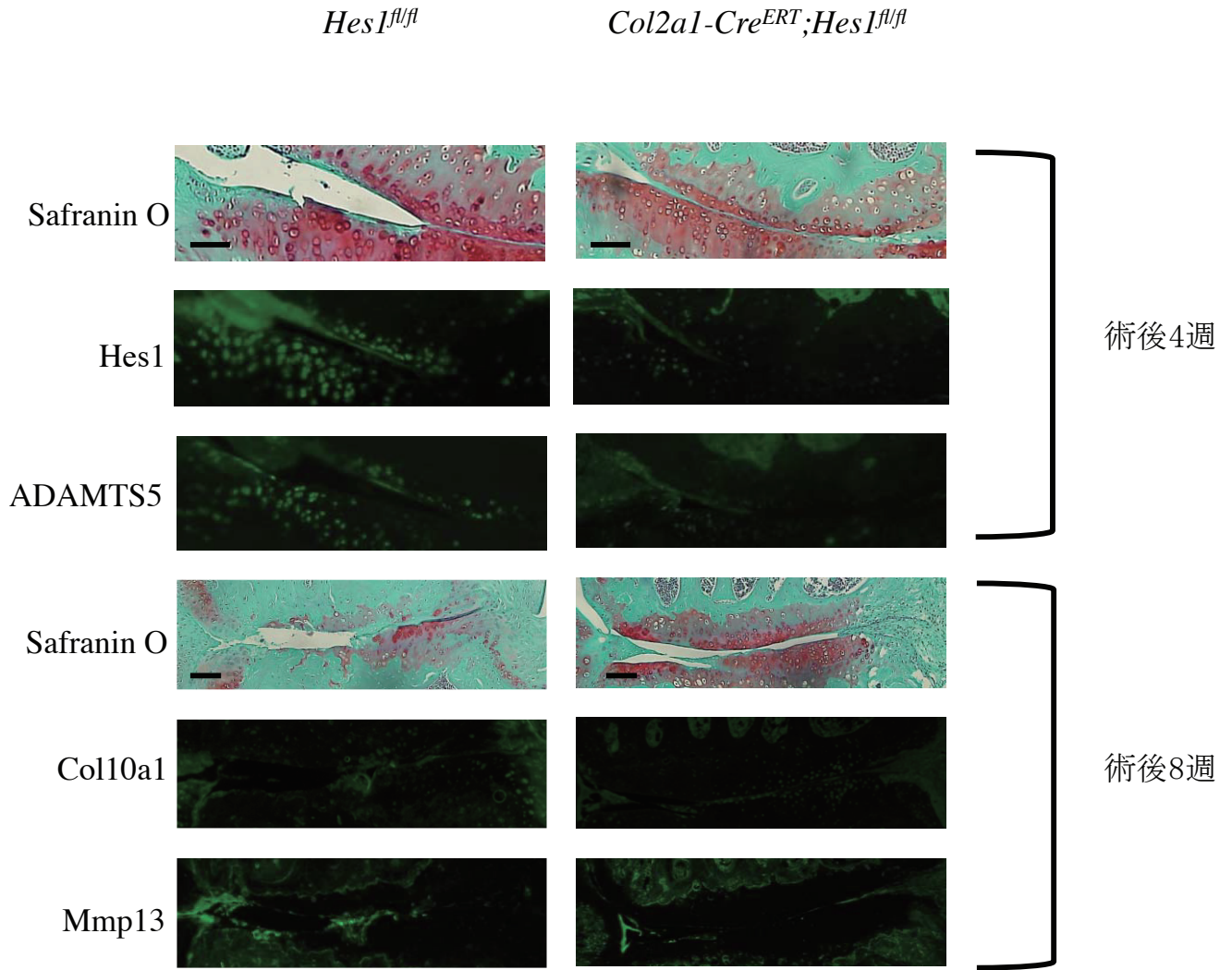


図11. 軟骨特異的Hes1ノックアウトマウスにおける変形性膝関節症モデルの組織学的解析  
 同胞Hes1<sup>fl/fl</sup>マウスとCol2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>マウスにおいて変形性膝関節症モデルを作成し、  
 術後4、8週で関節軟骨の評価をSafranin Oで、軟骨分化マーカーの免疫組織化学染色を行った。  
 Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>マウスではHes1<sup>fl/fl</sup>マウスに比べて  
 変形性関節症の進行が抑制され、Mmp13、Adamts5の発現も抑制されていた。  
 Scale bars; 100μm

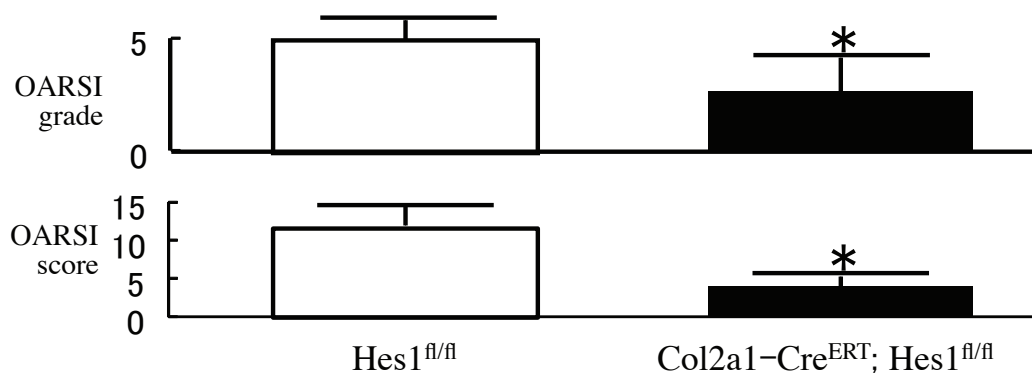


図12. 軟骨特異的Hes1ノックアウトマウスにおける変形性膝関節症モデルのスコアリング  
 OARS grading systemを用いて軟骨破壊の程度を定量化した。Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>  
 マウスにおいて有意に変形性関節症の抑制がみられた。  
 データは平均値 (bars) ±s.d. (error bars)、n=7/group、\*P<0.01 vs Hes1<sup>fl/fl</sup>

### 3-5. Hes1による変形性関節症発症のメカニズム

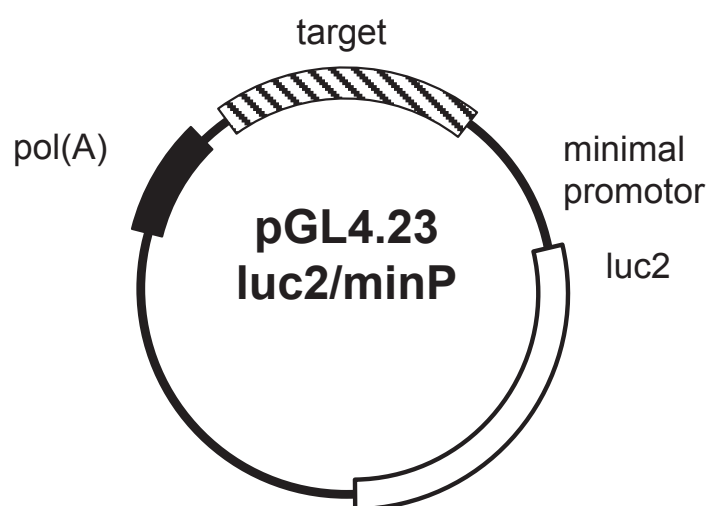
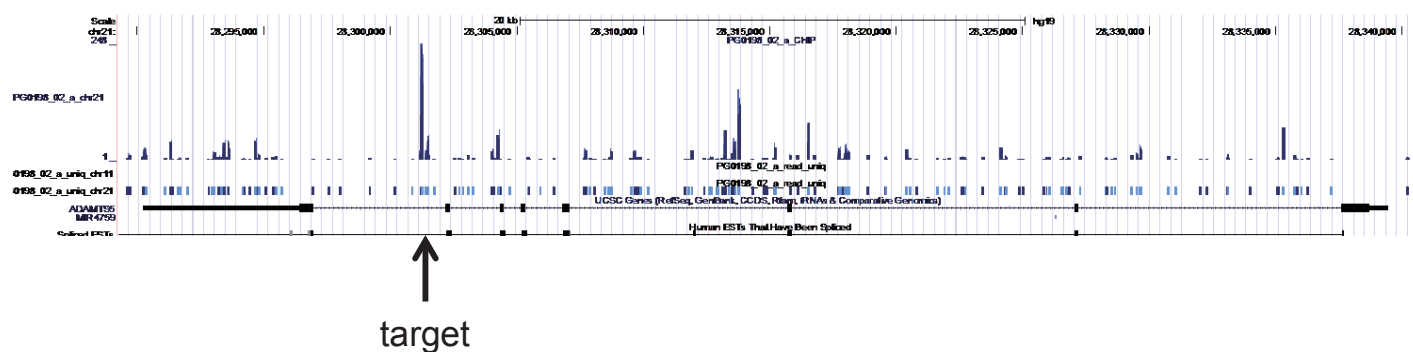
#### 3-3-1. 全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンスによるHes1の作用点の確認

