

変形性関節症の新規治療標的分子
T4 deiodinase 2 に関する研究

永瀬 弘之

目次

	項
第1章 序論	
第1節 運動器疾患	1
第2節 関節	1
第3節 変形性関節症の症状と患者数	2
第4節 変形性関節症の治療法	2
第5節 本研究の目的	3
引用文献	4
図表	6
第2章 変形性関節症根本治療標的分子の探索	
第1節 序論	10
第2節 材料と方法	12
第3節 結果	14
第4節 考察	15
第5節 小括	17
引用文献	18
図表	23
第3章 軟骨における Deiodinase 2 の作用解析	
第1節 序論	29
第2節 材料と方法	31
第3節 結果	35
第4節 考察	37
第5節 小括	38
引用文献	39

図表	42
第4章 軟骨特異的 Dio2 トランスジェニックラットの作製	
第1節 序論	50
第2節 材料と方法	52
第3節 結果	54
第4節 考察	55
第5節 小括	56
引用文献	57
図表	59
第5章 軟骨特異的 Dio2 トランスジェニックラットの評価	
第1節 序論	67
第2節 材料と方法	68
第3節 結果	70
第4節 考察	72
第5節 小括	73
引用文献	74
図表	77
第6章 総括	89
公表文献	91
謝辞	92

第1章 序論

第1節 運動器疾患

先進国の平均寿命は延び続けている。中でも日本は、世界にさきがけて高齢社会を迎え、単に寿命を伸ばすだけでなく、心身ともに自立して健康的に生活できる健康寿命を伸ばすことに関心が高まっている。要介護・要支援になる原因として、生活習慣病・認知症とならんで運動器症候群が挙げられる(1)。

「運動器」とは、骨、関節、筋肉、靭帯、神経といった人間のからだの動きを担当する組織・器官のことである。年をとるにつれて、この「運動器」も老化し、いわゆる足腰が弱くなる状態になる。膝の痛みの原因となる変形性膝関節症や、骨が弱くなる骨粗鬆症、脚のしびれの原因となる腰部脊柱管狭窄症、また、骨折などが運動器疾患に含まれる。WHO(世界保健機構)は2000年から10年間で「骨関節の10年」(Bone and Joint Decade)と命名して、「骨と関節に関する病気を10年間で撲滅しよう」とするキャンペーンをおこなった。

第2節 関節

関節は、骨と骨の間の繋ぎ手であるが、生体運動機能の維持のために、極めて重要な役割を果たしている。生体が円滑に運動するためには、関節部分において、生体動作に適合した必要十分な可動性を維持しつつ、かつ安定した支持性が必要とされる。

膝関節は体内で最も大きな関節で、構成する要素は関節軟骨・半月板・関節唇、あるいは靭帯・腱・滑膜、さらには土台となる骨がある。また、筋肉も関節を動かす力源となるなど、種々の組織が複合して働き、関節機能の維持に重要な役割を果たしている(図表1-1)(2)。膝関節は、大腿骨、脛骨、膝蓋骨の3つの骨によって構成され、それぞれの骨は、大腿脛骨関節と膝蓋関節の2種類の関節を形成し、関節包や靭帯により、その安定性が保たれる。

関節軟骨は光沢のある半透明の硝子状組織であり、含まれる繊維の量と質から硝子軟骨に分類される。関節腔内に露出した骨表面を覆い隠すように存在しており、その厚さは5mm程度である。しかし、この厚さで体重の5倍にも及び過重を吸収し、運動時に生じる関節の摩擦を著しく軽減すると共に、機械的なストレスから関節組織を保護する役割を果たす(3,4)。このように、生体にとって必須、かつ高度な機能を保持するにも関わらず、軟骨組織は非常に単純な構造をしている。

関節軟骨は、その大部分が細胞外基質で構成され、唯一の細胞である軟骨細胞は体積として10%以下に過ぎない(図表1-2)。基質中水分がおよそ7割で、他にはⅡ型コラーゲンとプロテオグリカンで主に構成される。プロテオグリカンは、コア蛋白にケラタン硫酸とコンドロイチン硫酸の側鎖が多数結合したアグリカンが大部分で、アグリカンはリンク蛋白を介してヒアルロン酸と結合し、巨大なアグリカン凝集体を作るが、陰性に荷電した硫酸基の側鎖に陽性荷電した水分子がひきつけられ膨張しようとするところを、コラーゲンのネットワーク中に存在するために抑えられることで弾性が生まれる(5,6)。こうした構造により、荷重などの衝撃吸収や円滑な運動が可能になって

いる。

第3節 変形性関節症の症状と患者数

関節が老化することで、運動時の関節機能に障害を生じたり、運動時に関節の痛みをともなうことで日常生活動作（ADL）や生活の質（QOL）の低下をきたすことになる。関節の加齢性変化の機序として、関節軟骨の変性・破壊変化が鍵になる事象であることは間違いないものの、生体運動機能に最も影響を与えるのは痛みである一方、関節軟骨自体には痛みを感じる神経終末はない。

変形性関節症の初期症状は、立ち上がりや歩き始めなど動作を始めるときに関節が痛む程度で、痛みがあってもしばらく休むと良くなる。しかし中期になると、歩行時の痛みがだんだんとれなくなり、正座や階段の昇降などの動作も不自由になる。さらに後期になると、じっとしていても痛むようになり、関節の変形により膝が伸びず、日常生活に大きな支障をきたす。重症例では歩行困難に陥り、人工関節置換術などの処置が必要となるなど、患者の生活の質は著しく損なわれる(7)。

2005年より、わが国の変形性関節症をはじめとする骨関節疾患の基本的疫学指標を明らかにし、その危険因子を同定すること、さらにこれら骨関節疾患の経過・各治療別の経過に影響を及ぼす要因について明らかにすることによって、わが国の要介護予防に資することを目的として、大規模臨床統合データベースの設立が開始された。この一連の研究活動は、ROAD (Research on Osteoarthritis Against Disability)プロジェクトと名付けられた(8,9)。ベースライン調査結果から明らかになってきた疫学情報により、40代から変形性関節症の有病率が上昇し、特に女性で高いことが示された(図表1-3)。ここからわが国の膝変形性関節症患者数(40歳以上)を推定すると、X線で診断される変形性膝関節症の患者数は2,530万人(男性860万人,女性1,670万人)となる。この結果で注意すべき点は、X線変化を認める時点では、関節軟骨の変性摩耗などの病的な変化がすでに進行していることは間違いないにも関わらず、主な症状である痛みについては必ずしも感じている訳ではなく、またいったん痛みをともなった状態であった後に、(進行期であっても)痛みがなくなる場合も少なくない点である。X線上変化を認める変形性関節症潜在患者のうち、男性で1/4、女性で1/3が痛みを伴うことを報告から見積もると、変形性膝関節症の有症状患者数は約800万人となる(8,10,11)。

第4節 変形性関節症の治療法

変形性関節症の疾患そのものの進行を抑制する薬はなく、対症療法として鎮痛薬が使われている(図表1-4)(12)。アメリカ整形外科学会や国際変形性関節症学会などの国際的な推奨においても、主な薬物治療はCOX-2選択的阻害剤を含めた非ステロイド性抗炎症薬である(13)。しかしながら、鎮痛効果が十分でない上に長期間服用による副作用の懸念もあるため、根本的な治療薬の開発が切望されている。なお、近年盛んな宣伝にあおられ、サプリメントとして利用されているコンドロイチン、グルコサミンなどの効果については一定の見解はない(14)。

病状が進んで日常生活に支障をきたすまでになると、患部を骨ごと切除して金属製の人工関節

に入れ替える人工関節置換術が行われる。わが国の近年の人口高齢化にともない、その手術件数は最近の 10 年間で 2 倍に増加し、膝関節で年間約 7 万件行われ、長期の良好な成績が報告されており、健康寿命の延長に寄与するところは大きい (15)。その一方で、頻度は低いですが手術後の合併症として、深部静脈血栓症に続発する肺塞栓、人工関節の感染や、股関節では脱臼を起こすこともあり注意を要する (16)。また、関節可動域の改善が困難なこともあり、歩行時の除痛効果は良好であるが、術者の予想ほどは患者の満足度が低いことも知られてきている (2)。以上のような背景から、非侵襲的な薬剤による治療法の開発が切望されている。

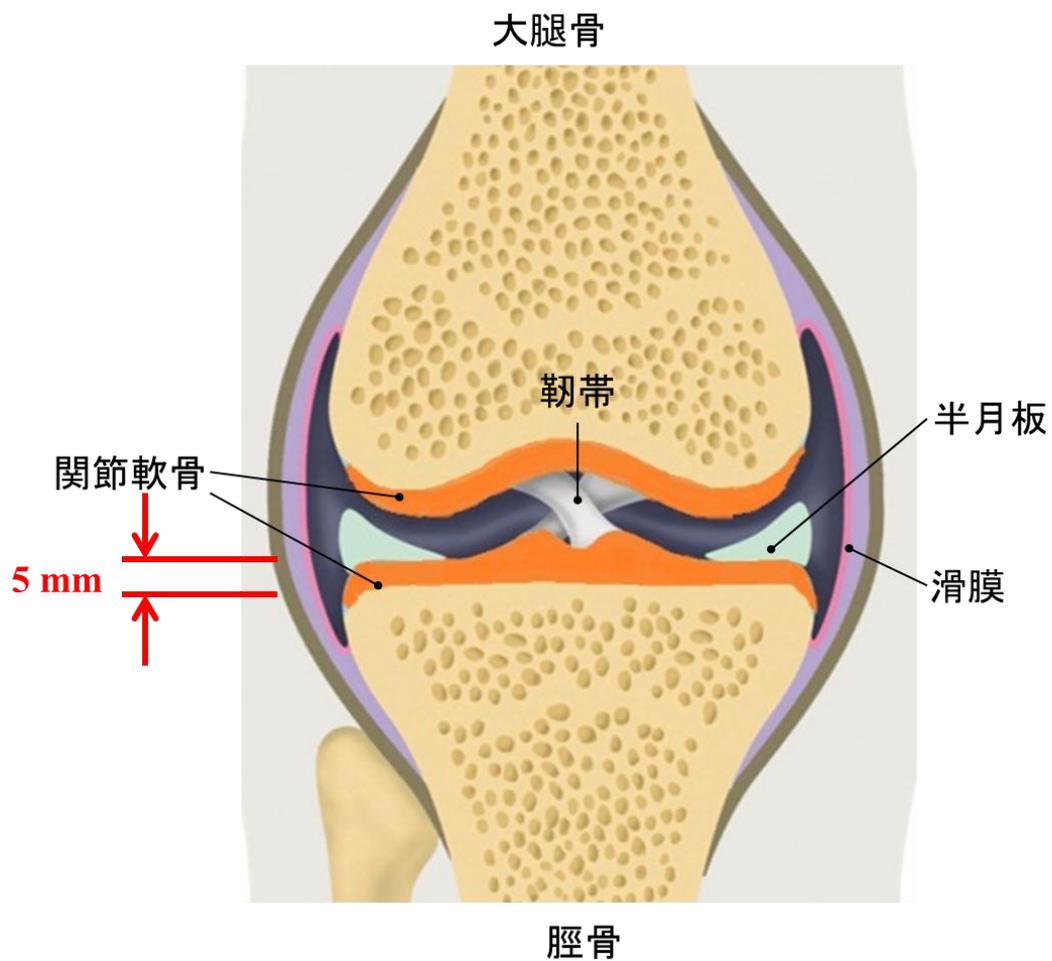
第 5 節 本研究の目的

本研究では、変形性関節症に対する根本的治療薬を開発するため、治療標的分子の探索研究を実施した。第 2 章では変形性膝関節症患者の関節軟骨で発現変動する遺伝子を網羅的に探索し、疾患根本治療薬の標的分子を探索すること、第 3 章では同定した標的遺伝子の軟骨細胞における役割を明らかにすること、第 4 章では標的遺伝子を強制発現させた動物を作製すること、第 5 章では、標的遺伝子を強制発現させた動物の表現系解析およびメカニカルストレスをかけて標的遺伝子の変形性関節症の病態への関与を明らかにすること、以上について検討を行った。

引用文献

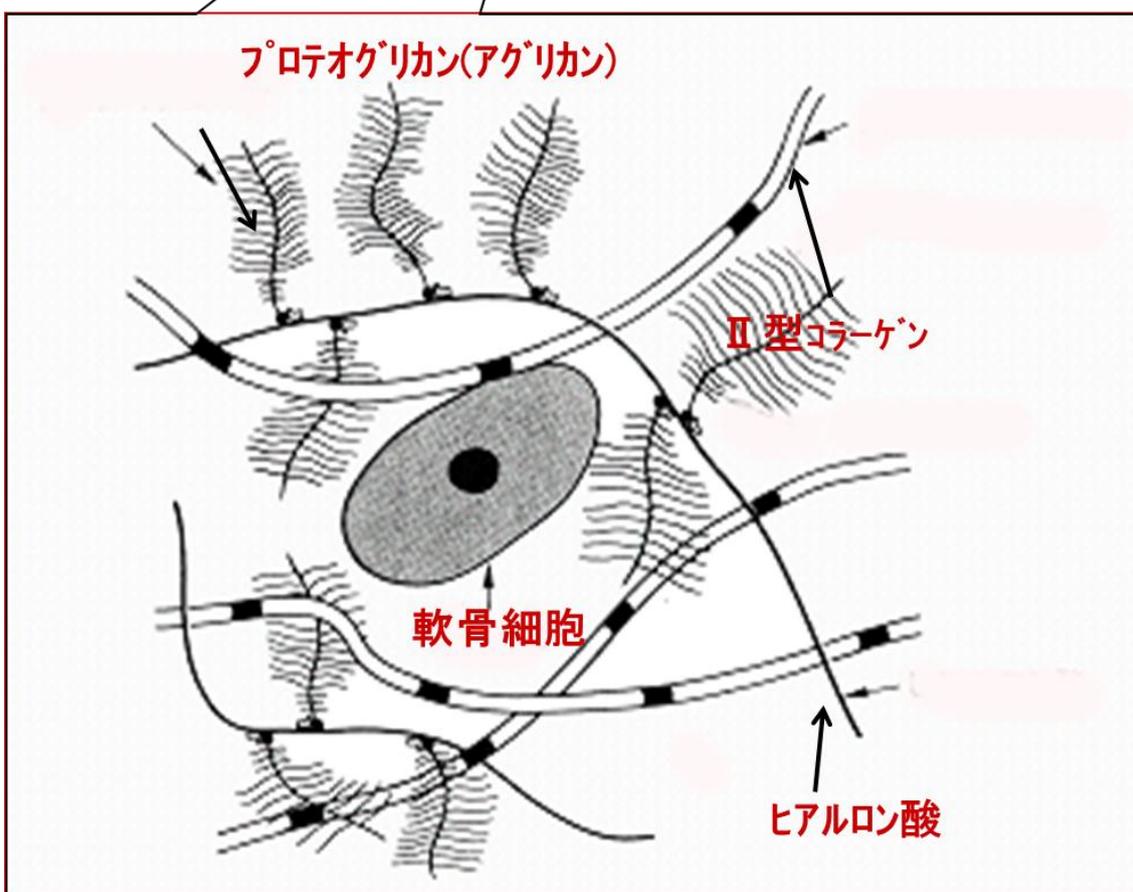
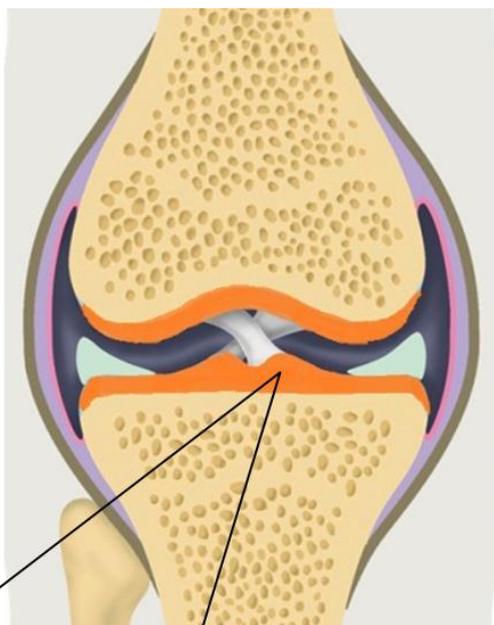
1. 平成 22 年 国民生活基礎調査の概況.
2. Matsui Y, Harada A. [Aging and Bio-motor function. Aging of joint]. *Clinical calcium*. 2013;23(1):15-22.
3. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 2001(391 Suppl):S26-33.
4. Silver FH, Bradica G. Mechanobiology of cartilage: how do internal and external stresses affect mechanochemical transduction and elastic energy storage? *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 2002;1(3):219-238.
5. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*. 1992;6(3):861-870.
6. Vertel BM. The ins and outs of aggrecan. *Trends Cell Biol*. 1995;5(12):458-464.
7. Ando G, Tsukimoto T. [Osteoarthritis of knee joint--standard concept and diagnosis]. *Clinical calcium*. 2002;12(1):47-52.
8. Muraki S, Oka H, Akune T, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Yamamoto S, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N. Prevalence of radiographic lumbar spondylosis and its association with low back pain in elderly subjects of population-based cohorts: the ROAD study. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(9):1401-1406.
9. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Yoshida H, Suzuki T, Yamamoto S, Ishibashi H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2009;27(5):620-628.
10. Muraki S, Oka H, Akune T, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Yamamoto S, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N. Prevalence of radiographic knee osteoarthritis and its association with knee pain in the elderly of Japanese population-based cohorts: the ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(9):1137-1143.
11. Yoshimura N. [Progress of research in osteoarthritis. Epidemiology of osteoarthritis in Japanese population. ~ The ROAD study ~]. *Clinical calcium*. 2009;19(11):1572-1577.
12. Hellio Le Graverand-Gastineau MP. OA clinical trials: current targets and trials for OA. Choosing molecular targets: what have we learned and where we are headed? *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(11):1393-1401.
13. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander

- LS, Tugwell P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(2):137-162.
14. Henrotin Y, Mobasheri A, Marty M. Is there any scientific evidence for the use of glucosamine in the management of human osteoarthritis? *Arthritis Res Ther*. 2012;14(1):201.
 15. Watanabe T, Sekiya I, Muneta T. [Locomotive syndrome and frailty. Total knee arthroplasty supports active life of the elderly]. *Clinical calcium*. 2012;22(4):103-109.
 16. 本川 哲. NHO 共同臨床研究と臨床評価指標(QI) EBM 推進研究 人工関節置換術後の静脈血栓塞栓症の実態と予防に関する臨床研究. 国立病院総合医学会講演抄録集. 2010;64 回:205.



