

## 論文の内容の要旨

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

### 【要旨】

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学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並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。その過程において軟骨細胞は様々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に至る。この肥大分化最終局面で Matrix metalloproteinase13 (MMP13)を中心とした基質分解酵素が基質を分解し、Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) 等のサイトカインの働きを介して血管新入が促され、その結果軟骨が骨へと置換される。

Notch シグナルは隣接する細胞間に伝わるシグナル伝達経路の一つであり、種々の細胞・臓器の発生、分化などの運命決定に関わる重要な経路である。細胞表面に位置する Delta-like (Dll)、Jagged (Jag) 等のリガンドが隣接する細胞膜に存在する一回膜貫通型受容体 Notch1~4 に結合する事でシグナル伝達を開始される。Notch1~4 の受容体は細胞外ドメインの切り離し (S2 切断)、細胞内ドメイン (以下 ICD) の切り離し (S3 切断) を経て細胞内ドメインが細胞質から核内に移行する。そこで転写因子である Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa j (Rbpj) と結合する。これにより下流の Hes1、Hes5、Hes7、Hey1、Hey2、HeyL などの Hes/Hey ファミリーの発現がおこる。

Notch シグナルと軟骨分化の関係については先行報告がいくつかあるが、総じて初期段階に対しては抑制的に、後期段階については促進的に働く、とするものが大部分である。また、Rbpj が軟骨の後期分化を促進させる効果を持ち、MMP13、VEGFA を誘導する事により軟骨内骨化を促す事を示す先行研究がなされている。これらの研究については、さらに変形性関節症発症の際の軟骨変性についても Rbpj が役割の一端を担っており、そのノックアウトによりマウスでの変形性関節症発症が予防されたという報告もなされている。また、これらの現象を Rbpj の下流で担っているのが転写因子 Hes1 の可能性が高い事も示された。

転写因子 Hes1 については Hes5 と共に軟骨特異的にノックアウトしたマウスでは特に骨軟

骨系の異常な表現型は出現しなかった事が既に報告されている。本研究においては転写因子 Hes1 が変形性関節症発症における軟骨変性に対して果たしている役割を解明する事を目的とした。

まず、発達段階での Hes1 が軟骨系に果たす役割を再度確認するため、*Sox9-Cre* マウスを用いて軟骨前駆細胞特異的に Hes1 をノックアウトした *Sox9-Cre;Hes1<sup>fl/fl</sup>* を作成し、その発達を確認した。これらのマウスは生直後に死亡したが、先行研究の結果と同じく、骨格系の表現型はコントロール群である *Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスと比較して、差は見られなかった。

さらに、これらの遺伝子型間の比較として、四肢下腿を用いて免疫組織学的染色により軟骨分化マーカーである *Col10a1* や *Mmp13* の発現確認を行ったが、こちらについても両間で差は見られなかった。

変形性関節症発症に関して Hes1 の果たす役割を解明する目的で、正常な発達後に軟骨特異的に Hes1 をタモキシフェン誘導性にノックアウトする事が可能な *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスを作成した。こちらのマウスに対して7週齢までの正常な発達成長後に、5連日タモキシフェンを腹腔内投与する事でその時点より軟骨細胞特異的に Hes1 をノックアウトする。8週齢の時点で外科的に膝関節より内側側副靭帯と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、変形性関節症発症を誘導した。マウスは手術後4週あるいは8週で sacrifice して膝関節を回収し、組織学的な検討を行った。

膝関節は Safranin O と Fast Green の二重染色で評価したところ、*Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスではコントロール群である *Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスと比較して変形性関節症発症が抑制される傾向にあった。各種マーカーの免疫組織学的染色を行ったところ、術後4週で *Adamts5*、術後8週で *Mmp13* の発現が *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>;Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスで低下していた。

変形性関節症発症に際して、Hes1 が *Mmp13* や *Adamts5* を誘導して軟骨変性を惹起している可能性が示された。引き続いてこちらの誘導がいかに行われているかのメカニズム解明を行った。

転写因子 Hes1 に対して ChIP シークエンス法を用いて全ゲノムにおける Hes1 の結合領域の網羅的探索を行ったところ、*Mmp13* のゲノム上のイントロン4に当たる部分ならびに *Adamts5* のゲノム上のイントロン7に当たる部分にいずれも高い反応が見られた。こちらの領域をクローニングしてルシフェラーゼアッセイを行ったところいずれも Hes1 の刺激に対する強い応答性が見られた。Hes1 がこれらのゲノムに結合する事により、転写を促進していると考えられた。

Hes1 は本来転写抑制因子としての働きが主であり、本研究のように転写促進因子として働くことは稀であり、先行報告も少ない。今回我々は先行報告の中で Hes1 がカルモジュリン依存性キナーゼである *Camk2* によりリン酸化を受ける事により転写促進因子として働く、というもの

に着目し、そちらの解析を行った。**Camk2**は軟骨分化における生理的役割とし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、軟骨の肥大分化を促進するという報告や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、**Col10a1**等のマーカーの発現が上昇するという報告がなされている。

まず、**Camk2**のアイソフォーム4種( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ )の発現パターンを肋軟骨及び関節軟骨細胞でリアルタイムPCRを用いて調べたところ、 $\delta$ の発現が多く、特に関節軟骨細胞で顕著であった。また、正常関節軟骨及び変形性関節症の変性軟骨で免疫組織学的染色に似る発現確認を行ったところ、双方で**Camk2** $\delta$ が発現している事が確認された。

さらに、レンチウイルスを用いた強制発現実験で、正常型の**Hes1**は軟骨細胞株ATDC5において**Mmp13**、**Adamts5**を誘導したのに対して、**Camk2**のリン酸化ターゲット部位を変異させた変異型**Hes1**では、これらの効果が見られなかった。さらに、正常型**Hes1**、もしくは変異型**Hes1**と常時活性化型**Camk2**を共発現させたところ、正常型**Hes1**では**Mmp13**、**Adamts5**の発現効果が更に促進されたのに対して、変異型**Hes1**ではその効果が見られなかった。

以上の事実より**Hes1**は**Camk2** $\delta$ と共同する事により基質分解酵素**Mmp13**や**Adamts5**を誘導して変形性関節症発症の際の軟骨変性に関わっていると考えられた。