以上の結果より軟骨細胞における Hes1 は変形性関節症発症において促進的な役割を果たしている事が推測された。先行研究より Rbpj 依存性の Notch シグナルが軟骨内骨化や変形性関節症発症の過程で重要な役割を果たしている事が示唆され、さらにその下流である Hes1 が Mmp13 の発現を誘導する事がそのメカニズムの一端を担っていることも示されている[24]。

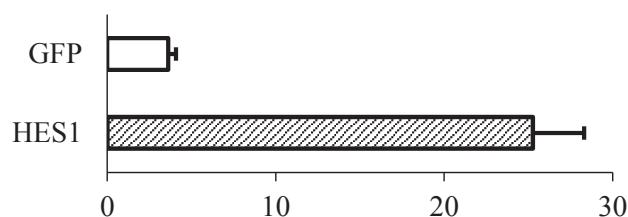
Hes1 による変形性関節症発症のメカニズムを解析するため、我々は転写因子 Hes1 に対して ChIP シークエンス法を用いた全ゲノムにおける Hes1 の結合領域の網羅的探索を行った。3×FLAG タグ付き HES1 を強制発現させた SW1353 細胞の DNA をクロマチンとクロスリンクさせ抗 FLAG 抗体にて回収、破砕機による細片化を行い ChIP シークエンス法によりゲノム上の結合領域を探索した。

まず、変形性関節症発症に関与するもので代表的な *catabolic factor* である MMP13 のゲノム上で、イントロン 4 上に高いピークが見られた (図 13)。こちらに対応する 100bp の配列をクローニングし、ベータサルプロモーター付き PGL4 ベクターに組み込み、HES1 によるルシフェラーゼアッセイを行ったところ、HeLa 細胞、SW1353 細胞双方において HES1 による強い刺激応答性が見られた (図 13)。さらに、同じく変形性関節症発症に際して同じく代表的なものであるアグリカネーアの ADAMTS5[33, 34]のゲノム上で、イントロン 7 上に高いピークが見られた (図 14)。こちらに対応する 500bp 程度の配列をクローニングし、ベータサルプロモーター付き PGL4 ベクターに組み込み、同じくルシフェラーゼアッセイを HES1 により行ったところ、こちらの配列も強い応答性が見られた (図 14)。

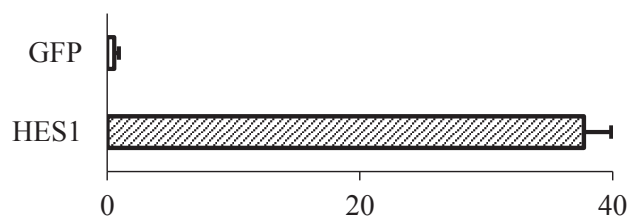




### HeLa

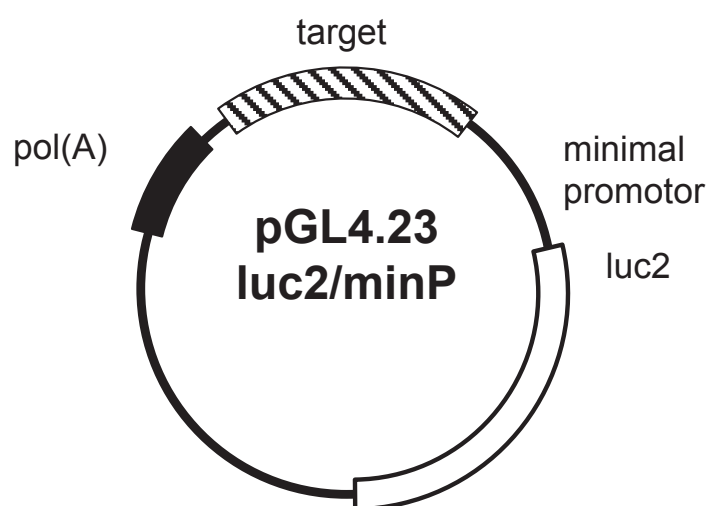
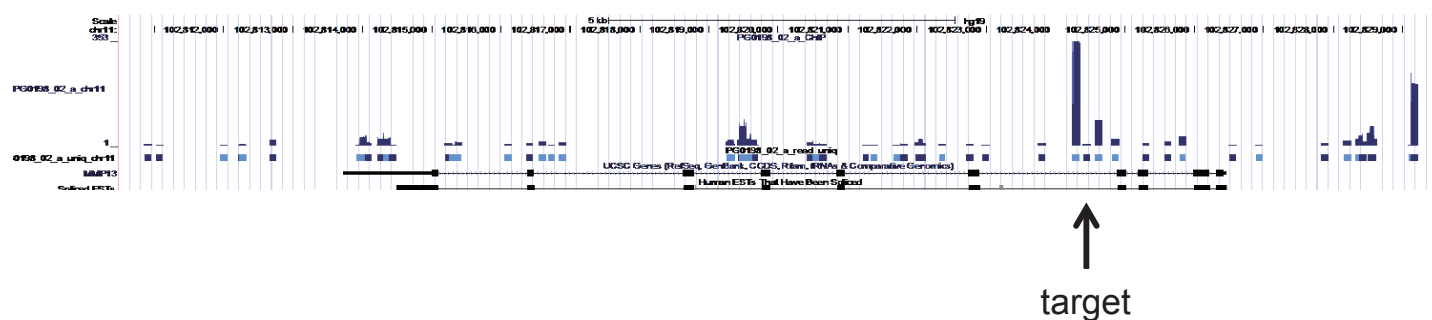


### SW1353

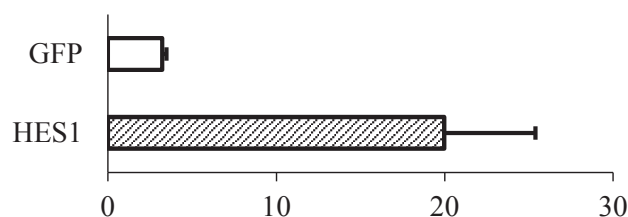


**図13. ChIPシーケンスを用いたMMP13ゲノム上のHES1結合領域の探索**

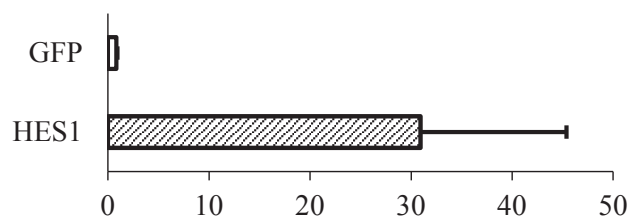
ヒト軟骨細胞株SW1353にレトロウイルスベクターを用いてHES1遺伝子を安定導入し培養後、クロマチン免疫沈降法にて結合DNAを回収、ChIPシーケンシングによる標的DNAのマッピングを行った。MMP13ゲノム上の第7イントロンにピークが見られ、その配列領域をベータプロモーター付きベクターに組み込み、ルシフェラーゼアッセイを行った。HeLa, SW1353いずれの細胞株においてもHES1による強い反応性が認められた。