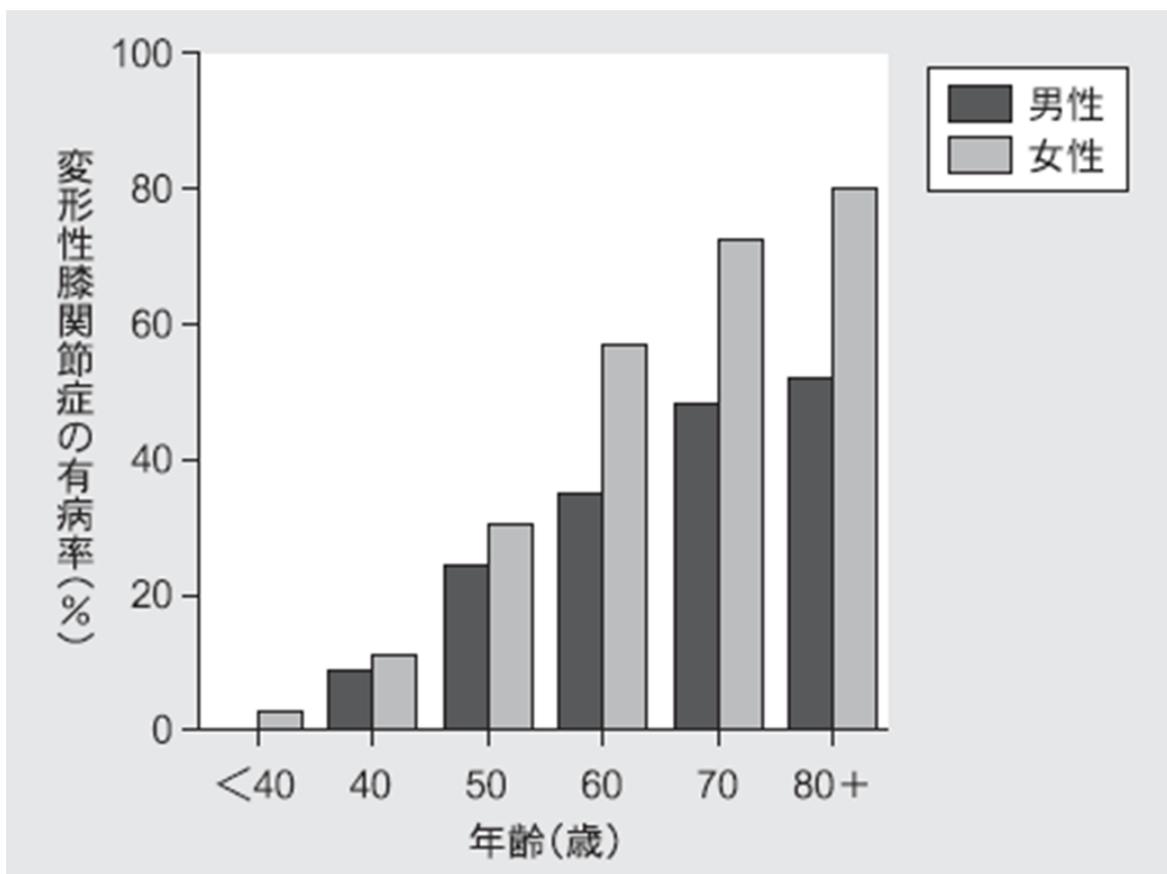
図表 1-1 膝関節模式図

膝関節は、骨の関節側を関節軟骨が覆って骨と骨がぶつからないようにするクッションの役割を果たすと共に、滑らかな表面のお陰でスムーズな関節稼動を可能にする。また、関節軟骨の間は半月板が挟まって、十分なスペースが確保されている。



図表 1-2 膝関節軟骨組織の模式図

関節軟骨は、主にプロテオグリカン、タイプ II コラーゲン、ヒアルロン酸、軟骨細胞から構成される。



Yoshimura N et al., J Bone Miner Metab 2009 (改変)

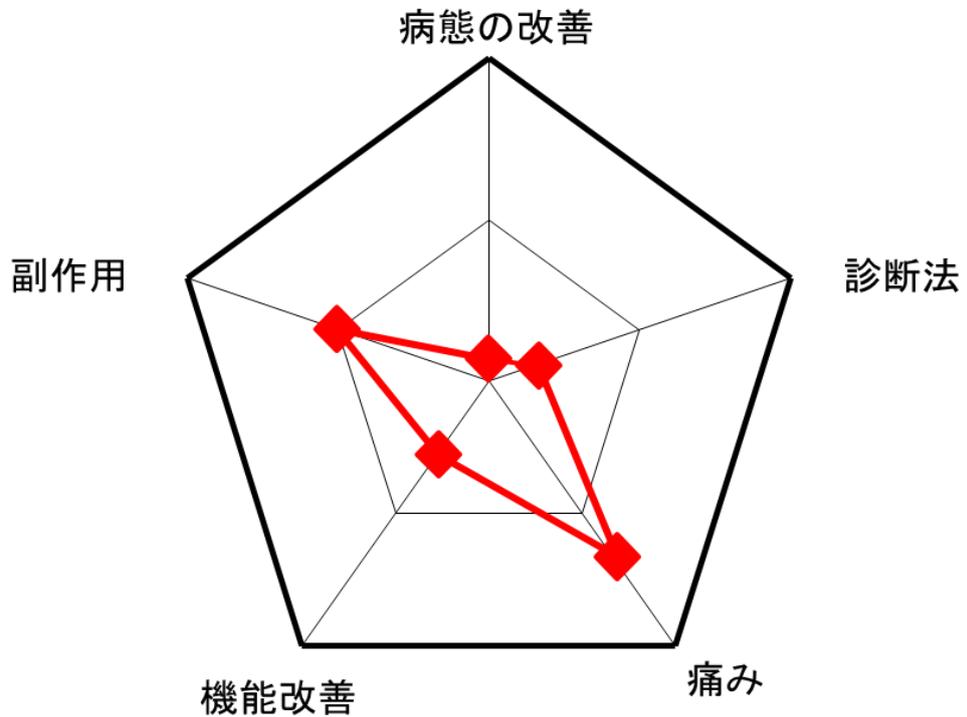
図表 1-3 変形性膝関節の有病率

40代から男女共に症状が出始め、加齢と共に特に女性で多く発症する。

変形性関節症治療薬の売り上げ(2007)



変形性関節症治療薬の治療満足度



図表 1-4 変形性関節症の薬物治療と治療満足度

変形性関節症の根本治療薬はなく、対症療法として鎮痛薬が使われる。しかしながら、鎮痛効果が十分でない。

第2章 変形性関節症根本治療標的分子の探索

第1節 序論

変形性関節症は、高齢者の生活の質を著しく損なう運動器疾患であり、社会の高齢化によってその予防法や根本的な治療法の開発が期待されているが、骨粗鬆症や関節リウマチなど他の運動器疾患と比して根本治療薬の開発が進んでいない(1, 2)。この主な原因として、疾患の治療標的となりうる分子メカニズムがほとんど明らかになっていないことがあげられる(3)。

変形性関節症は遺伝的要因と環境要因の相互作用により発症する多因子遺伝病である(4)。変形性関節症のリスクファクターとしては、体重増加や過度の運動、加齢、遺伝的要因などが挙げられる。

疾患の原因遺伝子を探索する研究方法は大きく分けて3種類ある。1つは、既存の知識、情報をもとにして仮説を立て、それに従ってゲノムの一部を重点的に調べていく候補遺伝子アプローチであり、近年幾つかの疾患感受性遺伝子が同定された(5-7)。2つ目は、既存の知識、情報なしに、遺伝子多型をゲノム上の位置のマーカーとして用いてゲノム全体を相関解析でスクリーニングする全ゲノム相関解析である(8, 9)。これらの方法を変形性関節症の解析に適用する場合の限界として、変形性関節症は環境因子と遺伝因子が相補して発症するにもかかわらず、環境因子を無視して疾患の有無だけによる二群間のゲノム比較を行うことや、客観的・定量的な変形性関節症の診断方法が存在しないこと、さらにはデータベース規模が小さいため詳細で正確なゲノムワイド関連解析が不可能なこと、などがあげられる(10)。3つ目の方法は、マイクロアレイを用いた発現解析である。DNA マイクロアレイは網羅的に発現遺伝子を解析する上で非常に有用なツールであるが、用いられるサンプルの設定などによって結果が大きく変わってしまう。具体的には、患者の背景(人種、性別、年齢、生活習慣、体重、疾患背景)、サンプル数、サンプルクオリティー、対照群の取り方によって大きく結果が変わってくるため注意が必要である。

本研究を始めた2004年当時は、変形性関節症患者のサンプルを用いた遺伝子発現解析は報告がほとんどなく、疾患の治療標的となりうる分子メカニズムの解明には有益なデータとなりうると考えた。そこで本章では、変形性関節症患者の関節軟骨とその他の疾患で亡くなった関節軟骨を用いて、DNA マイクロアレイを行った。

胎生～思春期における軟骨が骨組織に置換されることを内軟骨性骨化という。これは、胎生期に軟骨で作られた骨格が成長に伴って骨組織に置換される現象である。また、ヒトでは思春期まで認められる成長板軟骨の過程でも見られる現象である。細胞レベルの現象を見てみると、①静止軟骨細胞は増殖軟骨細胞へと変わり、②肥大化して細胞死を迎える。③死んだ軟骨細胞は破骨細胞に取り込まれることで消化され、④そこに骨芽細胞が骨基質を分泌して骨を形成する(図表2-1)(11, 12)。

一方、永久軟骨であるはずの関節軟骨においても、軟骨細胞の増殖やタイプ X コラーゲン(COL10A1)発現で示される軟骨細胞の肥大化が見られ、この肥大軟骨細胞から分泌される Matrix

Metalloproteinase-13 (MMP13) や ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5 (ADAMTS5) などのタンパク質分解酵素によって軟骨基質の変性が起こることが変形性関節症の引き金となるということが近年報告され始めている (13, 14)。このメカニズムとして、過度のメカニカルストレスの蓄積に抗しきれなくなって軟骨内骨化が起こるものと推察される。滑膜や靭帯に接して血管の侵入が可能な関節辺縁では軟骨内骨化が起こって力学的要請に応じた骨棘ができるが、関節の内部では血管侵入ができないために骨化することなく軟骨の破壊だけで終わってしまうと考えられる (3, 15)。そこで私は、変形性関節症の発症原因に関節軟骨での内軟骨性骨化様変化が重要だと考えて、これに関与する因子を DNA マイクロアレイで見出すことを目指した。

第2節 材料と方法

1. 試薬

RNA later、滅菌水 (DNase/RNase フリー)、Quant-iT RiboGreen RNA Kit、TaqMan Universal PCR Master Mix、Predesigned または custom TaqMan probe and primer sets は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) から、Isogen、High-Salt Precipitation Solution は ニッポン・ジーン (Tokyo, Japan) から、クロロホルム、イソプロパノール、エタノール は 和光純薬工業 (Osaka, Japan) から、RNeasy MinElute Cleanup Kit は QIAGEN (Venlo, Netherland) から、Agilent RNA 6000 ナノキット は Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) から購入した。

2. 関節軟骨

サンプルは、群馬県立心臓血管センターとの共同研究で入手した。変形性関節症の患者サンプルは、膝関節の人工関節全置換時に手術数時間以内に入手した。実験に用いたサンプルは、関節軟骨の菲薄化や欠損があることを病理医が確認した上で用いた (図表 2-2)。提供者は 62-89 歳の合計 13 名である。非変形性関節症サンプルは、心不全や肺炎および腹膜炎など他の疾患で亡くなった患者さんの剖検時に死後 12 時間以内に入手した。実験に用いたサンプルは、関節軟骨に損傷がないことを病理医が確認した上で用いた。提供者は 60-88 歳の合計 11 名である。全ての提供者より 1 つ、または複数個のサンプルを採取した。関節軟骨の深部まで外科手術用メス (フェザー安全剃刀株式会社、Osaka, Japan) を用いて採取し、速やかに RNA later に漬けて 4°C で 24 時間保存後、使用するまで -80°C に保存した。

全ての実験は、三共㈱および群馬県立心臓血管センターの倫理委員会にて承認されたものである。また、提供を受けた全ての患者および遺族よりインフォームド・コンセントを書面で得た上で使用した。

3. RNA の抽出と精製

採取後 -80°C に保存していたサンプルを解凍後 サンプリングチューブ (ガンマ線滅菌済み, DNase RNase free、ザルスタット) に移し、サンプル 50~100 mg につき、1 mL の Isogen を添加した。氷冷下で眼科ハサミ (夏目製作所, Tokyo, Japan) で細切後、ホモジナイザー (ヒスコトロン、マイクロテック・ニチオン) を用いて破碎した。完全に破碎後、小型冷却遠心機 (Himac CF15-RX II、Hitachi Koki Co., Ltd.、ローターは T15A39) を用いて遠心 (15,000 G, 10 min, 4°C) した。上清のみを新しいサンプリングチューブに移した。Isogen の 1/5 量のクロロホルムを添加して 15 秒程度激しく混和後、2-3 分間室温で静置した。小型冷却遠心機を用いて遠心 (12,000 G, 15 min, 4°C) し、水層のみを新しいサンプリングチューブに移した。水層の 1/2 量の High-salt precipitation solution を添加して軽く混合した後、High-salt precipitation solution と等量のイソプロパノールを添加して転倒混和して約 4 時間氷冷下で静置した。小型冷却遠心機を用いて遠心 (12,000 G, 10 min, 4°C) して上清を捨てた。70 %エタノールを 1 mL 添加し、ボルテックスミキサー (VORTEX-GENIE 2、Scientific

Industries, Inc.) にかけて沈殿が巻き上がったのを目視で確認する。小型冷却遠心機を用いて遠心 (7,500 G, 5 min, 4°C) して上清を捨てた。再び小型冷却遠心機を用いて遠心 (7,500 G, 5 min, 4°C) し、上清をピペッターで丁寧に取り除く。2分程度風乾してエタノールを完全に除いてから、滅菌水 (DNase/RNase フリー) 100 μ L を添加してタッピングにより溶かす。

得られた RNA 溶液は、RNeasy MinElute Cleanup Kit を用いて不純物を取り除いた。溶液中の RNA 濃度は Quant-iT RiboGreen RNA Kit とマルチラベルリーダー (ARVO 1420, PerkinElmer) を用いて測定した。

RNA 約 1 ng 分の溶液を用いて、Agilent RNA 6000 ナノキットおよび Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) を用いて、RNA 濃度測定と精製効率を検討し、分解や不純物の混入がないことを確認した。

4. マイクロアレイ

3 で得られた RNA について、10-100 ng の RNA を 2 ラウンド増幅・逆転写した後、Affymetrix 社 (Santa Clara, CA) の GeneChip Expression Analysis Technical Manual に従ってビオチンラベルした。ラベルしてフラグメント化した 10 μ g の cDNA を GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) にハイブリダイゼーションした (45°C, 16 hr)。上記マニュアルに従って、ハイブリダイゼーション後の染色および洗浄を行い、アレイを GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) でスキャンした。プローブセットのシグナルは Affymetrix MAS5 algorithm を用いて計算した。

5. qPCR

4 で得られた cDNA を用いて、qPCR を行った。TaqMan Universal PCR Master Mix および Predesigned Taqman Probe&Primer set を用いて ABI Prism 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems)により測定した。発現量は、GAPDH により補正した。

6. 統計解析

全てのデータは算術平均値 \pm 95% 信頼区間で表記した。尚、ドナー 1 人から複数のサンプルを採取したものは、その算術平均値を用いた。有意差検定には、SAS, Version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用い、F 検定で分散が等しいものは t 検定、等しくないものは Welch 検定で解析を行った。

第3節 結果

1. 変形性関節症群と剖検群の遺伝子発現変動のクラスタリング

変形性関節症患者より得られたデータと剖検群より得られた各データを横に並べ、縦に遺伝子プローブのシグナル強度をとってクラスタリングし、ヒートマップで表した(図表 2-3)。発現量が高いものを赤で低いものが青で示した。クラスタリングにより、遺伝子発現パターンが両群で明らかに異なることが示された。また、変形性関節症で特徴的に発現変動している遺伝子が多数あることが示された。

2. 既知遺伝子の発現変動を検討

剖検群と比較して2倍以上発現が変動している遺伝子が2000以上見つかった。また、内部標準遺伝子として変形性関節症で発現変動しないことが報告されている幾つかの遺伝子(TBP, RPL13A, B2M)について、発現量を比較した。その結果、報告どおりこれらの遺伝子では発現変動が認められなかった(図表 2-4)。次に、変形性関節症で発現上昇することが報告されている幾つかの遺伝子(MMP9, AQP1, MMP13, COL1A1, ASPN, SPON1, COL2A1)について検討したところ、報告どおり著しい発現上昇が認められた。また、変形性関節症で発現が低下することが報告されている遺伝子(MAOA, SCNN1A, CYP4B1)についても検討したところ、報告どおりの著しい発現低下が認められた。

3. 根本的治療の標的遺伝子の選定

剖検群と比較して2倍以上発現が変動している遺伝子の中から根本的治療の標的遺伝子を選定するため、成長板軟骨での肥大分化への関与が考えられる遺伝子を探索した。その結果、代謝産物である甲状腺ホルモンが成長板軟骨の肥大分化に関わることが報告されている Deiodinase 2 (以下 Dio2) が変形性関節症で大きく発現上昇することに着目した(16-20)。Deiodinase には1-3のファミリーが存在するが、Dio1 は検出限界以下であった。一方、Dio3 は両群間で有意な発現変動が認められなかった(図表 2-5)。

この結果を定量的PCRでも確認したところ、Dio1 は検出限界以下であったが、Dio2 は変形性関節症で10倍以上の発現亢進が確認できた。また、Dio3 についても検討したが、有意な発現変動は認められなかった(図表 2-6)。

