

## 審査の結果の要旨

氏名 杉田 守礼

本研究は転写因子 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。ノックアウトマウスを用いた *in vivo* の解析、ならびにマウス肋軟骨由来の初代培養軟骨細胞、軟骨系細胞株を用いた *in vitro* の解析により、下記の結果を得ている。

1. 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>* マウスを作成し、その骨格発達を観察した。コントロールである *Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスと比較してその骨格発達に異常は見られず、組織学的にも軟骨分化は正常に起こっており、免疫組織化学染色でも軟骨分化の各段階のマーカー分子群の発現に大きな差は見られなかった。
2. 正常な発達後にタモキシフェン誘導性に Hes1 を軟骨細胞特異的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。これらのマウスに対してコントロール群である *Hes1<sup>fl/fl</sup>* マウスとともに7週齢で5連日タモキシフェンを腹腔内投与し、8週齢で膝関節より内側側副靭帯と内側半月を切除する外科的変形性関節症モデルを作成したところ、ノックアウトマウスにおいて変形性関節症の発症が抑制されていた。また、免疫組織学的染色でノックアウトマウスで *Adamts5* と *Mmp13* の発現が抑制されている事が判明した。
3. Hes1 による *Adamts5* と *Mmp13* の転写調節機構を解明するため、ChIP シークエンス法による Hes1 の結合領域の網羅的探索を行ったところ、*Adamts5* のイントロン7、ならびに *Mmp13* のイントロン4に当たる部分にピークが見られ、かつそのゲノム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、その配列には Hes1 に対する強い刺激応答性が見られた。
4. 転写抑制因子としての働きが強い Hes1 が活性因子として働く機構として、先行研究より *Camk2δ* によるリン酸化を考えた。軟骨細胞において *Camk2δ* が *Camk2* サブタイプの中で一番強く発現している事が Realtime PCR で示され、正常軟骨、変性軟骨双方で *Camk2* が発現している事が免疫組織学的染色で示された。レンチウイルスを用いた軟骨細胞株での強制発現で HES1 は ADAMTS5、MMP13 を誘導する事が示されたが、*Camk2* のリン酸化ターゲットを変異させた変異型 HES1 で

はその効果が見られなかった。常時活性型 CAMK2 $\delta$ をこれらの HES1 を強制発現させた細胞に共発現させたところ、正常 HES1 を強制発現させた株では相乗効果が見られたものの、変異型 HES1 ではその効果が見られなかった。

以上、本論文は、軟骨細胞において転写因子 Hes1 が、Camk2 $\delta$ によるリン酸化を受ける事で転写活性因子として Mmp13、Adamts 5 などの軟骨分解に関わる因子を転写誘導し変性性関節症における軟骨破壊を惹起する重要な分子であることを明らかにした。本研究は変形性関節症発症に関わるシグナルネットワーク群の全体像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。