**Hela**



**SW1353**

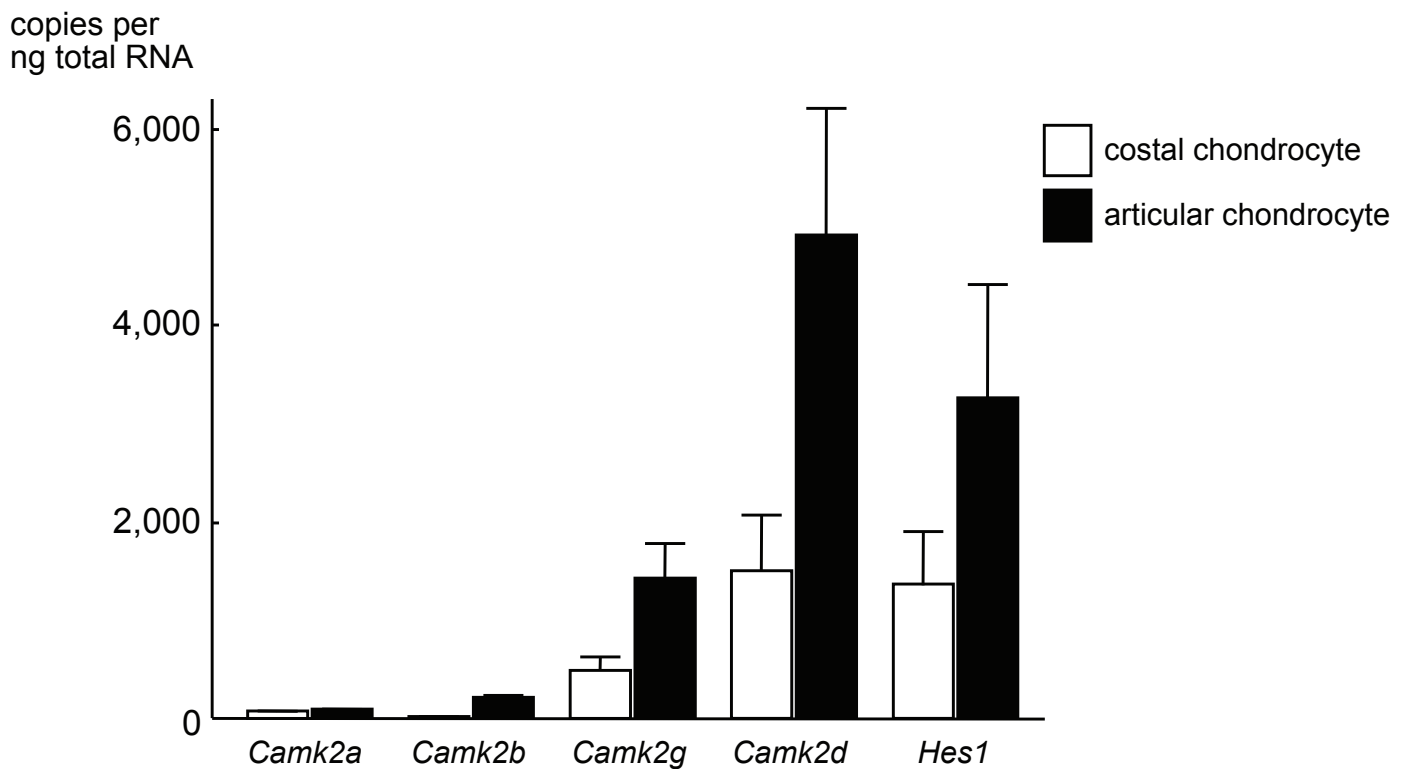


**図14. ChIPシーケンスを用いたADAMTS5ゲノム上のHES1結合領域の探索**  
 ヒト軟骨細胞株SW1353にレトロウイルスベクターを用いてHES1遺伝子を安定導入し培養後、クロマチン免疫沈降法にて結合DNAを回収、ChIPシーケンシングによる標的DNAのマッピングを行った。ADAMTS5ゲノム上の第4イントロンにピークが見られ、その配列領域をベーサルプロモーター付きベクターに組み込み、ルシフェラーゼアッセイを行った。HeLa, SW1353いずれの細胞株においてもHES1による強い反応性が認められた。

### 3-3-2. Camk2によるHes1の転写活性化作用

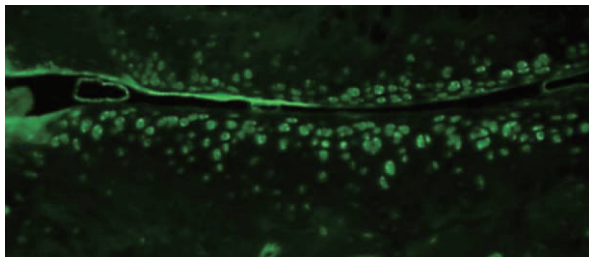
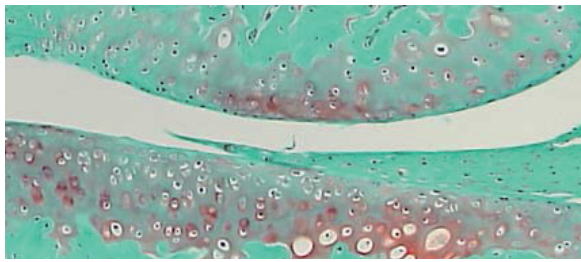
転写因子 Hes1 は本来転写抑制因子としての働きが一般的であり[31, 35, 36]、転写促進因子としての報告は少ない。先行報告として、カルモジュリンキナーゼである Camk2 により Hes1 が特定の場所にリン酸化を受ける事により、ターゲットである Mash-1 の転写を促進するという報告がある[37]。我々はこの働きに着目し、Mmp13 の Hes1 による転写調節を解析した。

Camk2 にはアイソフォームとして  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の 4 種が存在する事が知られている[38]。また、Camk2 の異所性発現が軟骨分化の段階を促進させる事が先行研究で知られている[39]。我々はまず第 1 にマウス肋軟骨及び関節軟骨細胞における Camk アイソフォームの発現パターンをリアルタイム PCR を用いて調べた。すると、Camk2  $\delta$  が最も発現量が多く、特に肋軟骨より関節軟骨細胞においてその発現が強かった (図 15)。さらに、Camk2  $\delta$  の抗体を用いた免疫染色にて正常関節軟骨、ならびに変形性関節症モデルより得られた変性軟骨双方において Camk2  $\delta$  が発現していた (図 16)。軟骨細胞、特に関節軟骨細胞において Camk2 が作用している事がこれらの結果より推測されたため、次に ATDC5 細胞にドキシサイクリン誘導性の発現能を有するレンチウイルスを用いて HES1、HES1 の dominant negative form (以下 DN)、さらに Camk2 のリン酸化部位を変異させた(S126A)HES1 を強制発現させ、Mmp13、Adamts5 の発現をリアルタイム PCR で確認した。すると正常型の HES1 では双方ともに強く誘導されたが、DN、S126A 変異型 HES1 ではその効果が打ち消された (図 17)。さらにこれらの細胞を用いて、更にコントロールベクターあるいは Camk2  $\delta$  の常時活性化型フォームを追加で導入し、共発現させた。これらの細胞における Mmp13、Adamts5 の発現パターンをリアルタイム PCR で調べたところ、HES1 による Mmp13、Adamts5 の発現誘導効果は Camk2  $\delta$  の共発現