第4節 考察

変形性関節症のマイクロアレイ解析は幾つか報告されているが、その検討に用いられるサンプルの種類やサンプル数は多様である(21)。特に、陰性対照としてどのようなサンプルを用いるかは重要であるが、変形性関節症は罹患率が高いため、特に高齢者では非罹患サンプルが入手しにくく、また代表的な整形外科領域の他疾患でも関節軟骨が損傷されるため、非損傷サンプルを正しく陰性対照とすることが結果を大きく左右する。このため、同一人物の関節軟骨の損傷部と非損傷部を比較した試験や、損傷の度合いによりグレード分けして比較する試験なども行われている(22-24)。そこで私の検討では、関節軟骨に損傷がないことを病理医が確認した上で剖検後12時間以内に採取することとした。このサンプルを用いたDNAマイクロアレイデータでは、内部標準遺伝子は変形性関節症で発現変動していなかったことから、今回得られたサンプル及びデータは信頼性が高いことが示された(25)。この理由として、検討に用いたサンプルは、全て同一病院で採取し、ドナー年齢分布も近く、かつ両群共に10名以上の患者から手術後または死後短時間で採取したことが考えられる。次に、変形性関節症で発現変動することが既に報告されている幾つかの遺伝子について、報告どおりの変動が認められたことから、本データは変形性関節症の罹患の有無による遺伝子発現変化を正しく反映できているものと考えられる(23,26-28)。DNAマイクロアレイデータをクラスタリングしたところ、剖検群と変形性関節症群では遺伝子の発現パターンに明確な違いがあり、この中に疾患の発症・進行に関与する因子が含まれているのではないかと考えて、標的遺伝子の選定を行った。

変形性関節症の根本治療を目指して、これまでも幾つかの標的分子が報告されている。変形性関節症の関節軟骨は、形態学的所見や関節液中の細胞外マトリックスフラグメントの解析結果から、アグリカン分解が開始され、次いでコラーゲンの分解により関節軟骨破壊が進み、軟骨組織の荷重抵抗性が消失することが明らかとなっている(29)。これまでの研究により、タイプIIコラーゲンは、MMPと総称される一群のプロテアーゼによって切断されることが明らかとなっている。中でもMMP13は、変形性関節症の病態の重症度と相関して発現量が亢進することや、他のMMPと比較し、5-10倍の効率でタイプIIコラーゲンを分解することから、軟骨破壊において特に重要な役割を果たしていると考えられる(30)。また、アグリカンの重要な分解酵素としてAggrecanase (ADAMTS4, 5) が同定された(30)。アグリカンやコラーゲンなどの軟骨基質タンパクを分解する酵素が変形性関節症に関与することは以前から予想され、研究されてきたが、MMP13やADAMTS5のノックアウトマウスはモデル上で変形性関節症に抵抗性を示すことが報告された(31-33)。さらに、MMP13のトランスジェニックマウスでは、変形性関節症と類似の病変が関節に現れることから、その重要性が注目された(34,35)。しかしながら現状では、MMPおよびADAMTS阻害薬は、変形性関節症に対する明らかな薬理効果を確認するには至っておらず、重篤な骨痛、筋痛、腱鞘炎などの副作用は避けられない(36,37)。従って、変形性関節症根本療法の標的分子としてこれらの酵素の上流シグナルの解明が現在の研究の主流であり、主として3つのシグナルが注目されている。ひとつは、タイプIIコラーゲンやファイブロネクチンなどの基質タンパ

クそのもの、またはその断片が軟骨細胞のそれぞれの受容体に働いて基質の分解を誘導するシグナル (38-40)、2つめは滑膜細胞や軟骨細胞から分泌される炎症性サイトカインシグナル (41)、3つめは今回私が注目した軟骨内骨化シグナルである。最近の報告で、後期変形性関節症の患者では関節軟骨の石灰化が広く認められ、また変形性関節症のスコアやタイプXコラーゲンの発現とも相関することが示された (42)。

様々な根本治療候補因子が報告されているが、根本的な治療薬の開発を目指す上では、その候補因子が創薬標的に適しているかを考える必要がある。変形性関節症は長い時間をかけて病態が進行する上、高齢者に多いことから、長期間服用可能な安全性と経済的・身体的負担の少なさが求められる。こうしたニーズを最も満たすのは経口剤である。経口剤で効果が期待できる創薬標的として代表的なものに、酵素や受容体があげられることから、私は酵素である Dio2 に着目した。Dio2 と変形性関節症の関係性を示す報告としては、初期の変形性関節症と後期の変形性関節症で発現変動する遺伝子を網羅的に探索した検討結果の中で、初期に比べて後期で発現上昇している遺伝子のリストの中に Dio2 も含まれる (23)。また、最近の報告で、Supplemental Figure として掲載された発現変動遺伝子リストの中に Dio2 が含まれていた (43)。これらの報告は、Dio2 が変形性膝関節症で発現変動することに注目した私の研究を強く支持するものである。しかしながら、両報告ともに非常に多くの遺伝子リストの一つに過ぎず、本文中では特に言及されていない。

候補遺伝子アプローチにより Dio2 が変形性股関節症の疾患感受性遺伝子であることが報告された (44-46)。しかしながら、これらの報告は、変形性股関節症のみの検討であり、変形性膝関節症については検討されていない。変形性股関節症と膝関節症は、その原因が大きく異なることが知られている。変形性関節症は原因となる外傷や生まれつきの関節構造の異常がない原因不明の一次性と、骨・関節の形態異常や外傷などによる二次性に分けられるが、日本では股関節症は二次性が80%以上を占める一方、膝関節症は一次性が多数派を占める点があげられる。また、この SNP は同義置換であるため、Dio2 の酵素活性は変化しない (47)。さらに、Dio2 が変形性関節症の発症・進行にどのような影響を及ぼすのかという生物学的意義は示されていない。以上のことから、関節軟骨における Dio2 の役割、および発現上昇と変形性関節症がどのように結びつくかを研究することは極めて重要である。

第5節 小括

ヒトの臨床サンプルを用いて DNA マイクロアレイ解析を実施した。その結果、既報を再現する信頼性の高いデータが得られた。このデータより、変形性膝関節症の関節軟骨では、Dio2 の遺伝子発現が上昇していることを初めて見出した。

引用文献

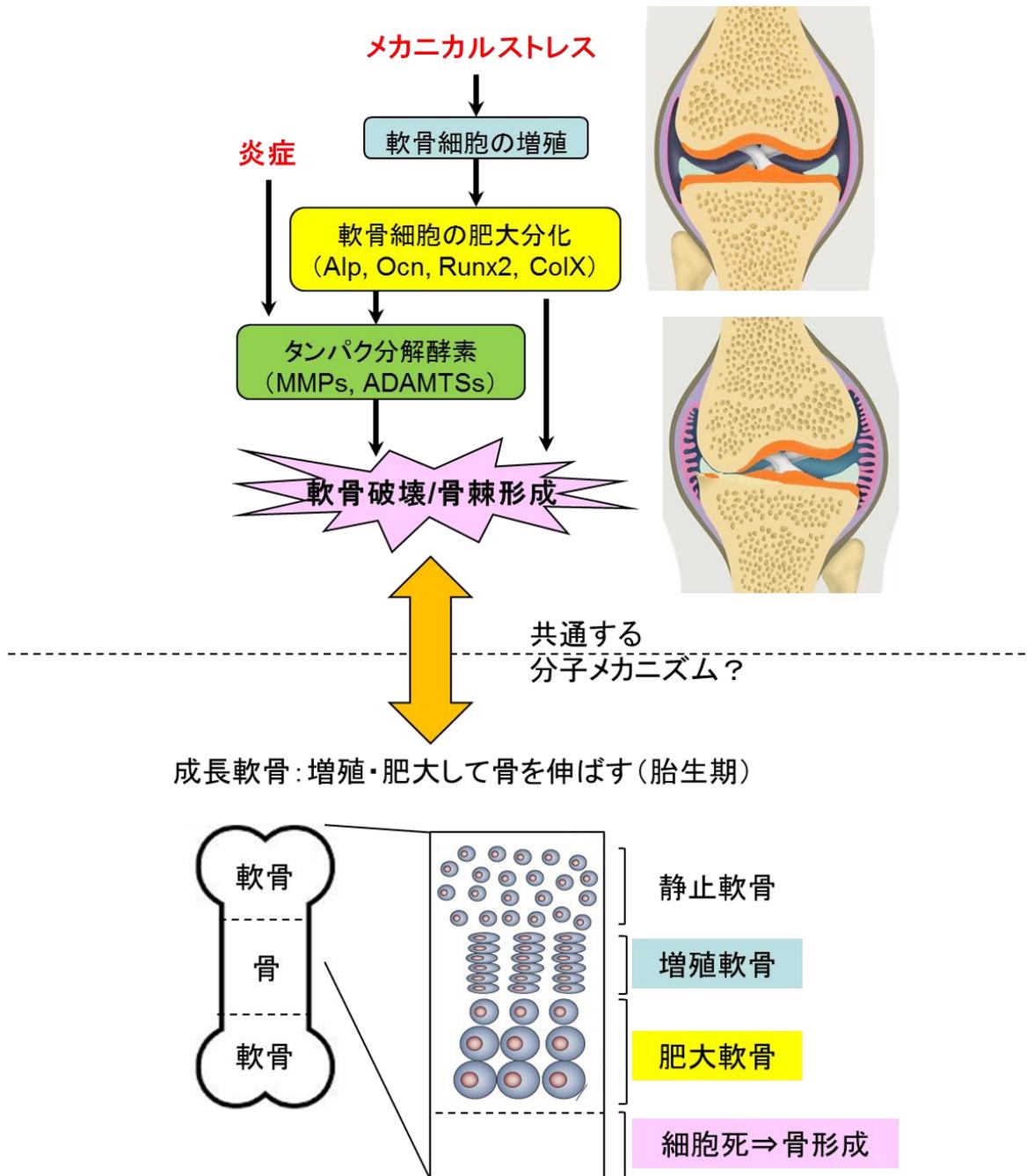
1. Yelin E, Callahan LF. The economic cost and social and psychological impact of musculoskeletal conditions. National Arthritis Data Work Groups. *Arthritis Rheum.* 1995;38(10):1351-1362.
2. Hellio Le Graverand-Gastineau MP. OA clinical trials: current targets and trials for OA. Choosing molecular targets: what have we learned and where we are headed? *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(11):1393-1401.
3. Kawaguchi H. Regulation of osteoarthritis development by Wnt-beta-catenin signaling through the endochondral ossification process. *J Bone Miner Res.* 2009;24(1):8-11.
4. Ikegawa S. New gene associations in osteoarthritis: what do they provide, and where are we going? *Curr Opin Rheumatol.* 2007;19(5):429-434.
5. Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A, Mabuchi A, Kotani A, Kawakami A, Yamamoto S, Uchida A, Nakamura K, Notoya K, Nakamura Y, Ikegawa S. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nature genetics.* 2005;37(2):138-144.
6. Masuya H, Nishida K, Furuichi T, Toki H, Nishimura G, Kawabata H, Yokoyama H, Yoshida A, Tominaga S, Nagano J, Shimizu A, Wakana S, Gondo Y, Noda T, Shiroishi T, Ikegawa S. A novel dominant-negative mutation in Gdf5 generated by ENU mutagenesis impairs joint formation and causes osteoarthritis in mice. *Hum Mol Genet.* 2007;16(19):2366-2375.
7. Miyamoto Y, Shi D, Nakajima M, Ozaki K, Sudo A, Kotani A, Uchida A, Tanaka T, Fukui N, Tsunoda T, Takahashi A, Nakamura Y, Jiang Q, Ikegawa S. Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. *Nature genetics.* 2008;40(8):994-998.
8. Dai J, Ikegawa S. Recent advances in association studies of osteoarthritis susceptibility genes. *Journal of human genetics.* 2010;55(2):77-80.
9. Nakajima M, Takahashi A, Kou I, Rodriguez-Fontenla C, Gomez-Reino JJ, Furuichi T, Dai J, Sudo A, Uchida A, Fukui N, Kubo M, Kamatani N, Tsunoda T, Malizos KN, Tsezou A, Gonzalez A, Nakamura Y, Ikegawa S. New sequence variants in HLA class II/III region associated with susceptibility to knee osteoarthritis identified by genome-wide association study. *PLoS One.* 2010;5(3):e9723.
10. Kawaguchi H. [Mechanism underlying osteoarthritis induced by mechanical stress on joint cartilage]. *Clinical calcium.* 2008;18(9):1278-1286.
11. 憲生 網, 英浩 小. 軟骨の発生・成長・分化 軟骨の分化増殖における形態学的,細胞生物学的知見. *THE BONE.* 1997;11(3):39-52.
12. Pitsillides AA, Beier F. Cartilage biology in osteoarthritis-lessons from developmental biology.

- Nature reviews Rheumatology. 2013;9(2):64.
13. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(7):632-641.
 14. Kuhn K, D'Lima DD, Hashimoto S, Lotz M. Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(1):1-16.
 15. Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells*. 2008;25(1):1-6.
 16. Alini M, Kofsky Y, Wu W, Pidoux I, Poole AR. In serum-free culture thyroid hormones can induce full expression of chondrocyte hypertrophy leading to matrix calcification. *J Bone Miner Res*. 1996;11(1):105-113.
 17. Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, Ozasa A, Nakao K. Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate. *J Bone Miner Res*. 2002;17(3):443-454.
 18. Okubo Y, Reddi AH. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;306(1):186-190.
 19. Wakita R, Izumi T, Itoman M. Thyroid hormone-induced chondrocyte terminal differentiation in rat femur organ culture. *Cell Tissue Res*. 1998;293(2):357-364.
 20. Williams GR, Robson H, Shalet SM. Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth. *J Endocrinol*. 1998;157(3):391-403.
 21. Tardif G, Hum D, Pelletier JP, Boileau C, Ranger P, Martel-Pelletier J. Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2004;50(8):2521-2530.
 22. Fukui N, Miyamoto Y, Nakajima M, Ikeda Y, Hikita A, Furukawa H, Mitomi H, Tanaka N, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Juji T, Mori T, Suzuki R, Ikegawa S. Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*. 2008;58(12):3843-3853.
 23. Ijiri K, Zerbini LF, Peng H, Otu HH, Tsuchimochi K, Otero M, Dragomir C, Walsh N, Bierbaum BE, Mattingly D, van Flandern G, Komiya S, Aigner T, Libermann TA, Goldring MB. Differential expression of GADD45beta in normal and osteoarthritic cartilage: potential role in homeostasis of articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2008;58(7):2075-2087.
 24. Sato T, Konomi K, Yamasaki S, Aratani S, Tsuchimochi K, Yokouchi M, Masuko-Hongo K, Yagishita N, Nakamura H, Komiya S, Beppu M, Aoki H, Nishioka K, Nakajima T.

- Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 2006;54(3):808-817.
25. Pombo-Suarez M, Calaza M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC Mol Biol.* 2008;9:17.
 26. Attur MG, Palmer GD, Al-Mussawir HE, Dave M, Teixeira CC, Rifkin DB, Appleton CT, Beier F, Abramson SB. F-spondin, a neuroregulatory protein, is up-regulated in osteoarthritis and regulates cartilage metabolism via TGF-beta activation. *FASEB J.* 2009;23(1):79-89.
 27. Davidson RK, Waters JG, Kevorkian L, Darrah C, Cooper A, Donell ST, Clark IM. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(4):R124.
 28. Geyer M, Grassel S, Straub RH, Schett G, Dinser R, Grifka J, Gay S, Neumann E, Muller-Ladner U. Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(3):328-335.
 29. Ishiguro N, Ito T, Ito H, Iwata H, Jugessur H, Ionescu M, Poole AR. Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42(1):129-136.
 30. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et biophysica acta.* 2012;1824(1):133-145.
 31. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature.* 2005;434(7033):644-648.
 32. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, Shah M, Thompson EW. Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum.* 2009;60(12):3723-3733.
 33. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, Fourie AM, Fosang AJ. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature.* 2005;434(7033):648-652.
 34. Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, Turner J, Wu W, Billingham C, Meijers T, Poole AR, Babij P, DeGennaro LJ. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest.* 2001;107(1):35-44.
 35. van den Berg WB. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. *Osteoarthritis*

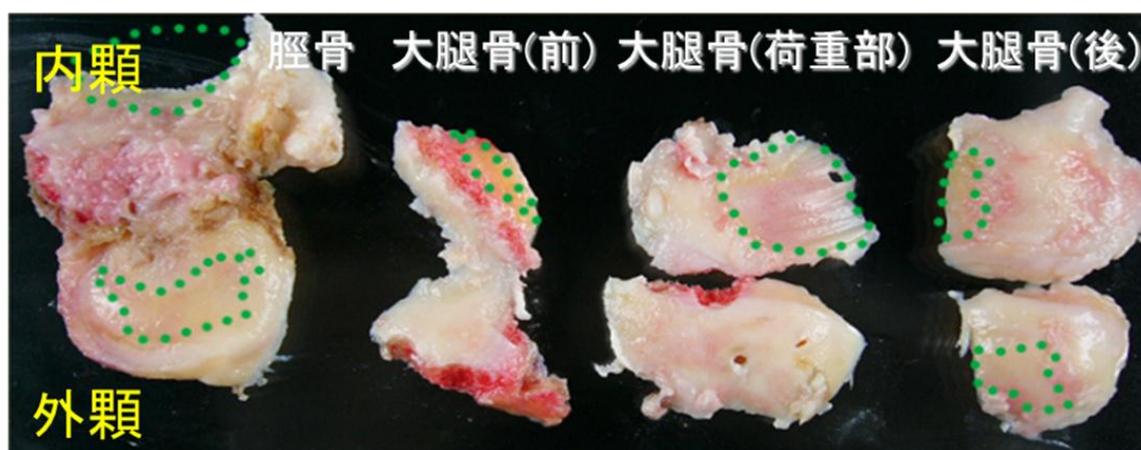
- Cartilage. 2011;19(4):338-341.
36. Burrage PS, Brinckerhoff CE. Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors. *Current drug targets*. 2007;8(2):293-303.
 37. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*. 2006;69(3):562-573.
 38. Li Y, Xu L, Olsen BR. Lessons from genetic forms of osteoarthritis for the pathogenesis of the disease. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(10):1101-1105.
 39. Xu L, Peng H, Glasson S, Lee PL, Hu K, Ijiri K, Olsen BR, Goldring MB, Li Y. Increased expression of the collagen receptor discoidin domain receptor 2 in articular cartilage as a key event in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(8):2663-2673.
 40. Xu L, Peng H, Wu D, Hu K, Goldring MB, Olsen BR, Li Y. Activation of the discoidin domain receptor 2 induces expression of matrix metalloproteinase 13 associated with osteoarthritis in mice. *J Biol Chem*. 2005;280(1):548-555.
 41. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res*. 2002;4(3):157-164.
 42. Fuerst M, Bertrand J, Lammers L, Dreier R, Echtermeyer F, Nitschke Y, Rutsch F, Schafer FK, Niggemeyer O, Steinhagen J, Lohmann CH, Pap T, Ruther W. Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(9):2694-2703.
 43. Karlsson C, Dehne T, Lindahl A, Brittberg M, Pruss A, Sittinger M, Ringe J. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(4):581-592.
 44. Meulenbelt I, Min JL, Bos S, Riyazi N, Houwing-Duistermaat JJ, van der Wijk HJ, Kroon HM, Nakajima M, Ikegawa S, Uitterlinden AG, van Meurs JB, van der Deure WM, Visser TJ, Seymour AB, Lakenberg N, van der Breggen R, Kremer D, van Duijn CM, Kloppenburg M, Loughlin J, Slagboom PE. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet*. 2008;17(12):1867-1875.
 45. Kerkhof HJ, Lories RJ, Meulenbelt I, Jonsdottir I, Valdes AM, Arp P, Ingvarsson T, Jhamai M, Jonsson H, Stolk L, Thorleifsson G, Zhai G, Zhang F, Zhu Y, van der Breggen R, Carr A, Doherty M, Doherty S, Felson DT, Gonzalez A, Halldorsson BV, Hart DJ, Hauksson VB, Hofman A, Ioannidis JP, Kloppenburg M, Lane NE, Loughlin J, Luyten FP, Nevitt MC, Parimi N, Pols HA, Rivadeneira F, Slagboom EP, Styrkarsdottir U, Tsezou A, van de Putte T, Zmuda J, Spector TD, Stefansson K, Uitterlinden AG, van Meurs JB. A genome-wide association study identifies an osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 7q22. *Arthritis Rheum*. 2010;62(2):499-510.

46. Waarsing JH, Kloppenburg M, Slagboom PE, Kroon HM, Houwing-Duistermaat JJ, Weinans H, Meulenbelt I. Osteoarthritis susceptibility genes influence the association between hip morphology and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(5):1349-1354.
47. Canani LH, Capp C, Dora JM, Meyer EL, Wagner MS, Harney JW, Larsen PR, Gross JL, Bianco AC, Maia AL. The type 2 deiodinase A/G (Thr92Ala) polymorphism is associated with decreased enzyme velocity and increased insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2005;90(6):3472-3478.



図表 2-1 変形性膝関節症と内軟骨性骨化

関節軟骨にメカニカルストレスがかかると、軟骨細胞の増殖から肥大分化およびタンパク分解酵素の発現誘導を経て、関節軟骨の破壊と骨棘形成が進行する。同様に、炎症によってもタンパク分解酵素は誘導される。一方、思春期までの成長軟骨では、静止軟骨細胞は増殖軟骨細胞へと変わり、肥大化して細胞死を迎える。死んだ軟骨細胞は破骨細胞に取り込まれることで消化され、そこに骨芽細胞が骨基質を分泌して骨を形成する。



図表 2-2 人工関節置換術の際に得られた変形性膝関節症の関節軟骨

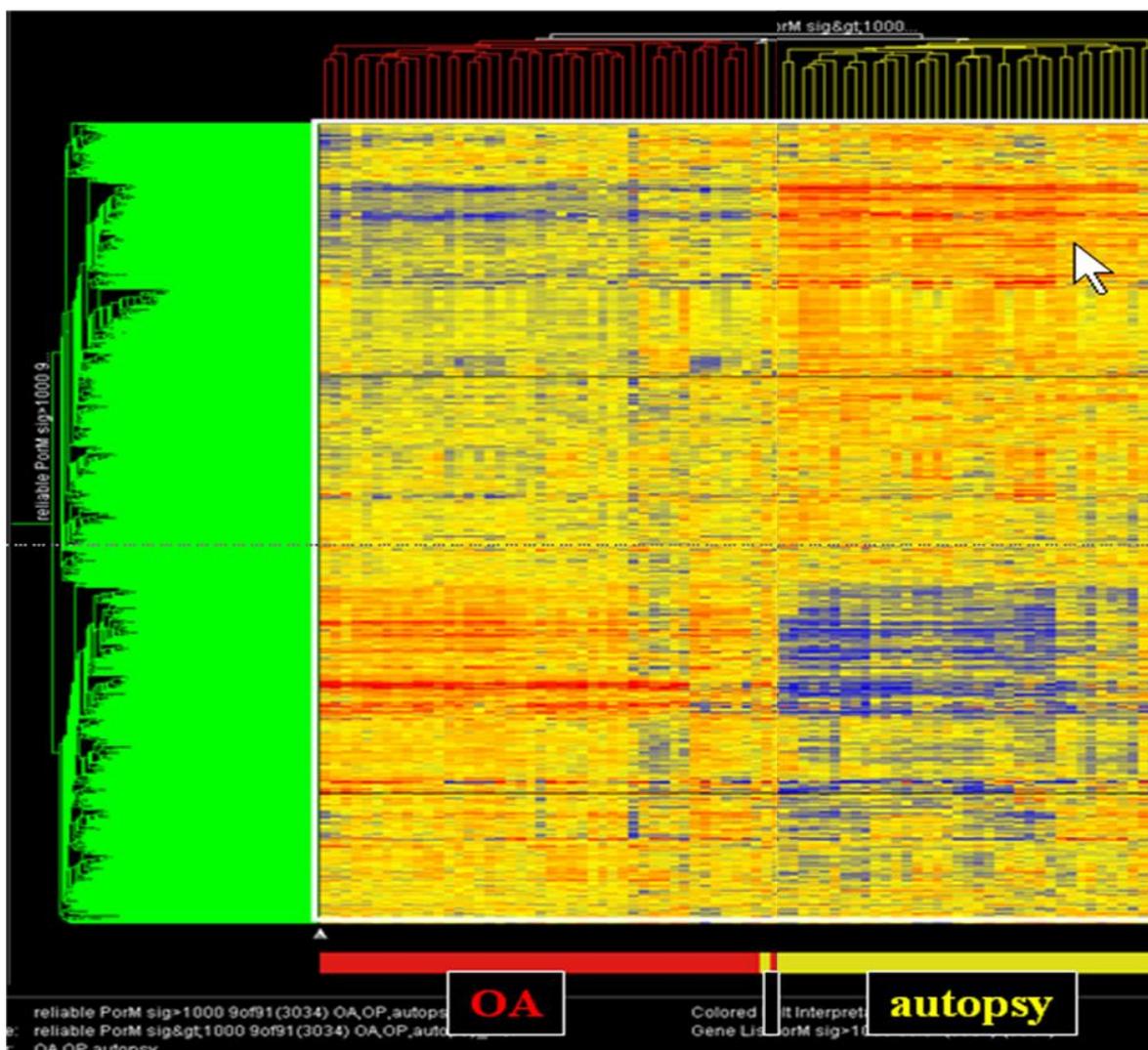
関節軟骨の菲薄化や欠損があることを病理医が確認した上で関節軟骨の深部まで外科手術用メスを用いて採取した。全ての提供者より1つ、または複数個のサンプルを採取した。

変形性膝関節症

13症例
36サンプル

剖検群

11症例
36サンプル



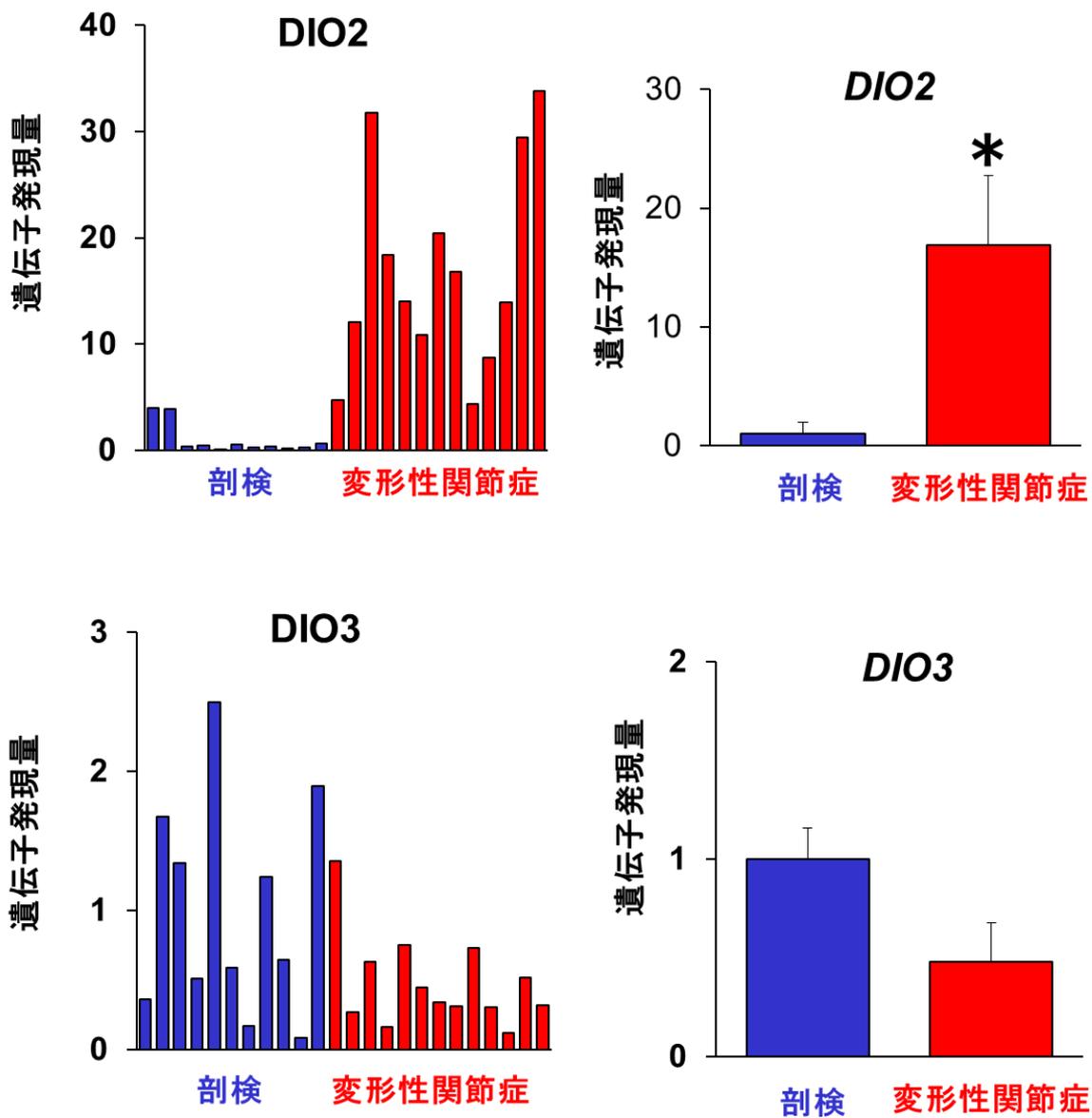
図表 2-3 変形性膝関節症と剖検サンプルのクラスタリング

変形性関節症患者より得られたデータと剖検群より得られた各データを横に並べ、縦に遺伝子プロープのシグナル強度をとってクラスタリングした。

	Probe set ID	Symbol	Control	OA	FC (OAC)
Internal controls	203135_at	TBP	243±26	224±19	0.92
	200716_x_at	RPL13A	7906±1171	7372±414	0.93
	201891_s_at	B2M	7846±877	7426±522	0.95
OA-related genes	203936_s_at	MMP9	24±8	1247±664	51.75
	209047_at	AQP1	42±26	1000±242	24.02
	205959_at	MMP13	20±28	403±205	20.17
	202310_s_at	COL1A1	265±501	3782±1404	14.27
	224396_s_at	ASPN	178±174	1163±340	6.54
	209436_at	SPON1	119±37	658±209	5.54
	217404_s_at	COL2A1	1809±1532	6750±1450	3.73
	204388_s_at	MAOA	278±186	47±32	0.17
	203453_at	SCNN1A	1685±740	149±142	0.09
	210096_at	CYP4B1	238±274	17±21	0.07
	Deiodinases	231240_at	DIO2	116±77	1262±354
207154_at		DIO3	95±39	56±20	0.59

図表 2-4 DNA マイクロアレイ解析

内部標準遺伝子として変形性関節症で発現変動しないことが報告されている幾つかの遺伝子、変形性関節症で発現上昇または低下することが報告されている幾つかの遺伝子、およびDeiodinase の遺伝子発現をリストアップした。



図表 2-6 qPCR により Dio2,3 の発現量を比較

提供者毎の Deiodinase 2, 3 の発現量を定量的 PCR で比較した。剖検群での平均値を算出し、その値を 1 とした相対値を算出した。

第3章 軟骨における Deiodinase 2 の作用解析

第1節 序論

Dio2 の代謝産物である甲状腺ホルモンは、成長板において成長板軟骨細胞を肥大化させることで骨格の成熟化を促進することが知られている。また、甲状腺機能低下症や亢進症により、低身長等の骨格異形成が起こることや、骨関節症を呈することが知られている(1, 2)。また、成長板での Dio2 発現は発生期のみ限定され、生後は認められないことも報告されている(3-7)。このように、成長板における甲状腺ホルモンの作用については研究が行われているが、関節軟骨に対する作用については研究が進んでいない。

甲状腺ホルモンは、甲状腺の甲状腺濾胞の壁をつくっている濾胞上皮細胞で合成・分泌され、全身の細胞に作用して細胞の代謝率を上昇させる働きをもつ。トリヨードサイロニン(以下 T3)とサイロキシン(以下 T4)の2種類が甲状腺ホルモンとして知られる。甲状腺で生合成される甲状腺ホルモンの約80%は T4 であり、前駆ホルモンと考えられている。血液中に放出された T3 は速やかに組織へ取り込まれる、一方、T4 はサイロキシン結合グロブリンに結合し、血液中を末梢へと輸送される(8)。T3 と T4 は脂溶性ホルモンであり、細胞膜を貫通しやすく多くは受動的に細胞内に取り込まれる。近年、幾つかのトランスポーターも同定され、能動的な輸送経路も明らかとなってきている。

T4 の5'のヨードを取り除く反応は Dio1 及び Dio2 によって行われ、血中の T4 は主に肝臓や腎臓において活性型ホルモンである T3 に転換される。ヒトの体内に存在する T3 の約80%は甲状腺で直接生合成されるものではなく、T4 から Dio1 および Dio2 を介して産生される(9)。T4 から主に Dio3 によって産生される3,3',5'トリヨードサイロニン(reverse T3)にはホルモン活性がなく、また速やかに分解されて血中から消失する。T4 の残りの20%は他の経路で代謝される。血中から各臓器に移行した T4 は、細胞内に移行した後、小胞体に局在する Dio2 によって T3 に変換される。以上のような特徴から、甲状腺ホルモンの活性化と不活化を制御する Dio1-3 の発現が生理的な甲状腺ホルモン作用の中心的な役割を担っていると近年では考えられている(10, 11)。

Deiodinase 2 および3の発現は、時間的および組織特異的に変動し、血中の甲状腺ホルモン量が一定であっても、T3 の作用は各臓器や細胞毎に異なることが知られている(12)。それぞれに発現分布が異なり、Dio1 は肝臓や腎臓で発現が高い一方、Dio2 は褐色脂肪や脳・子宮で発現が高く、Dio3 は子宮や脳で発現が高いことが知られている。しかしこれまでの検討では、関節軟骨での発現は、十分に検討されてこなかった。

甲状腺ホルモンの作用は、甲状腺ホルモン受容体を介して起こると考えられている。甲状腺ホルモン受容体は、全身のほとんどの細胞に発現しており、事実上、甲状腺ホルモンの標的器官は全身のすべての細胞といえる。甲状腺ホルモン受容体は核内受容体であり、ホルモンと受容体が結合すると、その複合体は核内 DNA に結合し、特定の RNA の転写活性を調節する。甲状腺ホルモンの作用により、全身の各細胞では呼吸量、エネルギー産生量が増大する。全身の細胞での基礎代謝

量の維持または促進が起こる。

正常な関節軟骨では、軟骨細胞は無血管・低酸素環境の中で代謝活性の低い状態で生存している。恒常状態では、軟骨細胞はその表現型をかえることなく、基質の改変のスピードは非常にゆっくりである。しかしながら、変形性関節症では、タイプ X コラーゲンの発現を特徴とした、肥大軟骨細胞への表現型の変化が認められる (13)。マウスの変形性関節症実験モデルの関節軟骨の経時的な観察から、変形性関節症の初期にタイプ X コラーゲン発現で示される軟骨細胞の肥大化が見られ、軟骨肥大化に必須の転写因子である Runx2 がタイプ X コラーゲンと共に発現することを示している (14-16)。この肥大軟骨細胞から分泌される MMP13 や ADAMTS5 などのタンパク質分解酵素によって軟骨基質の変性が起こることが、変形性関節症の引き金となると報告されている (17)。また、成長板軟骨での研究により、肥大軟骨細胞では MMP13 以外にも様々な MMPs の発現が亢進することも報告されている (18-20)。

変形性関節症の病態に炎症がどのくらい関与しているかは、いまだに明らかとなっていない。しかしながら、変形性関節症の患部において、活性化した B リンパ球や T リンパ球が浸潤した滑膜炎がしばしば認められる (21)。変形性関節症では、軟骨細胞が種々のサイトカインやケモカインを産生したり、それに反応して細胞外基質の分解を引き起こしたりする (22)。変形性関節症で炎症性サイトカインが産生されるメカニズムはよく分かっていないが、過度のメカニカルストレスがその原因の一つとしてあげられる (23)。また、タイプ 2 コラーゲンやファイブロネクチンなどの細胞外基質がメカニカルストレスや基質分解酵素によって分断されると、その断片が炎症性サイトカインの発現を誘導する (24, 25)。そこで私は、生理的および炎症時の関節軟骨での Dio2 の作用を解析した。