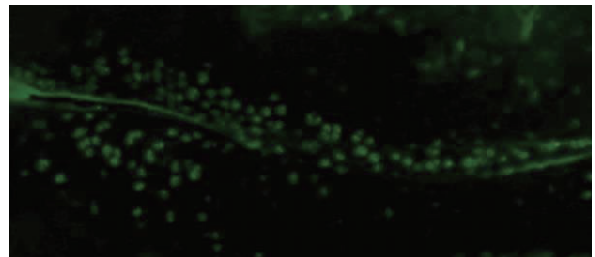
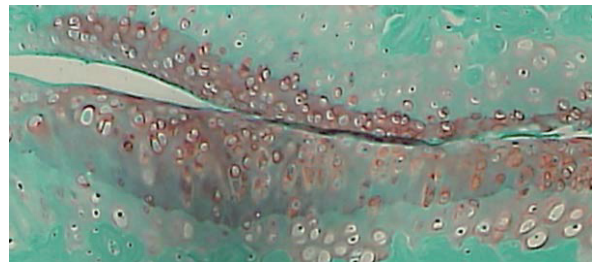


**図15. マウス肋軟骨、関節軟骨におけるCamk2ファミリーの発現パターン**  
 野生型マウスより採取した肋軟骨、関節軟骨由来の初代軟骨細胞を用いてCamkの発現パターンを調べた。Camk $\gamma$ 、Camk $\delta$ が高いレベルで発現しており、また、発現レベルは肋軟骨より関節軟骨において有意に高かった。なお、Hes1の発現レベルも関節軟骨で有意に高かった。

WT

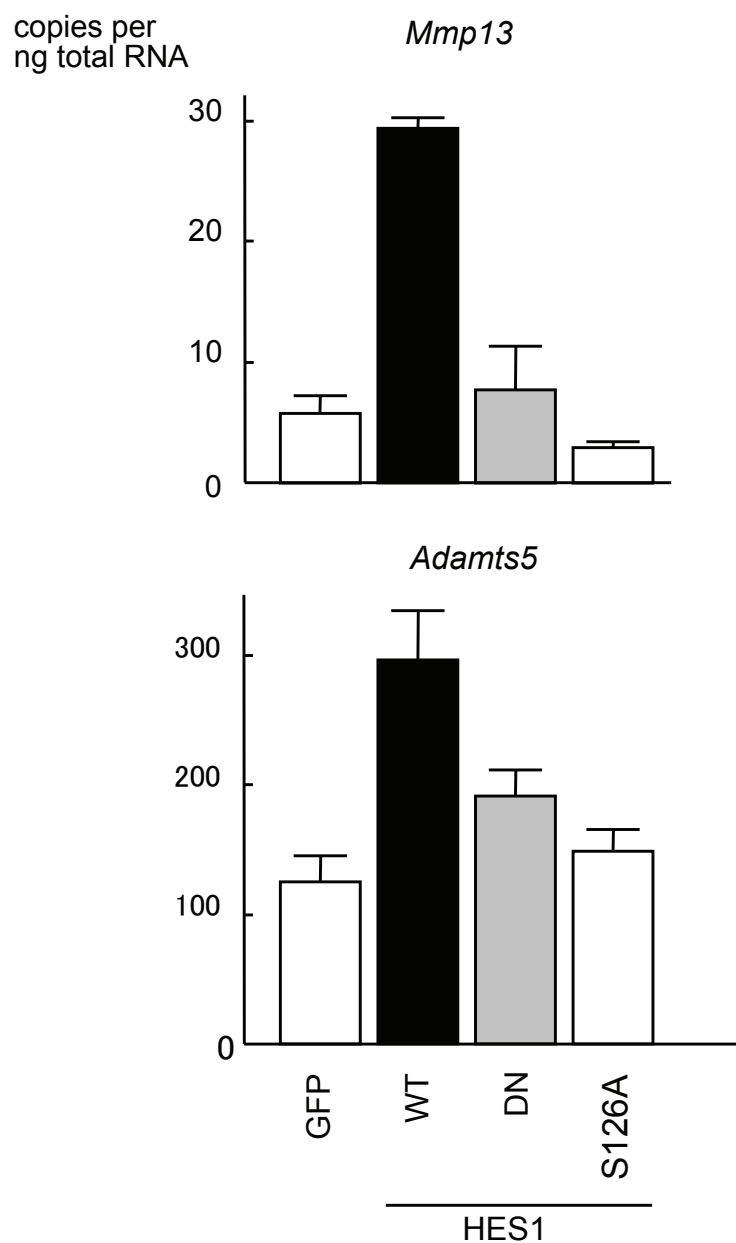


OA



#### 図16. マウス関節軟骨におけるCamk2δの発現

野生型マウスより得られた正常膝軟骨サンプル、ならびに変形性関節症モデルより得られた変性軟骨双方においてCamk2δの免疫染色を行った。双方においてCamk2δの発現が見られた。



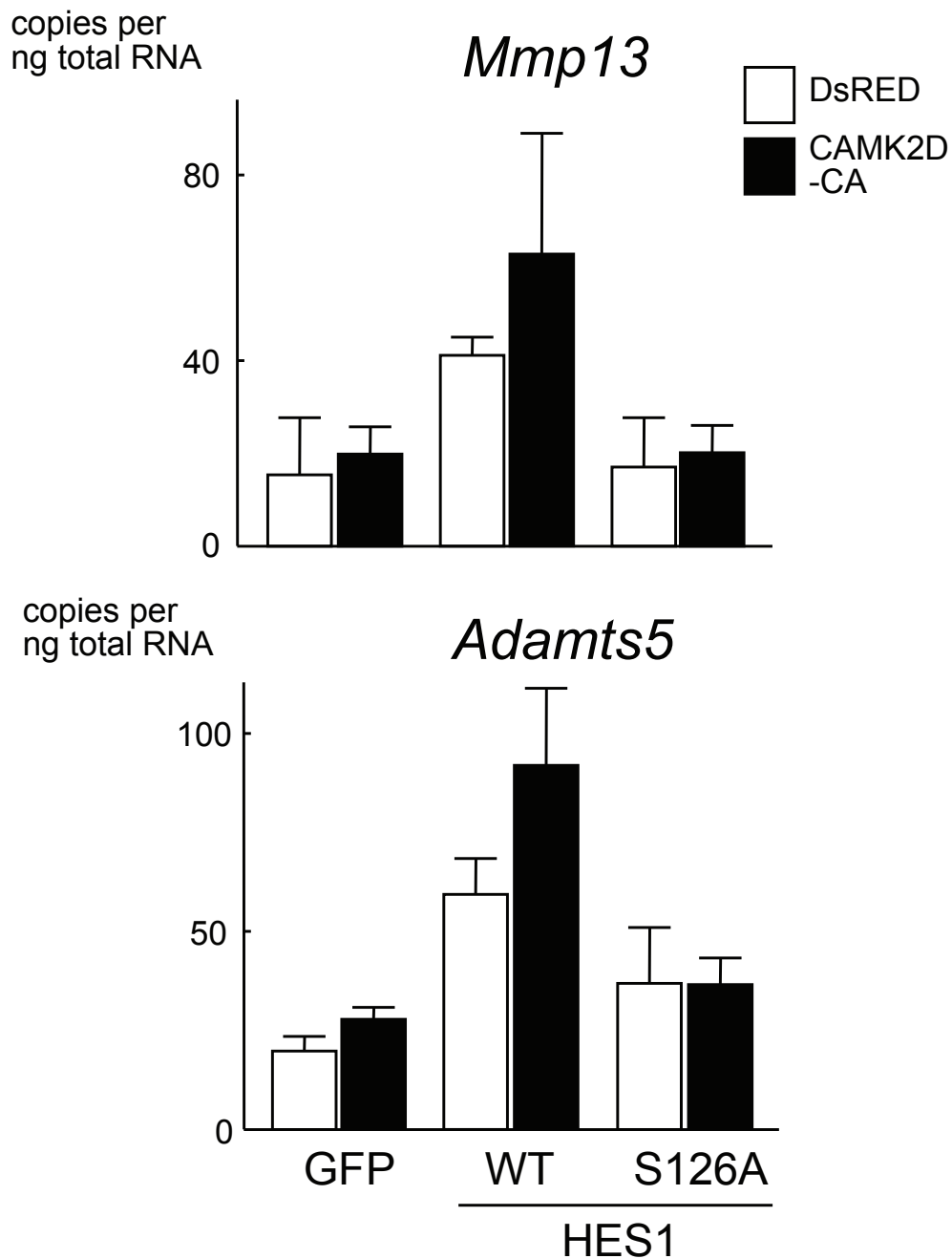
**図17. 薬剤誘導性HES1強制発現系におけるMmp13、Adamts5の発現パターン**