第2節 材料と方法

1. 試薬

T3、T4、ヒアルロニダーゼ、Bovine serum albumin (BSA) はSigma-Aldrich (St. Louis, MO)から、リコンビナントinterleukin-1 α (IL-1 α)はPromokine (Heidelberg, Germany)から、イソフルラン (フォーレン吸入麻酔液) はアボットジャパン (Tokyo, Japan) より、Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines (DPBS)、High-glucose Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)、Fetal bovine serum(FBS)、Antibiotic-Antimycotic, 100X (10,000 U/mLペニシリン、10 mg/mL ストレプトマイシン/25 μ g/mL アンホテリシンB) (AA)、0.25% Trypsin-EDTA、Quant-iT RiboGreen RNA Kit、Quant-iT PiboGreen DNA Kit、TaqMan Universal PCR Master Mix、Predesignedまたは custom TaqMan probe and primer sets、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit、pcDNA6.2 vector、pcDNA Gateway Directional Topo Expression Kit、One Shot Top10 Competent CellはLife Technologies (Carlsbad, CA, USA) から、Tris・MgCl₂、塩化マグネシウム、Triton X-100、コラゲナーゼ、p-nitrophenylphosphate hexahydrate (pNP-PO₄)、polyoxyethylene (9) Octylphenyl Ether (NP-40)、6N 水酸化ナトリウム、10%中性緩衝ホルマリン、クロロホルム、エタノール、イソプロパノールは和光純薬工業 (Osaka, Japan)から、プロナーゼはRoche Applied Science (Indianapolis, IN, USA)から、セルバンカーは三菱化学メディエンス (Tokyo, Japan) より、2,2',-イミノジエタノールは国産化学 (Tokyo, Japan) から、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit、TaqMan Gene Expression Cells-to-CT KitはApplied Biosystems (Foster City, CA) から、KOD-Plus-Ver.2は東洋紡 (Osaka, Japan) から、Quick Gel Extraction Kit、QIAprep Spin Miniprep KitはQiagenから、抗タイプXコラーゲンラット抗体はLSL(Tokyo, Japan) およびコントロールラットIgGはコスモバイオ (Tokyo, Japan) から、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ラットIgGヤギ抗体はDako (Glostrup, Denmark) からは購入した。

2. 動物

5-7週齢のSD雄性ラットを日本エスエルシー(株) (Shizuoka, Japan) から購入し、コンベンショナルまたはSPF環境で12時間の明暗サイクル、餌と水は随時摂取が可能な条件下で飼育した。すべての動物実験は、三共(株)あるいは第一三共(株)の実験動物倫理委員会にて承認されたものである。

3. 各臓器からRNA精製

10週齢のラットをイソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈の切除により放血してから頸椎脱臼により安楽殺した。各種臓器をハサミおよび外科手術用メス No.15 (フェザー安全剃刀株式会社, Osaka, Japan) を用いて単離後、数箇所から組織片を採取してPBSで洗浄した。サンプルをサンプリングチューブ (ガンマ線滅菌済み, DNase RNase free、ザルスタット) に移し、サンプル50~100 mgにつき、1 mLのIsogenを添加した。関節軟骨は、第2章のヒトサンプルと同様の方法でRNAを抽出・精製し、他の臓器由来サンプルは、以下の方法でRNAを抽出した。氷冷下で眼科ハサミで細切後、ホモジナイザー (ヒスコトロン、マイクロテック・ニチオン) を用いて破碎した。

完全に破碎後、小型冷却遠心機 (Himac CF15-RX II、Hitachi Koki Co.,Ltd.、ローターは T15A39) を用いて遠心 (15,000 G, 10 min, 4°C) し、上清のみを新しいサンプリングチューブに移した。Isogen の 1/5 量のクロロホルムを添加して 15 秒程度激しく混和後、2-3 分間室温で静置した。小型冷却遠心機を用いて遠心 (12,000 G, 15 min, 4°C) し、水層のみを新しいサンプリングチューブに移した。水層と等量のイソプロパノールを添加して転倒混和した後に約 15 分間室温で静止した。小型冷却遠心機を用いて遠心 (12,000 G, 10 min, 4°C) して上清を捨てた。70%エタノールを 1 mL 添加し、ボルテックスミキサー (VORTEX-GENIE 2、Scientific Industries, Inc.) にかけて沈殿が巻き上がったのを目視で確認した。小型冷却遠心機を用いて遠心 (7,500 G, 5 min, 4°C) して上清を捨てた。再び小型冷却遠心機を用いて遠心 (7,500 G, 5 min, 4°C) し、上清をピペッターで丁寧に取り除く。2 分程度風乾してエタノールを完全に除いてから、滅菌水 (DNase/RNase フリー) 100 μ L を添加してタッピングにより溶かした。

4. 培養用軟骨組織の単離

8 週齢のラットを二酸化炭素により安楽殺し、後肢を 70%エタノールで消毒してから皮膚をハサミで切除する。膝関節腔を開けずに両足膝関節を摘出する。無菌条件下で関節腔を開いて脛骨と大腿骨に分け、滅菌 PBS でよく洗った後、脛骨関節軟骨、大腿骨軟骨表面および滑車部の関節軟骨を外科手術用メス No.15 で削り、1 本の足につき 1 mL の無血清培地に浸ける (24 well plate (BD, Franklin Lakes, NJ, USA))。軟骨片は、AA を予め添加した DMEM で 3 回 wash した。組織培養に用いる組織は、削り出しによる影響を考慮して 37°C、5%CO₂ 条件下で 10% FBS 含有 AA 添加 DMEM で 1 日間培養した後に、AA 添加 DMEM に交換してさらに 1 日培養してから実験に供した。

5. 軟骨細胞の単離

採取した軟骨組織を 70%エタノールで消毒したまな板に載せ、同様に消毒したピンセットおよびメスを用いて、軟骨片を完全に細片化した。湿重量を測定し、10cm シャーレ 1 枚あたり約 2 g の軟骨片を量り取り、濾過滅菌 (Millex Syringe-driven Filter Unit 0.22 μ m PVDF, Millipore, Darmstadt, Germany) したプロナーゼ溶液 (1%(w/v)プロナーゼ、AA 添加 DMEM) を添加し、37°C、5%CO₂ 条件下で振とうしながら 1 時間酵素処理を行って結合組織を除いた。プロナーゼ溶液を吸引廃棄後、濾過滅菌したコラゲナーゼ溶液 (0.4%(w/v)コラゲナーゼ、AA 添加 DMEM) を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で振とうしながら 3 時間酵素処理を行って細胞外基質を消化した。途中、物理的に軟骨片をほぐすために、ピペティングを数回行った。70 μ m セルストレイナー (BD) で細胞懸濁液を濾過して未消化の軟骨片を取り除いてから、10% FBS 含有 AA 添加 DMEM を加えて酵素反応を停止させた。得られた細胞懸濁液は、遠心操作 (24°C, 1000 rpm, 5min) により 10% FBS 含有 AA 添加 DMEM で 3 回洗浄し、細胞数を測定した。1 \times 10⁵ cells/cm² となるように、I 型コラーゲンコートプレート (Iwaki, Tokyo, Japan) に細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 条件下で 10% FBS 含有 AA 添加 DMEM で 1 日間培養した。0.25% Trypsin-EDTA 処理にて細胞の回収および細胞数の測定を行い、

直ちにセルバンカーを用いて、 $2\sim 3 \times 10^7$ cells/mL の細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液をセラムチューブ (SUMIRON, Osaka, Japan) に分注後、凍結処理容器 (バイセル, Nihon Freezer, Tokyo, Japan) に封入し、 -80°C で緩速凍結させた。完全凍結後にセラムチューブを液体窒素に移し、使用時まで凍結保存した。

凍結保存したラット膝関節軟骨細胞を 37°C の温浴中にて解凍し、10% FBS 含有 AA 添加 DMEM で洗浄後、細胞数を測定した。同培地にて細胞懸濁液を作成後、I 型コラーゲンでコート下 96well プレート (Iwaki) に $1\text{-}2 \times 10^5$ cells/cm² となるように細胞を播種し、 37°C 、5%CO₂ 条件下で前培養を行った。培養開始 24 時間後に、培地を吸引廃棄し、血清不含 AA 添加 DMEM で細胞を洗った後に 37°C 、5%CO₂ 条件下で実験に供した。

6. アルカリフォスファターゼ(ALP)活性測定

細胞を T3 または T4 を添加した血清不含 AA 添加 DMEM に交換して 37°C 、5%CO₂ 条件下で培養を行い、3 日目に培地交換を行った。T3 または T4 添加 6 日目に培地を除去して細胞を DPBS で 2 回洗った後、Lysis Buffer (10 mM Tris、1 mg MgCl₂、0.5% (v/v) Triton X-100、pH 10) を $50\ \mu\text{L}/\text{well}$ 加えて 20 分間プレートミキサーにかけて細胞を溶解させた。

ALP 活性は、スタンダードを作成後、スタンダードおよび細胞溶解液 $5\ \mu\text{L}$ を 96well plate(Iwaki) に移し、50 mM Diethanol amine HCl (pH 10.0) を $100\ \mu\text{L}/\text{well}$ 、30 mM p-Nitrophenyl phosphate を $50\ \mu\text{L}/\text{well}$ 加えて軽く攪拌した後、 37°C 、0.5~2 時間インキュベートした。1N 水酸化ナトリウムを $50\ \mu\text{L}/\text{well}$ 加えて反応を止め、405nm の吸光度を測定した。また、細胞溶解液 $5\ \mu\text{L}$ を蛍光測定用の白色プレート (Corning) に移し、Quant-iT PiboGreen DNA Kit を用いて DNA 濃度を測定した。以上により得られた値から、DNA 量あたりの ALP 活性を算出した。

7. 軟骨細胞の遺伝子発現評価

細胞を T3 または IL-1 α を添加した血清不含 AA 添加 DMEM に交換して 37°C 、5%CO₂ 条件下で 24 時間培養を行った。上清を吸引廃棄して DPBS で細胞を洗った後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit および PCR(FeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems)を用いて cDNA を作製した。得られた cDNA は、TaqMan Universal PCR Master Mix および Predesigned Taqman Probe&Primer set を用いて ABI Prism 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems)により測定した。発現量は、 β Actin 量により補正した。

8. 膝関節軟骨の組織培養および組織学的評価

4 で培養した膝関節軟骨の培養上清を T3 添加血清不含 AA 添加 DMEM に交換して 37°C 、5%CO₂ 条件下で培養した。培地は 2 日毎に新しいものに交換し、T3 刺激開始 3, 5, 7 日目に組織片を回収して第 2 章のヒトサンプルと同様の方法で RNA を抽出・精製した。また、培養 7 日目のサンプルを氷冷下で 10% 中性緩衝ホルマリンに漬けて 4°C で数日かけて固定した。10% EDTA (pH 7.4) で

脱灰した後、エタノールで脱水し、パラフィン包埋した。クライオスタットで薄切した後に、hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行った。さらに、以前の報告を参考に、免疫染色を行った(26)。切片は、0.3%過酸化水素含有 PBS で室温 30 分間処理し、細胞外マトリックスの透過性を亢進させるため、2.5% ヒアルロニダーゼで 37°C, 30 分間処理した。1% BSA 含有 PBS で室温, 1 時間処理した後、100 倍希釈した抗タイプ X コラーゲン抗体またはコントロール IgG で 4°C, 24 時間反応させた。PBS で洗浄した後、HRP 標識二次抗体で室温, 20 分間反応させた。PBS で洗浄してからジアミノベンジジン溶液で発色した。スライドは、BZ-9000 BIOREVO (Keyence, Osaka, Japan) により撮影した。

9. 組織より抽出した RNA の定量および逆転写反応

抽出した RNA 溶液中の RNA 濃度は、Quant-iT RiboGreen RNA Kit とマルチラベルリーダー (ARVO) を用いて測定した。RNA はサンプル間の濃度を揃えてから High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit により PCR を用いて cDNA にした。得られた cDNA は、TaqMan Universal PCR Master Mix および Predesigned Taqman Probe&Primer set を用いて ABI Prism 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems) により測定した。発現量は、 β Actin 量により補正した。

10. 絶対定量 PCR

Rat deiodinase 1-3 cDNA は、滑膜および甲状腺より抽出および逆転写して得られた cDNA を鋳型として取得した。PCR は、Invitrogen 社で合成したプライマーおよび KOD-Plus-Ver.2 を使用した。増幅した cDNA を泳動し、目的のバンドのみ切り出して QIAquick Gel Extraction Kit を用いて溶出した。pcDNA Gateway Directional Topo Expression Kit を用いて発現ベクターに寄せ換え、One Shot Top10 Competent Cell に導入してアンピシリン含有培地で培養し、シングルコロニーをピックアップした。QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミドを精製し、シークエンスにより目的とするプラスミドの取得を確認した。

Quant-iT RiboGreen DNA Kit によりプラスミド DNA 濃度を測定すると共に、プラスミド中の配列に対応する Custom Taqman Probe&Primer set の作製を Applied Biosystems 社に依頼した。各プラスミドをスタンダードとして使い、8 で得られた各臓器の cDNA 中の Dio1-3 濃度を TaqMan Universal PCR Master Mix および Custom Taqman Probe&Primer set を用いて ABI Prism 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems) により測定した。

11. 統計解析

有意差検定には、SAS, Version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使い、F 検定で分散が等しいものは t 検定、等しくないものは Welch 検定で解析を行った。

第3節 結果

1. 関節軟骨での Deiodinase 発現比較

8週齢のラット膝関節軟骨における Dio1-3 の発現量を Total RNA 量あたりのコピー数で比較した。Dio1 および 3 は非常に僅かな発現しか認められなかった一方、Dio2 は、Dio1 や 3 よりもはるかに発現量が高い (図表 3-2)。この結果から、関節軟骨においては Dio1 による T3 産生や Dio3 による分解よりも、Dio2 による T3 産生が細胞内 T3 濃度に影響が大きいと考えられる。さらに、Dio2 が発現上昇している変形性関節症患者関節軟骨では、細胞内の T3 濃度が顕著に上昇することが推測される。

また、成長に伴って発現が変動する可能性を考え、8週齢と 30週齢のラットで Dio2 発現量を比較したが、有意な差は認められなかった (図表 3-2)。

2. 各種組織における Dio2 発現量の比較

各種臓器での Dio2 量を Total RNA 量あたりのコピー数で比較した。関節軟骨での発現量は、心臓や肝臓、脾臓、腎臓に比べて著しく高く、高発現組織として知られる褐色脂肪と同等であった (図表 3-3)。

3. 甲状腺ホルモンによる関節軟骨細胞の ALP 活性亢進

膝関節軟骨より採取した軟骨細胞を甲状腺ホルモンである T3 または T4 で刺激し、6日後に軟骨細胞の肥大分化マーカーである ALP 活性を測定したところ、T3 は 1 pM 程度から細胞の ALP 活性を亢進させ、1 nM では活性を約 3 倍上昇させたが、前駆体である T4 は 1 μM 程度でも弱い活性亢進しか示さなかった (図表 3-4)。

4. 甲状腺ホルモンによる関節軟骨細胞の肥大化関連遺伝子発現亢進

初代培養軟骨細胞を T3 で刺激し、1日後の遺伝子発現変動を検討したところ、T3 刺激によって *Alp* や *Col10A1*、*Adamts5* などの、細胞の肥大分化によって発現亢進することが知られている遺伝子の発現上昇が認められた (図表 3-5)。さらに、変形性関節症の患部では、しばしば炎症が認められることから、炎症時の甲状腺ホルモンの作用を検討した。関節軟骨細胞を炎症性サイトカインである *IL-1α* 単独、または *IL-1α* と T3 で刺激して 24 時間後の遺伝子発現を検討したところ、T3 は *IL-1α* による関節軟骨細胞外基質の分解酵素 (*Adamts5*, *Mmps*) の発現上昇をさらに亢進させることが示された (図表 3-6)。

5. 甲状腺ホルモンによる関節軟骨組織中の関節軟骨細胞肥大化

単離した関節軟骨組織を T3 で刺激し、刺激 3,5,7 日後の遺伝子発現を検討したところ、生理食塩水で刺激した際に比べて、ALP、タイプ X コラーゲン、Osteocalcin、Runx2 の発現量が数倍から数十倍に上昇することが示された (図表 3-7)。また、T3 刺激 7 日目の軟骨組織を抗タイプ X コ

ラーゲン抗体で免疫染色したところ、タンパクレベルでも発現の亢進が認められた（図表 3-8）。さらに、軟骨細胞の肥大化も認められた（矢印）。

第4節 考察

これまで骨格形成期の成長板における Dio 2 の重要性については様々な研究されてきた (11, 27, 28)。しかしながら、関節軟骨における Deiodinase についてはほとんど情報がなかった。今回我々は、関節軟骨において Dio1 や 3 に比べて Dio2 の発現量が高いことを初めて示した。この結果は、第 2 章で得られたヒトのマイクロアレイでの結果とも一致する。また関節軟骨での Dio2 の発現は他の臓器と比較しても高いこと、Dio2 による T3 産生がエネルギー代謝に重要であることが知られている褐色脂肪と同程度に高いこと、も示された。以上のことから、Dio2 は生理的条件においても関節軟骨細胞において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

また、Dio2 によって産生される T3 が甲状腺ホルモンの肥大化を亢進することを示した。これまでも、T3 によって ALP や Col10a1 の発現が亢進することが、ブタや牛より単離した軟骨細胞、および細胞株において報告されている (29-32)。しかしながら、今回の私の報告は、細胞内での T3 産生が変形性関節症の関節軟骨における異常な肥大化に関わっている可能性を示唆した初めての報告である。さらに、変形性関節症の病態進行に深く関与する軟骨分解酵素の発現も T3 によって亢進することを示した点にも大きな意義がある。

私は、炎症条件におけるサイトカインによる関節破壊を甲状腺ホルモンが亢進させることも初めて示した。さらに、これまでの検討は、単離後単層培養した初代関節軟骨細胞を用いているが、軟骨細胞は、単層培養により形質が変わってしまうことが報告されている (33)。一方、私の検討結果は、単層培養と組織培養において一致する結果が得られているため信頼性が高いと考えられる。さらに、組織培養ではより顕著な遺伝子発現変動が認められたことから、生体内においても同様の現象が起こっていることを強く示唆している。また、免疫染色においてもタイプ X コラーゲンの発現亢進が認められ、遺伝子発現とタンパク発現が一致する結果が得られた。

以上の結果から、Dio2 によって産生される甲状腺ホルモンは、生理的には分化能をもたない関節軟骨細胞および関節軟骨組織において肥大分化を亢進することが示された。

第5節 小括

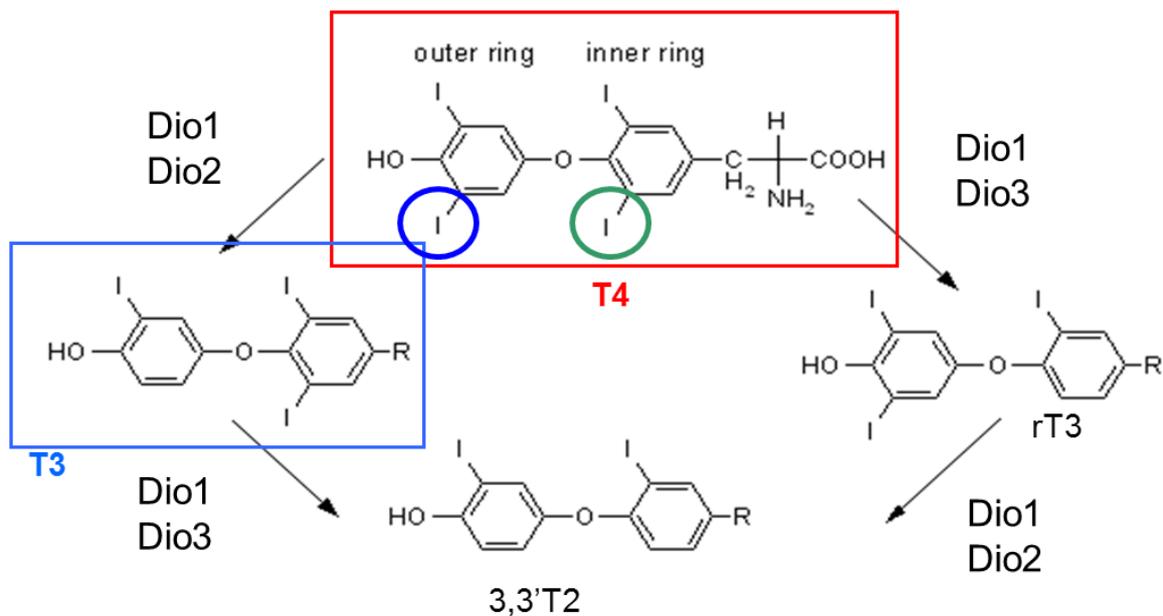
関節軟骨では Dio2 が高発現していることを初めて示した。また、Dio2 によって産生される甲状腺ホルモンは、軟骨細胞および組織の肥大分化を亢進することを示した。さらに、甲状腺ホルモンは炎症による軟骨分解酵素の発現上昇を亢進することを示した。

引用文献

1. Bland JH, Frymoyer JW. Rheumatic syndromes of myxedema. *N Engl J Med.* 1970;282(21):1171-1174.
2. Moreno-Reyes R, Suetens C, Mathieu F, Begaux F, Zhu D, Rivera MT, Boelaert M, Neve J, Perlmutter N, Vanderpas J. Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. *N Engl J Med.* 1998;339(16):1112-1120.
3. Williams AJ, Robson H, Kester MH, van Leeuwen JP, Shalet SM, Visser TJ, Williams GR. Iodothyronine deiodinase enzyme activities in bone. *Bone.* 2008;43(1):126-134.
4. Dentice M, Bandyopadhyay A, Gereben B, Callebaut I, Christoffolete MA, Kim BW, Nissim S, Mornon JP, Zavacki AM, Zeold A, Capelo LP, Curcio-Morelli C, Ribeiro R, Harney JW, Tabin CJ, Bianco AC. The Hedgehog-inducible ubiquitin ligase subunit WSB-1 modulates thyroid hormone activation and PTHrP secretion in the developing growth plate. *Nature cell biology.* 2005;7(7):698-705.
5. Ballock RT, Reddi AH. Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *The Journal of cell biology.* 1994;126(5):1311-1318.
6. Bohme K, Conscience-Egli M, Tschan T, Winterhalter KH, Bruckner P. Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *The Journal of cell biology.* 1992;116(4):1035-1042.
7. Wakita R, Izumi T, Itoman M. Thyroid hormone-induced chondrocyte terminal differentiation in rat femur organ culture. *Cell Tissue Res.* 1998;293(2):357-364.
8. 悟 鈴. 甲状腺ホルモン輸送 甲状腺から標的核受容体への旅路. *信州医学雑誌.* 2011;59(6):403-410.
9. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.* 2002;23(1):38-89.
10. Gereben B, Goncalves C, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol Endocrinol.* 2000;14(11):1697-1708.
11. Arrojo EDR, Bianco AC. Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2011;43(10):1432-1441.
12. Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest.* 2006;116(10):2571-2579.
13. Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R, Bartnik E. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of

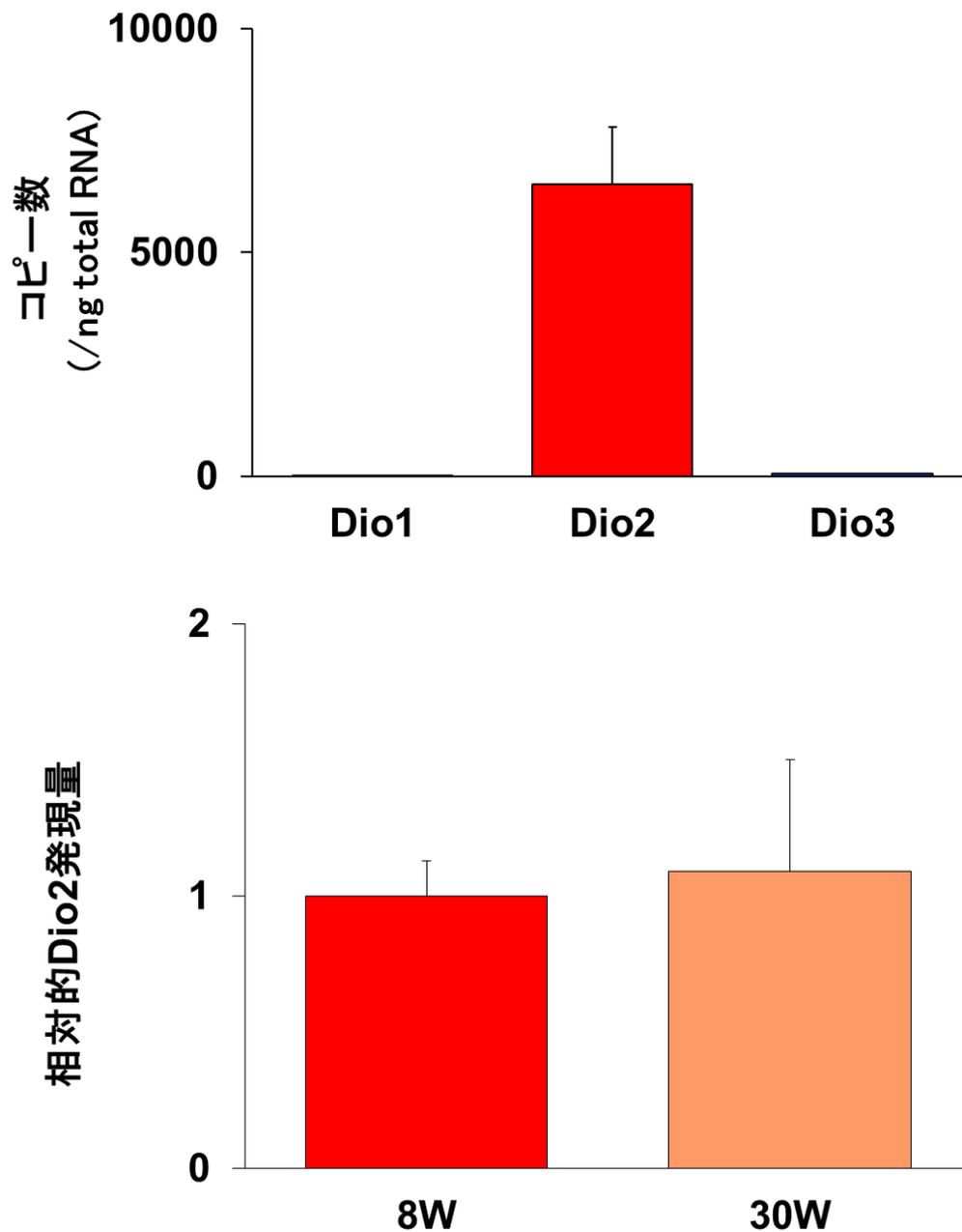
- cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(11):3533-3544.
14. Jimenez MJ, Balbin M, Lopez JM, Alvarez J, Komori T, Lopez-Otin C. Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Molecular and cellular biology.* 1999;19(6):4431-4442.
 15. Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.* 2001;15(4):467-481.
 16. Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K, Komori T. Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *The Journal of cell biology.* 2001;153(1):87-100.
 17. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2462-2470.
 18. Kawashima-Ohya Y, Satakeda H, Kuruta Y, Kawamoto T, Yan W, Akagawa Y, Hayakawa T, Noshiro M, Okada Y, Nakamura S, Kato Y. Effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide on expressions of matrix metalloproteinase-2, -3, and -9 in growth plate chondrocyte cultures. *Endocrinology.* 1998;139(4):2120-2127.
 19. Patwari P, Cook MN, DiMicco MA, Blake SM, James IE, Kumar S, Cole AA, Lark MW, Grodzinsky AJ. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. *Arthritis Rheum.* 2003;48(5):1292-1301.
 20. Tuckermann JP, Pittois K, Partridge NC, Merregaert J, Angel P. Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse. *J Bone Miner Res.* 2000;15(7):1257-1265.
 21. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(9):1263-1267.
 22. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 2001;44(3):585-594.
 23. Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clinical orthopaedics and related research.* 2004(423):17-26.

24. Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, Mwale F, Kojima T, Sakai T, Wahl C, El-Maadawy S, Webb G, Tchetina E, Wu W. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61 Suppl 2:ii78-81.
25. Stanton H, Ung L, Fosang AJ. The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. *The Biochemical journal.* 2002;364(Pt 1):181-190.
26. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(7):632-641.
27. Gouveia CH, Christoffolete MA, Zaitune CR, Dora JM, Harney JW, Maia AL, Bianco AC. Type 2 iodothyronine selenodeiodinase is expressed throughout the mouse skeleton and in the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cell line during differentiation. *Endocrinology.* 2005;146(1):195-200.
28. Bassett JH, Boyde A, Howell PG, Bassett RH, Galliford TM, Archanco M, Evans H, Lawson MA, Croucher P, St Germain DL, Galton VA, Williams GR. Optimal bone strength and mineralization requires the type 2 iodothyronine deiodinase in osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(16):7604-7609.
29. Alini M, Kofsky Y, Wu W, Pidoux I, Poole AR. In serum-free culture thyroid hormones can induce full expression of chondrocyte hypertrophy leading to matrix calcification. *J Bone Miner Res.* 1996;11(1):105-113.
30. Jiang J, Leong NL, Mung JC, Hidaka C, Lu HH. Interaction between zonal populations of articular chondrocytes suppresses chondrocyte mineralization and this process is mediated by PTHrP. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(1):70-82.
31. Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, Ozasa A, Nakao K. Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate. *J Bone Miner Res.* 2002;17(3):443-454.
32. Rosenthal AK, Henry LA. Thyroid hormones induce features of the hypertrophic phenotype and stimulate correlates of CPPD crystal formation in articular chondrocytes. *J Rheumatol.* 1999;26(2):395-401.
33. Huch K, Stove J, Puhl W, Gunther KP. [Review and comparison of culture-techniques for articular chondrocytes]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2002;140(2):145-152.



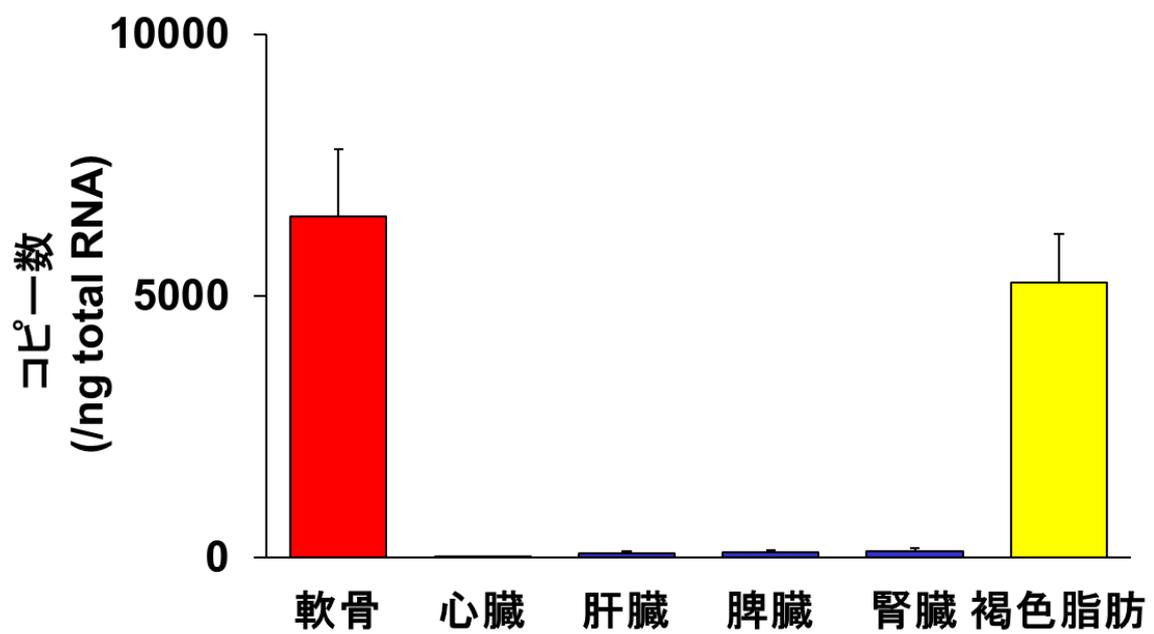
図表 3-1 主な甲状腺ホルモンとその代謝

甲状腺ホルモンの主な代謝酵素は細胞質に存在する脱ヨード酵素である。脱ヨード酵素には1型 (D1) , 2型 (D2) そして3型 (D3) が存在する。D1 は外側 (5') と内側 (5) のヨードに対し脱ヨード作用を有する。D2 は外側, D3 は内側にのみヨードに対し脱ヨード作用を有する。サイロキシン (T4) はヨード分子を4つ保有している。外側の脱ヨード反応により, トリヨードサイロニン (T3) に変換される。T3 は核受容体に結合し活性型としてホルモン作用を誘導する。内側の脱ヨード反応により生じるリバース T3 (rT3) は非活性型であり, 核受容体に結合せず活性を持たない。T3, rT3 はその後, 同様の脱ヨード酵素により非活性型であるジヨードサイロニンへ代謝される。



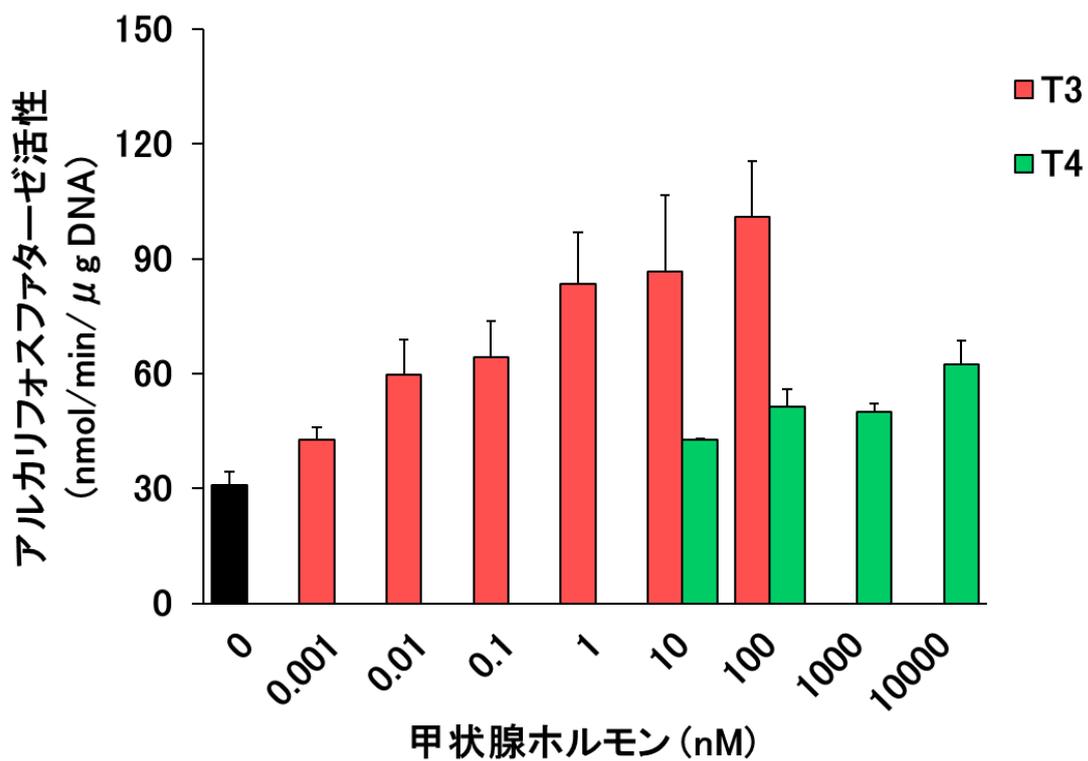
図表 3-2 膝関節軟骨での Deiodinase 発現比較

8週齢のラット膝関節軟骨における Total RNA 量あたりの Dio1-3 コピー数を定量的 PCR で比較した。また、関節軟骨での Dio2 発現量を 8 週齢と 30 週齢で比較した。値は 8 週齢での発現量の平均値を算出し、その値を 1 とした相対値を算出した。