ドキシサイクリン誘導性の発現能を有するレンチウイルスベクターを用いてGFP、HES1、HES1の Dominant negative (DN) form, ならびに変異型 (S126A)HES1をATDC5細胞に導入した。

ドキシサイクリン投与後2日でRNAを回収しrealtime-RT-PCRでMmp13、Adamts5の発現パターンを調べた。

HES1によりMmp13、Adamts5は誘導されていたが、DN form, 変異型HES1ではその誘導は消失した。

により更に促進されたが、Camk2  $\delta$  によるリン酸化部位を変異させた S126A 変異型 HES1 では Mmp13 ならびに Adamts5 の発現誘導効果が見られず、また、Camk2  $\delta$  による追加効果も見られなかった (図 18)。



**図18. ATDC5細胞でのCAMK2δとHES1の共発現によるMmp13、Adamts5の発現パターン変化**  
 ドキシサイクリン誘導性の発現能を有するレンチウイルスベクターを用いてGFP、HES1、変異型(S126A)HES1をATDC5細胞に導入した。さらにDS RED、Camk2δのCA formをこれらの細胞に安定導入して共発現させた。  
 ドキシサイクリン投与後2日でRNAを回収しrealtime-RT-PCRでMmp13、Adamts5の発現パターンを調べた。  
 HES1によりMmp13、Adamts5は誘導されており、その効果はCamk2δの共発現により増強したが、変異型HES1ではその効果は見られなかった。



## 第4章 考察

今回の研究において、軟骨細胞における転写因子Hes1はCamk2  $\delta$  と共同して基質分解酵素であるMmp13やAdamts5を誘導し、変形性関節症発症に関与している事が示された。

Hes1 は basic helix-loop-helix (bHLH) ファミリーに属する転写因子であり、主な働きとしては標的の転写を抑制する性質を持ち、主な働きとしては神経発生の段階で神経幹細胞の維持に関わっている事が知られている。Hes1 を強制発現させると未分化状態が維持され、欠失させると分化の段階が促進する[36]。また、自己の転写に関しても negative-feedback loop をかけ、なおかつタンパクそのものの分解も非常に速やかであるため、2 時間程度のサイクルで周期的に発現量が増減する事も知られている[36]。また、骨格系への Hes1 の関与としては、I 型コラーゲンプロモーター下に Hes1 を過剰発現させたマウスにおいて骨芽細胞の分化が抑制され骨量の減少が見られ、四肢の未分化間葉系細胞特異的に Hes1 をノックアウトすると逆に骨量が増加したという報告が見られる[40]。この原理としては Hes1 がオステオカルシンのプロモーターに結合しその転写を抑制するという報告が提唱されている[41]。

Hes1 そのものの変異による人の先天性疾患は現段階において知られているものは存在しない。ただし、Adams-Oliver Syndrome (AOS) は先天性頭部皮膚欠損、四肢末端形成異常、頭蓋骨欠損、血管形成異常、などの症状を来す遺伝子疾患だが、これらの原因遺伝子として Notch シグナルにおいて Hes1 の上流に位置する Rbpj 変異が知られており、その変異により Hes1 タンパクの発現が低下している事も確認されている[42]。

軟骨分化における Hes1 に関する報告では、Hes5 を全身性にノックアウトした上で更に Col2a1 プロモーター下に軟骨特異的に Hes1 をノックアウトすると成長発達段階で特に異常が見られなかった事が報告されている[43]。本研究においても Sox9 プロモーター下、すなわち軟骨前駆細胞特異的に Hes1 をノックアウトしたマウスを作成したが、この *Sox-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスは先の報告と同じく成長発達段階での骨格異常は見られなかった。

Hes1 の上流である Notch シグナルの軟骨分化への関与については間葉組織特異的に Notch 受容体をノックアウトすると前駆細胞から軟骨細胞や骨芽細胞への分化が抑制され骨軟骨の形成が抑制される事や、Notch 受容体を強制発現すると正常な骨格形成が起きない事が報告されている[16, 44]。また、軟骨前駆細胞特異的に Rbpj をノックアウトすると軟骨内骨化の最終段階が阻害され肥大軟骨層の延長、四肢短縮型のドwarf を呈する事も報告されている[24]。これらの結果より、Notch シグナルそのものは軟骨分化に対して初期には抑制的、後期には促進的に働いていると考えられる。しかしながら、本研究において Notch シグナルの下流に位置するとされる Hes1 の軟骨前駆細胞特異的ノックアウトマウスは正常な軟骨分化を示した。これは Hes1 の上流であると言われている Rbpj 依存性の Notch シグナルが骨格形成並びに変形性関節症発症に寄与しているという報告[24]とは合致しない形となる。

本研究においてはこの Rbpj と Hes1 のノックアウトマウス間における発達段階での表現型の差のメカニズムについて詳細に解析する事はできなかった。が、いくつかの仮説をあげると、Hes1 の発現レベルが本研究で示したように肋軟骨細胞より関節軟骨細胞において明らかに高い（図 14）ことがまず第 1 にあげられる。肋軟骨細胞はその性質として軟骨内骨化がおこる成長軟骨細胞と類似しており、関節軟骨細胞は分化の終了した完全な定常状態の軟骨細胞と考えられ、軟骨細胞

での2者のプロファイルは若干異なると考えられる。肋軟骨細胞において Hes 1 の発現レベルがより低いという事はそのノックアウトの影響がより出にくかった事が予想される。これは変形性関節症モデルを *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>* で作成したところこちらでは Hes1 のノックアウトによりコントロール群に比して変形性関節症の発症が抑制されたことから成長軟骨、関節軟骨間で Hes1 の発現レベルが異なっている事が表現型の差につながっている事への仮説たりうる。また Hes1 は他の Hes/Hey メンバーや、他に Herp, MyoD などとダイマーを形成して転写因子として働く事が知られており[36]、何らかの compensator としてはたらく因子が代わりに発現上昇している可能性等もあると考えられる。