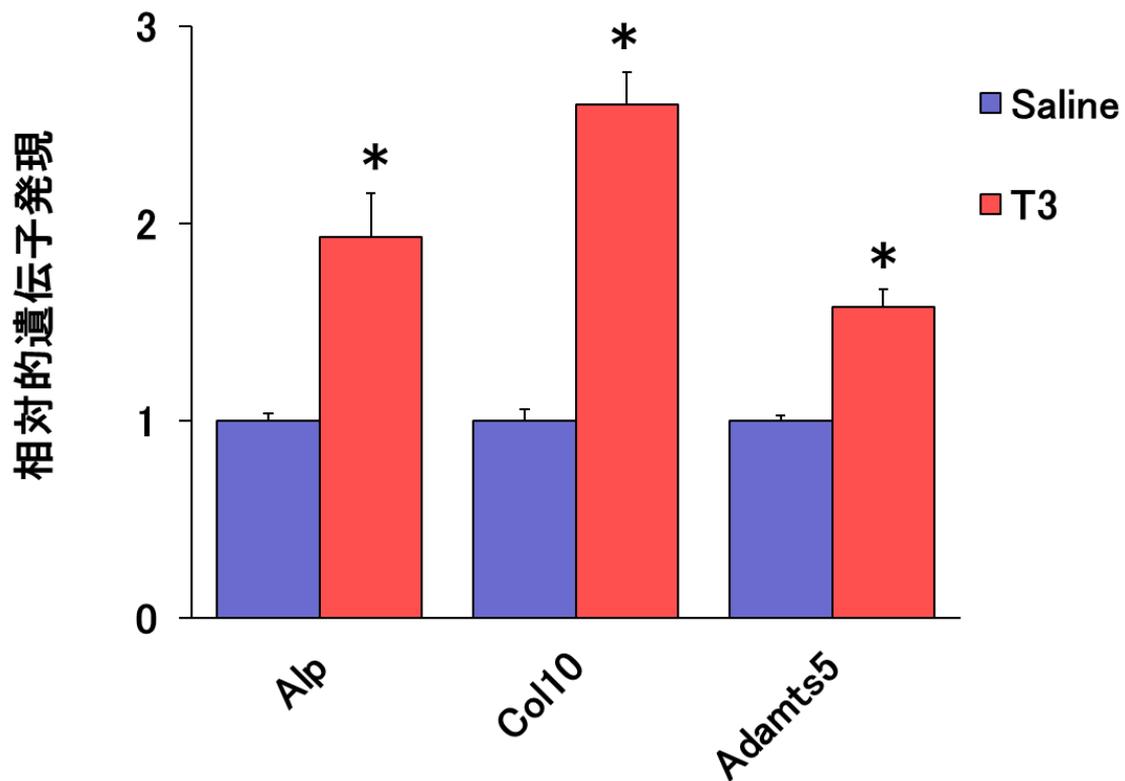
図表 3-3 Dio2 発現量の臓器間比較

各組織での Dio2 量を Total RNA 量あたりのコピー数で比較した。



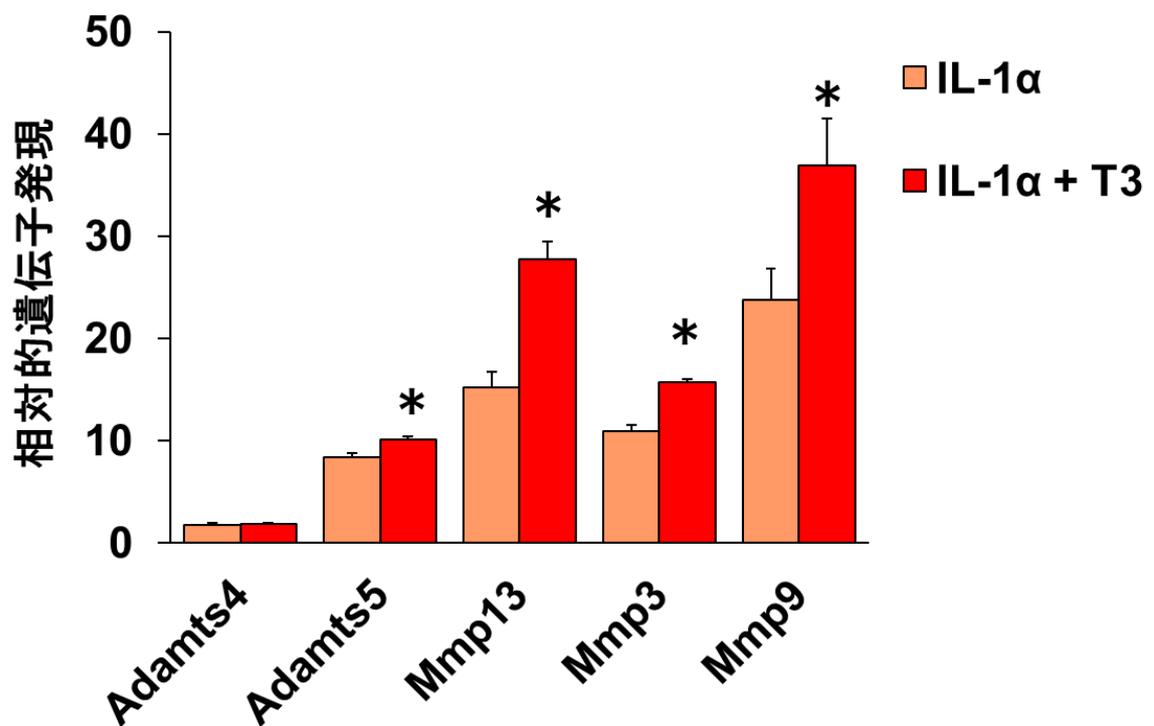
図表 3-4 ALP 活性

膝関節軟骨より採取した軟骨細胞を甲状腺ホルモンである T3 または T4 で刺激し、6 日後に軟骨細胞の肥大分化マーカーである ALP 活性を測定した。



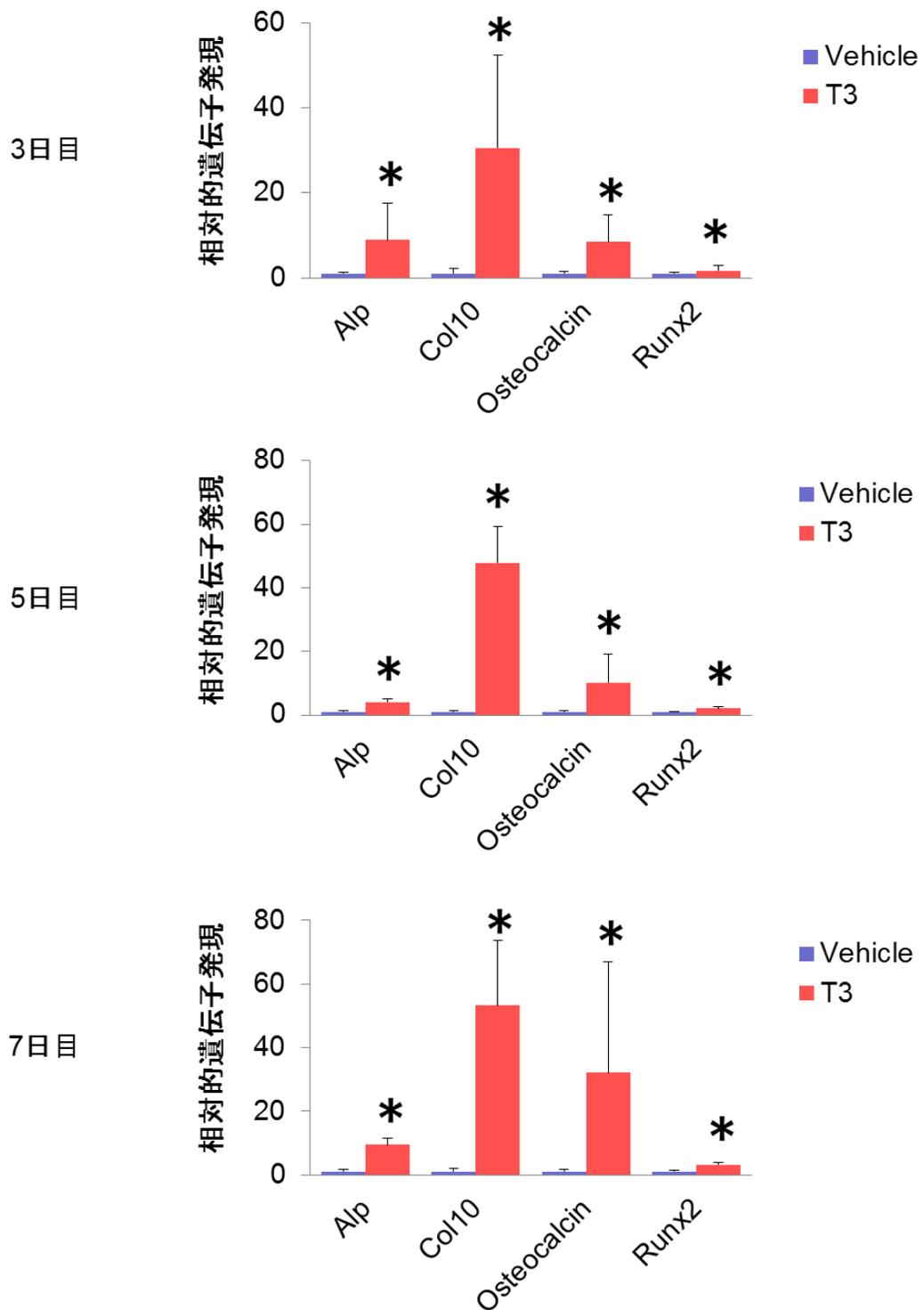
図表 3-5 T3 刺激による関節軟骨細胞の遺伝子発現変動

初代培養軟骨細胞を T3 で刺激し、1 日後の遺伝子発現量を変動を検討した。生理食塩水刺激時の発現量の平均値を算出し、その値を 1 とした相対値を算出した。



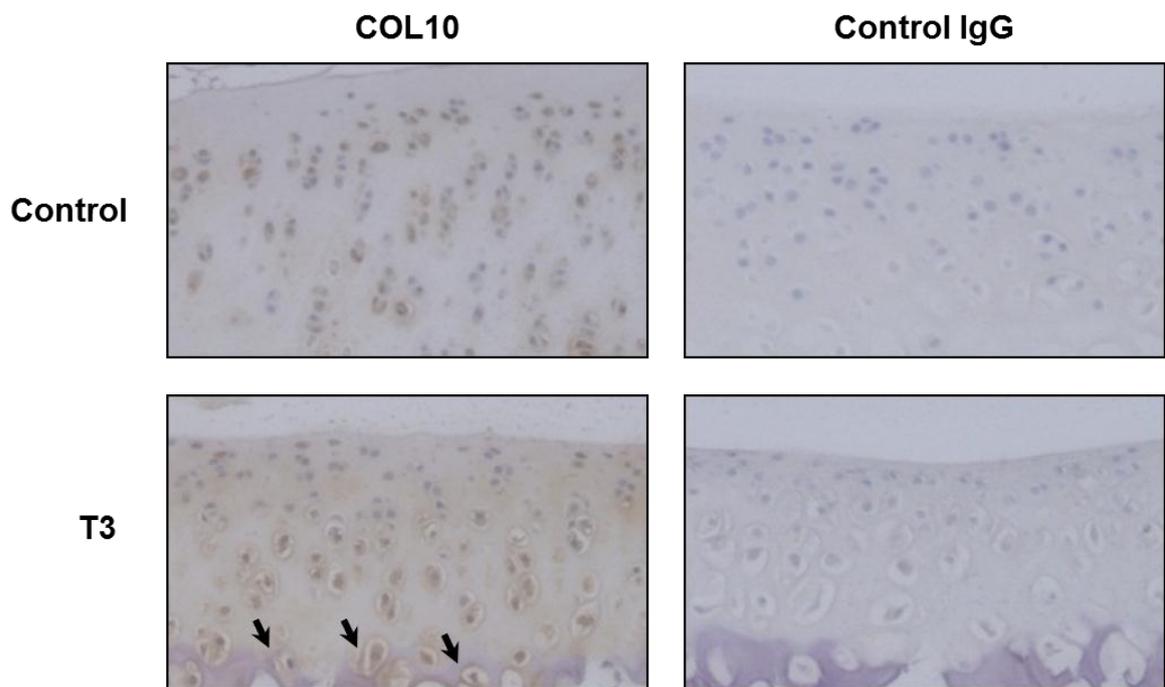
図表 3-6 T3 および IL-1 刺激による関節軟骨細胞の遺伝子発現変動

関節軟骨細胞を炎症性サイトカインである IL-1 α 単独、または IL-1 α と T3 で刺激して 24 時間後の遺伝子発現を検討した。生理食塩水刺激時の発現量の平均値を算出し、その値を 1 とした相対値を算出した。



図表 3-7 T3 による関節軟骨組織の遺伝子発現変動

関節軟骨組織を T3 で刺激し、刺激 3,5,7 日後の遺伝子発現を検討した。生理食塩水刺激時の発現量の平均値を算出し、その値を 1 とした相対値を算出した。



図表 3-8 T3 による関節軟骨組織の遺伝子発現変動

関節軟骨組織を T3 で刺激し、刺激 7 日目に抗タイプ X コラーゲン抗体で免疫染色した。肥大化した軟骨細胞を矢印で示した。

第4章 軟骨特異的トランスジェニックラットの作製

第1節 序論

変形性関節症の分子背景の解明のために、*in vivo* において最も遺伝子操作が汎用されてシステムの完成度も高いマウスを用いたマウスジェネティクスからのアプローチが盛んに行われている(1)。一方、マウスと比較して、ラットの遺伝子改変動物に関する報告は非常に数が少ない。その理由として、飼育スペースやコストの問題や、ノックアウト動物を作製するのに必要なES細胞の作製が20年以上マウスより遅れたことがあげられる(2)。今回私の実験では、ラットの遺伝子改変動物を作ることとした。その主な理由として、マウスの関節軟骨は非常に小さくて薄く、RNA抽出やDio2酵素活性を測定することが困難であること、十分な量の血液や組織が得られないことなどがあげられる。私の予備検討において、外科的手術により関節にメカニカルストレスをかけたラットでは、期待に反して、荷重部におけるDio2の発現上昇が認められなかった(図表4-1)。そこで、ヒトの関節軟骨で認められるDio2の発現上昇を模した動物モデルとして、トランスジェニックラットを作製することとした。

血中の甲状腺ホルモン量は、厳密に制御されている。血中T3濃度は、脳の下垂体でモニターされ、T3濃度が低下すると甲状腺でのホルモン生合成を促す甲状腺刺激ホルモンが下垂体前葉から分泌される。一方、甲状腺ホルモン濃度が上昇すると下垂体前葉からの甲状腺刺激ホルモンの分泌量が低下する。また、末梢血中のT3のうち、約80%はDio1および2によって末梢で産生されることが知られている(3)。さらに、各細胞中ではDio2によるT4の活性化とDio3によるT4、T3の分解が行われるため、甲状腺ホルモンの制御は全身性から細胞内まで様々なレベルで制御されている。

Dio1-3の生理的役割については、遺伝子改変動物を用いて幾つかの検討結果が報告されている。Dio1およびDio2のノックアウトマウスは、血中T3濃度が正常であるが、T4は高値を示した。これは、Dio1または2の活性が低く、T3の産生能が低いことをもう一方のDioによるT3産生で補っているものと考えられる(4,5)。また、Dio2ノックアウトマウスでは、血中TSH濃度も高値を示す。これは、基質であるT4産生のみならず、甲状腺でのT3生合成も促進させることでT3量を正常レベルに保っているものと考えられている。さらに、Dio1 Dio2ダブルノックアウトマウスでも血中T3濃度は正常であることが報告された(6)。一方、Dio3ノックアウトマウスでは、血中T4濃度は上昇し、T3濃度は低下する(7)。Dio2のノックアウトマウスでは、軽度な体重低下や難聴および骨密度の低下も報告されている(8)。以上のことから、Deiodinaseの発現変動は血中の甲状腺ホルモンのバランスを変化させ、全身性に様々な表現型が認められる。

以上のような背景から、我々は他の組織への影響、および他の組織からの影響を排除できる軟骨特異的なトランスジェニックラットを作製することとした。タイプ2コラーゲンは軟骨特異的に発現することから、その発現制御領域は、軟骨特異的なトランスジェニックマウスの作製に用いられる(9)。そこで私はラットのタイプ2コラーゲンの発現制御領域によってヒトDio2の発現を制

御した軟骨特異的なトランスジェニックラットを作製することとした。

第2節 材料と方法

1. 試薬

Red/ET Counter Selection BAC Modification Kit は Gene Bridges (Deidelberg, Germany) から、Nucleobond Plasmid Purification Kit は Maherey-Nagel (Germany) から、pDNR-1r プラスミドは Takara (Shiga, Japan)から、rodent triiodothyronine ELISA test kit は Endocrine Technologies Inc (Newark, CA, USA) から、PI-SceI は New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) から購入した。

2. 動物

SPF 環境下、12 時間の明暗サイクルおよび餌と水は随時摂取が可能な条件下で飼育した。すべての動物実験は、三共(株)および第一三共(株)の実験動物倫理委員会にて承認されたものである。

3. 大腸菌人工染色体 (BAC) トランスジェニックコンストラクト

ラットタイプ 2 コラーゲン(Col2A1)およびヒト DIO2 の大腸菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome : BAC) クローンをライブラリーより Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて検索した (図表 4-2)。まず、ヒト DIO2 のイントロンに薬剤耐性による大腸菌のセレクションマーカーを含むフラグメント (rpsl-neo cassette) を Red/ET による相同組換え法により挿入した。次に、Red/ET 相同組換え法で pDNR-1r ベクターに乗せ換えた (赤矢印) (図表 4-3)。組換えた配列の前後には、Rat Col2A1 のエキソン 1 開始コドンから 50bp および終始コドンの上流 50bp と相同配列を入れておく (青矢印)。このベクターより、目的の配列をサブクローニングし、得られたフラグメントを Red/ET 相同組換えを用いて Rat Col2A1 のエキソン 1 のコード配列と組み替えた。最後に、大腸菌のセレクションマーカーを置換・除去した。ここまで作製した組換え BAC 型発現ベクターをシーケンスにより確認した (図表 4-4)。

このベクターでトランスフォームさせた大腸菌を培養し、既報を参考に菌株から発現ベクターの抽出および精製を行った (10)。簡潔に述べると、Nucleobond Plasmid Purification Kit で抽出し、環状の BAC クローンを特異的制限酵素 PI-SceI で直鎖化した。直鎖化したベクターはパルスフィールド電気泳動により分離させ、目的のサイズの DNA 断片を含むゲルを切り出して、電気溶出により遊離させた (図表 4-5)。

4. トランスジェニックコンストラクトのマイクロインジェクション

冷凍保存された受精卵 (Charles River Laboratory, Wilmington, MA, USA) に、調製した BAC DNA 溶液(1 ng/L)を顕微注入し、偽妊娠ラットに移植することでファウンダー候補個体を得た。得られた産子を離乳まで育成し、尾の先端よりゲノム DNA を抽出してジェノタイピングを行った。方法は、ゲノム DNA を制限酵素で完全消化させ、フラグメントをアガロースゲル電気泳動で分離してナイロンメンブレンにトランスファーした。RI 標識した TetR プローブとナイロンメンブレンをハイブリダイズさせ、サザンブロットを行いファウンダーを選抜した。