変形性関節症の発症に関しては、メカニカルストレスによる関節軟骨細胞の損傷が病態であると考えられているが、炎症による軟骨細胞外基質のリモデリングが軟骨変性の契機となっているという報告もあり[45]、また、炎症性サイトカインの代表的なものである IL-1 $\beta$  が軟骨細胞において Hes1 の発現を促すという報告もある[46]。本研究で用いられた変形性関節症モデルは内側側副靱帯及び内側半月を切除する事により膝関節に不安定性を惹起してメカニカルストレスを軟骨にかける事で変形性関節症を誘起しているが[47]、手術侵襲を加える事による外傷モデルと考える事もできるため、炎症の影響は看過することはできず、変形性関節症モデルでのみ遺伝子型群間に差が見られた一因としても考えられる。

本研究において、Hes1 による軟骨変性を引き起こすメカニズムとして、Mmp13 や Adamts5 というような基質分解酵素が Hes1 により誘導されるという事を示した。また、Mmp13 や Adamts5 のゲノム上において Hes1 が直接あるいは他の因子とコンプレックスを形成して間接的に結合している事が予想される領域を ChIP シークエンス法により示した。Hes1 には既知の結合配列が存在し、E-box (CANNTG)、N-box (CACNTG)、Class C site (CACGCG) などが挙げられる[36]。今回 ChIP シ

ークエンس法で発見した領域の配列内に、こうした Hes1 の既知の結合配列は Adamts5 の配列内に一カ所 E-box が存在する事が判明しているが、点変異生成等を行った上でのルシフェラーゼアッセイなどは未施行であるため、こちらの E-box が真の結合配列か否かは不明である。また、Mmp13 ゲノム上に発見された領域については既知の結合配列は存在しなかったため、こちらについても領域のどの部分が真の結合配列に当たるかは不明である。他の因子を介した間接的な結合である可能性もある。今後点変異生成や欠失解析等を併用したルシフェラーゼアッセイなどにより、結合配列の探索が必要となってくると考えられる。

先述したように Hes1 の転写因子としての働きは主に転写抑制因子としての働きである、本研究で示されたように Hes1 が転写促進因子として働くという事は極めて稀である。先行報告の中でも Hes1 が転写促進因子として働くというものは少なく、我々が渉猟し得た範囲では Camk2 により Hes1 の特定の部位がリン酸化を受ける事によりその他の転写共役因子と巨大な complex を形成して標的遺伝子である Mash1 の転写を促進するという報告があるのみであった[48]。本研究では、正常型の Hes1 では誘導された Mmp13、Adamts5 の発現が Camk2 の標的リン酸化部位を変異させた変異型の Hes1 では見られなくなった事や、Hes1 と Camk2 の共発現により Mmp13 や Adamts5 の発現が更に上昇した事等から、同様のメカニズムで Hes1 が Mmp13 や Adamts5 の転写促進因子として働いている可能性が示された。

Camk2 は細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇により活性化したカルモジュリンが結合する事により活性化され、立体構造を変化させ自己リン酸化を受ける事でその活性を持続させるカルモジュリン依存性プロテインキナーゼである[49]。神経細胞に豊富に発現し、記憶や学習に際して重要な役割を果たしていると考えられており、Camk2 ノックアウトマウスは空間記憶学習に障害を受けるという報告がある[50]。ヒトにおける Camk2 の異常による疾患としては、アルツハイマー病やエンジェルマン症候

群、不整脈等が知られている[51]。

軟骨における Camk2 の生理的役割としては、軟骨内骨化において増殖期から肥大分化期に移行する時期に豊富に発現しており、軟骨細胞の肥大分化を進めるという報告や、Camk2 の CA フォームをニワトリの羽原基に異所性に発現させると軟骨細胞の分化が促進し、CyclinD などの細胞増殖を示すマーカーの発現が減少し、10 型コラーゲン等の肥大分化を示すマーカーの発現が上昇するという報告等がある[52, 53]。また、ヒト軟骨細胞においてメカニカルストレスをかけた際に上昇する  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの上昇に伴い Camk2 が活性化しているという報告もある[54]。

これらの報告では、軟骨分化における Camk2 の役割としては増殖期から肥大分化期に至る比較的軟骨分化でも中期で働くというものであった。本研究では、Camk2 は Hes1 と共同して変形性関節症モデルで基質分解酵素 Mmp13 や Adamts5 を誘導していた。一方 Hes1 のノックアウトマウスでは骨格形成に特に異常は見られなかった事に対しては発達段階における Camk2 の増殖期から肥大分化期という発現タイミングと主に軟骨分化の後期から末期に発現する Hes1 の発現のタイミングのずれが発達段階における Hes1 の関与を少なくしている可能性がある。

現時点における変形性関節症治療の方法としては、運動療法、消炎鎮痛剤の内服、ヒアルロン酸の関節内注射などが保存療法として広く用いられており、保存療法に抵抗性の場合には人工関節置換などの手術療法があげられる。いずれの方法においても軟骨変性そのものを停止、あるいは遅らせる効果には乏しく、疼痛緩和がその主目的となっている。本研究を実際に変形性関節症の治療に応用する事を検討した場合、Hes1 は軟骨特異的にノックアウトした場合に骨格成長に大きな影響を及ぼさなかったため、siRNA の関節内注射等のデリバリー方法を用いてノックダウンする事で、骨軟骨に対する副作用が少ない変形性関節症発症抑制効果等が期待できる。また、共同して働く Camk2 は既に既知の阻害薬が複数知られてお

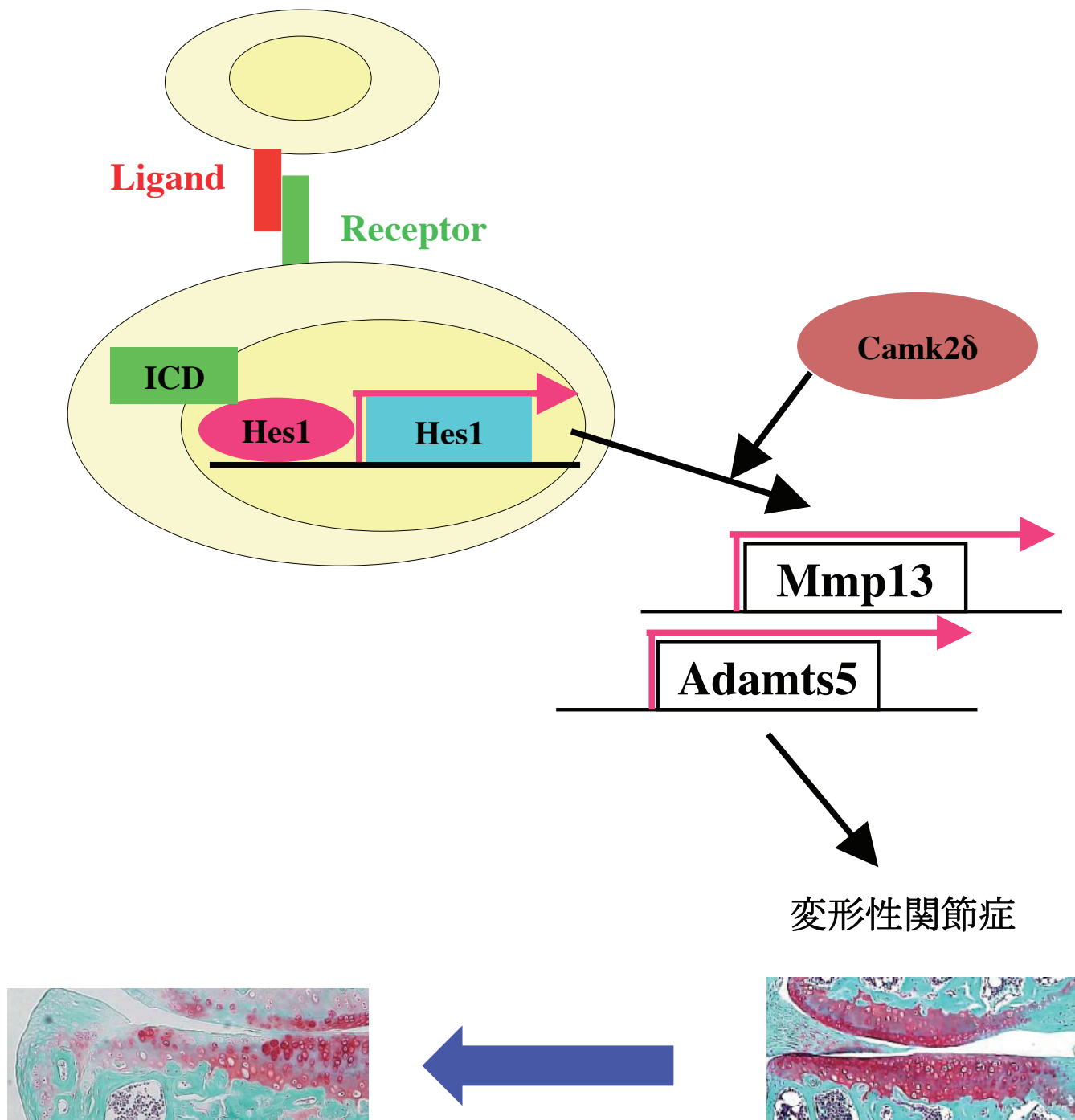
り[55]、全身投与、あるいは局所投与によりそれを阻害することが可能となっている。転写因子である Hes1 はその働きを阻害するには若干の困難を要するが、Camk2 は阻害薬使用によりその阻害は比較的容易であり、水溶性の阻害剤が存在することから関節内投与などもデリバリー的手段として有効と考える。ただし、本研究の知見からはこれらの Hes1、Camk2 の阻害が軟骨再生につながるのではなく、あくまで変性の予防となる形になるため、実際の臨床に適用する際には、変形性関節症の高リスク群（肥満、外傷後、その他）を選択して変性が進行する前に予防的に投与する形になり、その適応は慎重な選択が望ましいと考える。

今回の研究で、軟骨細胞における Hes1 による変形性関節症の制御について検討した。これらのメカニズムをさらに詳細に解明することにより軟骨疾患の新規治療法開発に発展することが期待される。

## 結論

本研究によりNotchシグナル転写因子Hes1はカルモジュリン依存性キナーゼCamk2と共同してMmp13、Adamts5といった基質分解酵素の発現を誘導し、変形性関節症発症に関与していることが示された（図19）。これらのメカニズムの解明により、変形性関節症の予防・治療にさらなる光が照らされることを期待する。





**図19 軟骨細胞におけるHes1の作用**

シグナルが活性化されると、受容体の核内ドメイン（ICD）が核内移行し、核内転写因子Rbpjと結合することで下流分子であるHes1の発現が誘導され、さらにHes1がCamk2δと共同してMmp13やAdamts5を誘導することによって変形性関節症を制御している。



## 謝辞

本研究は、主に東京大学大学院医学系研究科 感覚・運動機能医学講座 整形外科学分野（整形外科学教室）にて行いました。

基礎研究に従事する貴重な機会を与えて下さり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った整形外科教室 中村耕三前教授、田中栄教授に謹んで感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり、研究の基礎から終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り、有益な御助言を賜った東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 鄭雄一教授に厚く感謝申し上げます。

最後に、基礎研究の初歩から学会発表、論文作成に至るまで終始にわたり御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った東京大学整形外科学教室 川口浩前准教授、東京大学医学部附属病院ティッシュ・エンジニアリング部 齋藤琢准教授に謹んで感謝いたします。

## 引用文献

1. H. M. Kronenberg, Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 423: p332-336. 2003
2. H. Kawaguchi, Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol.Cells*. 25: p1-6. 2008
3. N. Ortega, D. J. Behonick and Z. Werb, Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol*. 14: p86-93. 2004
4. D. Stickens, D. J. Behonick, N. Ortega, B. Heyer, B. Hartenstein, Y. Yu, A. J. Fosang, M. Schorpp-Kistner, P. Angel and Z. Werb, Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development*. 131: p5883-5895. 2004
5. E. Zelzer, R. Mamluk, N. Ferrara, R. S. Johnson, E. Schipani and B. R. Olsen, VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development*. 131: p2161-2171. 2004
6. N. Ortega, D. Behonick, D. Stickens and Z. Werb, How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 995: p109-116. 2003
7. L. M. Calvi, G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H. M. Kronenberg and D. T. Scadden, Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 425: p841-846. 2003

8. K. Yoon and N. Gaiano, Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat.Neurosci.* 8: p709-715. 2005
9. B. D'Souza, L. Meloty-Kapella and G. Weinmaster, Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr.Top.Dev.Biol.* 92: p73-129. 2010
10. T. Iso, L. Kedes and Y. Hamamori, HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J.Cell.Physiol.* 194: p237-255. 2003
11. R. Kopan and M. X. Ilagan, The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 137: p216-233. 2009
12. C. Karlsson, M. Jonsson, J. Asp, C. Brantsing, R. Kageyama and A. Lindahl, Notch and HES5 are regulated during human cartilage differentiation. *Cell Tissue Res.* 327: p539-551. 2007
13. R. Crowe, J. Zikherman and L. Niswander, Delta-1 negatively regulates the transition from prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes during cartilage formation. *Development.* 126: p987-998. 1999
14. R. Fujimaki, Y. Toyama, N. Hozumi and K. Tezuka, Involvement of Notch signaling in initiation of prechondrogenic condensation and nodule formation in limb bud micromass cultures. *J.Bone Miner.Metab.* 24: p191-198. 2006
15. M. J. Hilton, X. Tu, X. Wu, S. Bai, H. Zhao, T. Kobayashi, H. M. Kronenberg, S. L. Teitelbaum, F. P. Ross, R. Kopan and F. Long, Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat.Med.* 14: p306-314. 2008

16. Y. Dong, A. M. Jesse, A. Kohn, L. M. Gunnell, T. Honjo, M. J. Zuscik, R. J. O'Keefe and M. J. Hilton, RBPjkappa-dependent Notch signaling regulates mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation during skeletal development. *Development*. 137: p1461-1471. 2010
17. A. Kohn, Y. Dong, A. J. Mirando, A. M. Jesse, T. Honjo, M. J. Zuscik, R. J. O'Keefe and M. J. Hilton, Cartilage-specific RBPjkappa-dependent and -independent Notch signals regulate cartilage and bone development. *Development*. 139: p1198-1212. 2012
18. A. J. Hayes, G. P. Dowthwaite, S. V. Webster and C. W. Archer, The distribution of Notch receptors and their ligands during articular cartilage development. *J.Anat*. 202: p495-502. 2003
19. N. Sassi, L. Laadhar, M. Mahjoub, M. Driss, M. Zitouni, K. Benromdhane, S. Makni and S. Sellami, Expression of Notch family members in cultured murine articular chondrocytes. *Biotech.Histochem*. 84: p313-320. 2009
20. H. Ishii, M. Nakazawa, S. Yoshino, H. Nakamura, K. Nishioka and T. Nakajima, Expression of notch homologues in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Rheumatol.Int*. 21: p10-14. 2001
21. C. Karlsson, C. Brantsing, S. Egell and A. Lindahl, Notch1, Jagged1, and HES5 are abundantly expressed in osteoarthritis. *Cells Tissues Organs*. 188: p287-298. 2008
22. I. Ustunel, A. M. Ozenci, Z. Sahin, O. Ozbey, N. Acar, G. Tanriover, C. Celik-Ozenci and R. Demir, The immunohistochemical localization of notch receptors and ligands in human

- articular cartilage, chondroprogenitor culture and ultrastructural characteristics of these progenitor cells. *Acta Histochem.* 110: p397-407. 2008
23. S. P. Grogan, S. Miyaki, H. Asahara, D. D. D'Lima and M. K. Lotz, Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res.Ther.* 11: pR85. 2009
  24. Y. Hosaka, T. Saito, S. Sugita, T. Hikata, H. Kobayashi, A. Fukai, Y. Taniguchi, M. Hirata, H. Akiyama, U. I. Chung and H. Kawaguchi, Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 110: p1875-1880. 2013
  25. M. Gosset, F. Berenbaum, S. Thirion and C. Jacques, Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat.Protoc.* 3: p1253-1260. 2008
  26. T. Kitamura, New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening. *Int.J.Hematol.* 67: p351-359. 1998
  27. D. Karolchik, G. P. Barber, J. Casper, H. Clawson, M. S. Cline, M. Diekhans, T. R. Dreszer, P. A. Fujita, L. Guruvadoo, M. Haeussler, R. A. Harte, S. Heitner, A. S. Hinrichs, K. Learned, B. T. Lee, C. H. Li, B. J. Raney, B. Rhead, K. R. Rosenbloom, C. A. Sloan, M. L. Speir, A. S. Zweig, D. Haussler, R. M. Kuhn and W. J. Kent, The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Res.* 2013
  28. S. Kamekura, K. Hoshi, T. Shimoaka, U. Chung, H. Chikuda, T. Yamada, M. Uchida, N. Ogata, A. Seichi, K. Nakamura and H. Kawaguchi, Osteoarthritis development in novel

- experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage*. 13: p632-641. 2005
29. K. P. Pritzker, S. Gay, S. A. Jimenez, K. Ostergaard, J. P. Pelletier, P. A. Revell, D. Salter and W. B. van den Berg, Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 14: p13-29. 2006
  30. M. J. Hilton, X. Tu and F. Long, Tamoxifen-inducible gene deletion reveals a distinct cell type associated with trabecular bone, and direct regulation of PTHrP expression and chondrocyte morphology by *Ihh* in growth region cartilage. *Dev.Biol.* 308: p93-105. 2007
  31. A. M. Parfitt, M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott and R. R. Recker, Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J.Bone Miner.Res.* 2: p595-610. 1987
  32. I. Imayoshi, T. Shimogori, T. Ohtsuka and R. Kageyama, *Hes* genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. *Development*. 135: p2531-2541. 2008
  33. H. Akiyama, J. E. Kim, K. Nakashima, G. Balmes, N. Iwai, J. M. Deng, Z. Zhang, J. F. Martin, R. R. Behringer, T. Nakamura and B. de Crombrughe, Osteo-chondroprogenitor cells are derived from *Sox9* expressing precursors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102: p14665-14670. 2005
  34. S. S. Glasson, R. Askew, B. Sheppard, B. Carito, T. Blanchet, H. L. Ma, C. R. Flannery, D. Peluso, K. Kanki, Z. Yang, M. K. Majumdar and E. A. Morris, Deletion of active ADAMTS5

- prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 434: p644-648. 2005
35. H. Stanton, F. M. Rogerson, C. J. East, S. B. Golub, K. E. Lawlor, C. T. Meeker, C. B. Little, K. Last, P. J. Farmer, I. K. Campbell, A. M. Fourie and A. J. Fosang, ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*. 434: p648-652. 2005
  36. I. Imayoshi, M. Sakamoto, M. Yamaguchi, K. Mori and R. Kageyama, Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J.Neurosci*. 30: p3489-3498. 2010
  37. R. Kageyama, T. Ohtsuka and T. Kobayashi, The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development*. 134: p1243-1251. 2007
  38. B. G. Ju, D. Solum, E. J. Song, K. J. Lee, D. W. Rose, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld, Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKKinase II $\delta$ -dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell*. 119: p815-829. 2004
  39. A. Hudmon and H. Schulman, Neuronal CA<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu.Rev.Biochem*. 71: p473-510. 2002
  40. M. J. Taschner, M. Rafigh, F. Lampert, S. Schnaiter and C. Hartmann, Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent kinase II signaling causes skeletal overgrowth and premature chondrocyte maturation. *Dev.Biol*. 317: p132-146. 2008

41. S. Zanotti, A. Smerdel-Ramoya and E. Canalis, HES1 (hairy and enhancer of split 1) is a determinant of bone mass. *J.Biol.Chem.* 286: p2648-2657. 2011
42. Y. Zhang, J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. van Wijnen and G. S. Stein, The Notch-responsive transcription factor Hes-1 attenuates osteocalcin promoter activity in osteoblastic cells. *J.Cell.Biochem.* 108: p651-659. 2009
43. Susan J. Hassed, Graham B. Wiley, Shaofeng Wang, Ji-Yun Lee, Shibo Li, Weihong Xu, Zhizhuang J. Zhao, John J. Mulvihill, James Robertson, James Warner and Patrick M. Gaffney, RBPJ mutations identified in two families affected by Adams-Oliver syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 91: p391-395. 2012
44. C. Karlsson, C. Brantsing, R. Kageyama and A. Lindahl, HES1 and HES5 Are Dispensable for Cartilage and Endochondral Bone Formation. *Cells Tissues Organs.* 2010
45. T. J. Mead and K. E. Yutzey, Notch pathway regulation of chondrocyte differentiation and proliferation during appendicular and axial skeleton development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106: p14420-14425. 2009
46. M. Maldonado and J. Nam, The Role of Changes in Extracellular Matrix of Cartilage in the Presence of Inflammation on the Pathology of Osteoarthritis. *Biomed.Res.Int.* 2013: p284873. 2013
47. S. Ottaviani, K. Tahiri, A. Frazier, Z. N. Hassaine, M. F. Dumontier, W. Baschong, F. Rannou, M. T. Corvol, J. F. Savouret and P. Richette, Hes1, a new target for interleukin 1beta in chondrocytes. *Ann.Rheum.Dis.* 69: p1488-1494. 2010



48. S. Kamekura, Y. Kawasaki, K. Hoshi, T. Shimoaka, H. Chikuda, Z. Maruyama, T. Komori, S. Sato, S. Takeda, G. Karsenty, K. Nakamura, U. I. Chung and H. Kawaguchi, Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum.* 54: p2462-2470. 2006
49. B. G. Ju, D. Solum, E. J. Song, K. J. Lee, D. W. Rose, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld, Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase II $\delta$ -dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell.* 119: p815-829. 2004
50. R. D. Blitzer, T. Wong, R. Nouranifar, R. Iyengar and E. M. Landau, Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 region. *Neuron.* 15: p1403-1414. 1995
51. K. P. Giese, N. B. Fedorov, R. K. Filipkowski and A. J. Silva, Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science.* 279: p870-873. 1998
52. T. Yamauchi, Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol.Pharm.Bull.* 28: p1342-1354. 2005
53. M. J. Taschner, M. Rafigh, F. Lampert, S. Schnaiter and C. Hartmann, Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent kinase II signaling causes skeletal overgrowth and premature chondrocyte maturation. *Dev.Biol.* 317: p132-146. 2008

54. Y. Li, M. J. Ahrens, A. Wu, J. Liu and A. T. Dudley, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity regulates the proliferative potential of growth plate chondrocytes. *Development*. 138: p359-370. 2011
55. A. Shimazaki, M. O. Wright, K. Elliot, D. M. Salter and S. J. Millward-Sadler, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human articular chondrocytes. *Biorheology*. 43: p223-233. 2006
56. M. Sumi, K. Kiuchi, T. Ishikawa, A. Ishii, M. Hagiwara, T. Nagatsu and H. Hidaka, The newly synthesized selective Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 181: p968-975. 1991