5. 遺伝子発現

10 週齢のトランスジェニックラットまたは同腹のワイルドタイプ個体を安楽殺後、各種臓器を摘出して RNA 抽出・精製・逆転写および qPCR を行った。方法は、第 3 章と同様。

6. Deiodinase 酵素活性測定

ラットの脛骨近位端の関節軟骨を採取し、個体毎に無血清培地が入った 24 well plate に移した。無血清培地で 2 回洗った後、¹²⁵I でラベルした T4 を添加して 5% CO₂, 37°C で 4 時間インキュベートした。培地を半量除き、血清とトリクロロ酢酸を添加してタンパク成分を沈殿させた。Deiodinase 活性により遊離した ¹²⁵I をガンマ線カウンター (AccuFLEXγ7000, ALOKA) で測定した。

7. 統計解析

有意差検定には、SAS, Version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使い、F 検定で分散が等しいものは t 検定、等しくないものは Welch 検定で解析を行った。また、多群間の検定は Dunnett' s multiple comparison test で解析を行った。

第3節 結果

1. トランスジェニックの作製

BAC DNA 溶液を注入した受精卵より 176 匹の産仔が得られた。ジェノタイピングにより、13 匹は目的の遺伝子が導入されていた (♂8, ♀5)。これらをそれぞれ同系統の野生型ラットと交配させて産仔を得た。この産仔もジェノタイピングを行ったところ、11 系統で生殖系列移行が認められた。それぞれの挿入コピー数は、1-30 コピーであった (図表 4-6)。得られた系統のうち、コピー数の多さと雄個体数などから 383_4 系統を以後用いることとした。この系統のトランスジェニック陽性雄個体と野生型雌個体を交配させ、得られた産仔を離乳まで生育してからジェノタイピングして、それぞれ野生型とトランスジェニックに分けて以下の評価を行った。尚、産仔の野生型とトランスジェニック型の割合は概ね 1:1 であった。

2. 遺伝子発現制御および機能

10 週齢のトランスジェニックラットおよび同腹の野生型より各種臓器を採取し、ヒト Dio2 mRNA の発現量を比較した。軟骨組織である関節軟骨および剣状突起では発現が認められたが、心臓・肝臓・膵臓・腎臓・動脈・静脈では発現が認められなかった (図表 4-7)。さらに、Dio2 の発現が高いことが知られる褐色脂肪および嗅球でも検討したが、同様に発現が認められなかった。このことから、作製した動物は軟骨特異的にヒト Dio2 が発現していることが示された。

次に、発現した Dio2 の酵素活性を検討するため、関節軟骨の Dio2 活性を測定したところ、トランスジェニックラットの活性は野生型ラットの活性に比べて約 7 倍活性が高かった (図表 4-8)。

以上のことから、トランスジェニックラットは軟骨特異的に酵素活性を持つヒト Dio2 を発現することが示された。

第4節 考察

ヒトの変形性関節症で *Dio2* の遺伝子発現が上昇していたことから、ラットの変形性関節症モデル動物においても同様の变化を期待したが、発現変動は認められなかった。しかしながら、ヒトの変形性関節症で認められる発現変動遺伝子が、病態モデル動物では再現できないという報告は数多くある (11, 12)。そこで私は、遺伝子組み換えにより *Dio2* を高発現する動物を作製することとした。

従来の遺伝子発現ベクターを導入したトランスジェニック動物は、短期間でモデル動物を作出して評価できるため、非常に多くの研究に利用されてきた (13)。しかし、このようなコンベンショナルな動物では、外来遺伝子を数 kb のコアプロモーター配列制御下に発現させるため、期待通りにトランスジーンが発現しないケースが頻繁に起こり、トランスジェニック動物による遺伝子機能の解析、病態モデル開発の大きな障害になってきた。これに対して、ES 細胞の遺伝子ターゲティングを利用して作出されるノックイン動物では、外来遺伝子を内在性のプロモーター活性で正確に発現させることができるので、目的の動物モデルを確実に作出することができる。しかし、ラットは ES 細胞の確立すらごく最近のことであり、また作出に約 2 年かかる上にコンジェニック化が必要である (14, 15)。そこで我々は、BAC クローンを用いることとした。また、*Dio2* を阻害する根本治療薬の候補化合物が取得できた際に、動物レベルで *Dio2* の阻害作用およびそれによる変形性関節症の病態軽減作用を確認できるようにするため、ヒトの *Dio2* を導入することとした。以上の目的で BAC クローンを用いたトランスジェニック動物を作製し、発現量および組織特異性共に計画したとおりの動物を作製することができた。

私の知る限り、これまでに軟骨特異的なトランスジェニックラットの報告はないため、今回作製したコンストラクトは *Dio2* 以外の遺伝子を軟骨特異的に発現する動物を作製する際にも有用である。

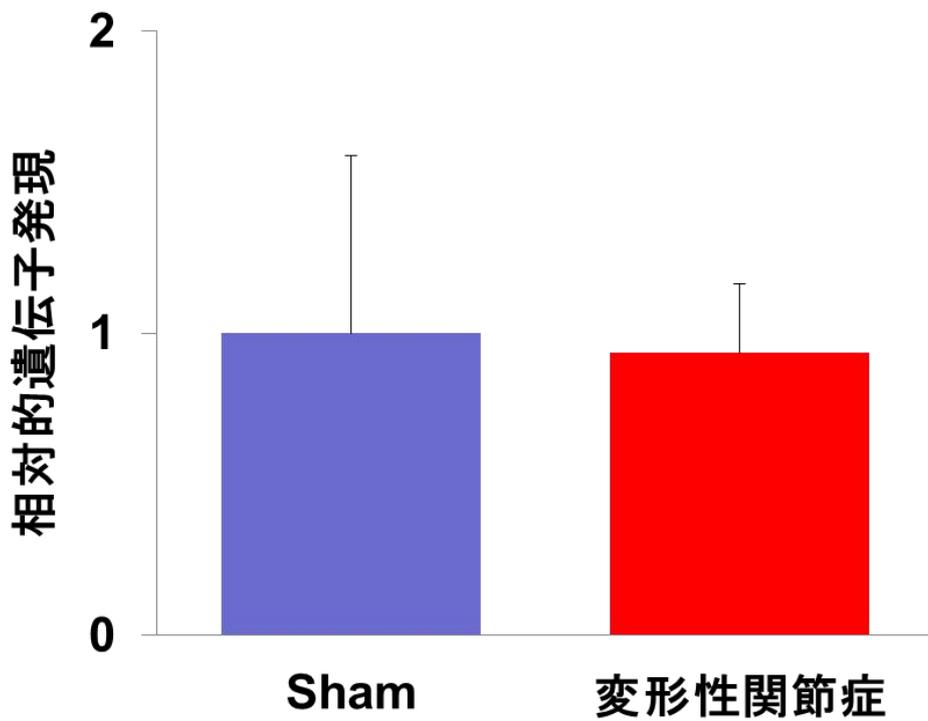
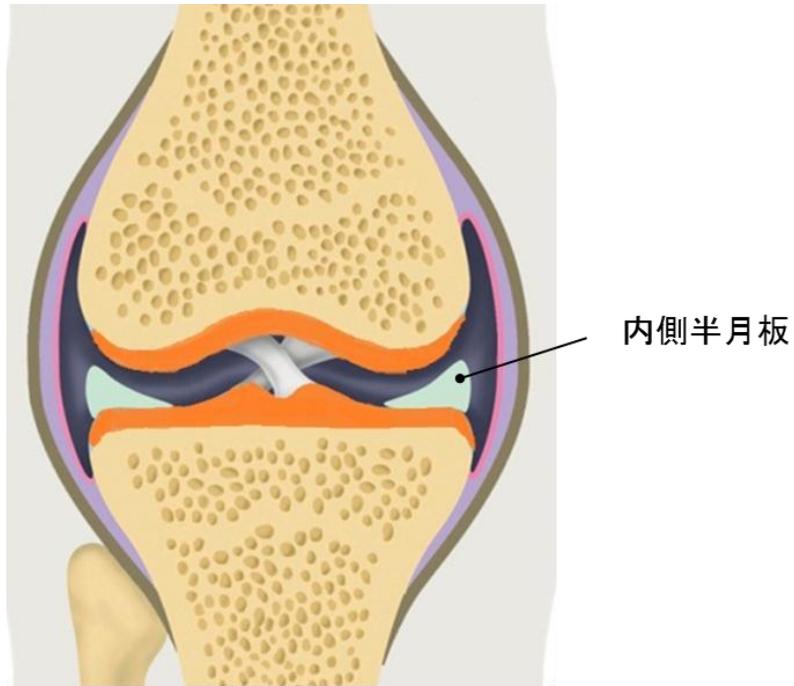
第5節 小括

軟骨特異的トランスジェニックラットの作製に初めて成功した。また、発現した Dio2 は酵素活性も持つことが示された。ラットは、血液や臓器の採取、および外科的手術も容易であり、今回構築したコンストラクトは極めて有益である。

引用文献

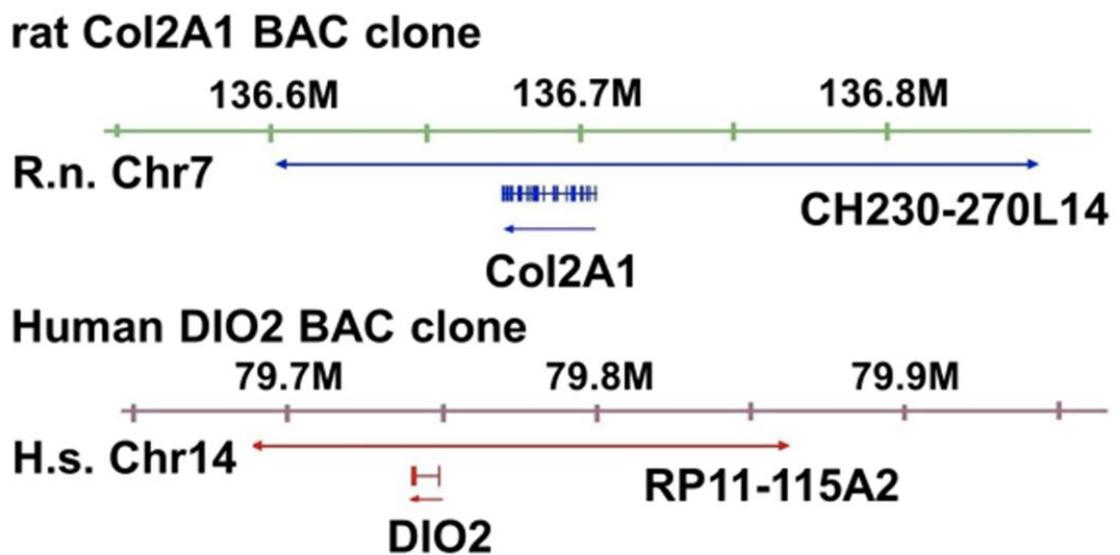
1. Little CB, Zaki S. What constitutes an "animal model of osteoarthritis"--the need for consensus? *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(4):261-267.
2. Evangelou E, Valdes AM, Kerkhof HJ, Styrkarsdottir U, Zhu Y, Meulenbelt I, Lories RJ, Karassa FB, Tylzanowski P, Bos SD, Akune T, Arden NK, Carr A, Chapman K, Cupples LA, Dai J, Deloukas P, Doherty M, Doherty S, Engstrom G, Gonzalez A, Halldorsson BV, Hammond CL, Hart DJ, Helgadottir H, Hofman A, Ikegawa S, Ingvarsson T, Jiang Q, Jonsson H, Kaprio J, Kawaguchi H, Kisand K, Kloppenburg M, Kujala UM, Lohmander LS, Loughlin J, Luyten FP, Mabuchi A, McCaskie A, Nakajima M, Nilsson PM, Nishida N, Ollier WE, Panoutsopoulou K, van de Putte T, Ralston SH, Rivadeneira F, Saarela J, Schulte-Merker S, Shi D, Slagboom PE, Sudo A, Tamm A, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Tsezou A, Wallis GA, Wilkinson JM, Yoshimura N, Zeggini E, Zhai G, Zhang F, Jonsdottir I, Uitterlinden AG, Felson DT, van Meurs JB, Stefansson K, Ioannidis JP, Spector TD. Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(2):349-355.
3. Engler D, Burger AG. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. *Endocr Rev*. 1984;5(2):151-184.
4. Schneider MJ, Fiering SN, Pallud SE, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA. Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol Endocrinol*. 2001;15(12):2137-2148.
5. Schneider MJ, Fiering SN, Thai B, Wu SY, St Germain E, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA. Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology*. 2006;147(1):580-589.
6. Galton VA, Schneider MJ, Clark AS, St Germain DL. Life without thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion: studies in mice devoid of the 5'-deiodinases. *Endocrinology*. 2009;150(6):2957-2963.
7. Hernandez A, Martinez ME, Fiering S, Galton VA, St Germain D. Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest*. 2006;116(2):476-484.
8. Bassett JH, Boyde A, Howell PG, Bassett RH, Galliford TM, Archanco M, Evans H, Lawson MA, Croucher P, St Germain DL, Galton VA, Williams GR. Optimal bone strength and mineralization requires the type 2 iodothyronine deiodinase in osteoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(16):7604-7609.
9. Mukhopadhyay K, Lefebvre V, Zhou G, Garofalo S, Kimura JH, de Crombrughe B. Use of a new rat chondrosarcoma cell line to delineate a 119-base pair chondrocyte-specific enhancer element and to define active promoter segments in the mouse pro-alpha 1(II) collagen gene. *J*

- Biol Chem. 1995;270(46):27711-27719.
10. Abe K, Hazama M, Katoh H, Yamamura K, Suzuki M. Establishment of an efficient BAC transgenesis protocol and its application to functional characterization of the mouse Brachyury locus. *Exp Anim.* 2004;53(4):311-320.
 11. Barve RA, Minnerly JC, Weiss DJ, Meyer DM, Aguiar DJ, Sullivan PM, Weinrich SL, Head RD. Transcriptional profiling and pathway analysis of monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats: relevance to human disease. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(10):1190-1198.
 12. Wei T, Kulkarni NH, Zeng QQ, Helvering LM, Lin X, Lawrence F, Hale L, Chambers MG, Lin C, Harvey A, Ma YL, Cain RL, Oskins J, Carozza MA, Edmondson DD, Hu T, Miles RR, Ryan TP, Onyia JE, Mitchell PG. Analysis of early changes in the articular cartilage transcriptome in the rat meniscal tear model of osteoarthritis: pathway comparisons with the rat anterior cruciate transection model and with human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(7):992-1000.
 13. Petri W. Transgenic organisms and development. *Nature.* 1982;299(5882):399-400.
 14. Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying QL, Smith A. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell.* 2008;135(7):1287-1298.
 15. Kawamata M, Ochiya T. Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(32):14223-14228.



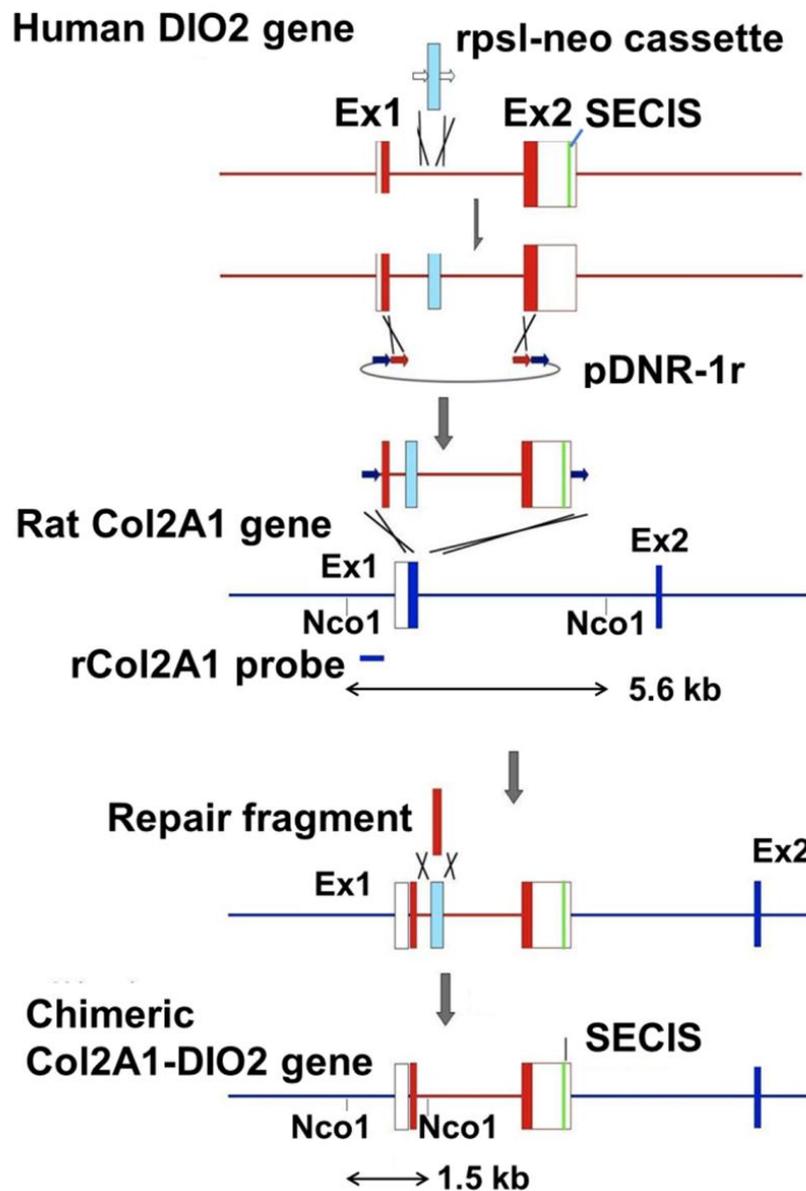
図表 4-1 ラット変形性関節症モデルの関節軟骨での Dio2 発現比較

8 週齢ラットの右後肢内側半月板を切除し、手術 4 週間後の膝関節軟骨における Dio2 発現量を偽手術群と比較した。



図表 4-2 ラットタイプIIコラーゲンおよびヒト Dio2 の BAC クローン

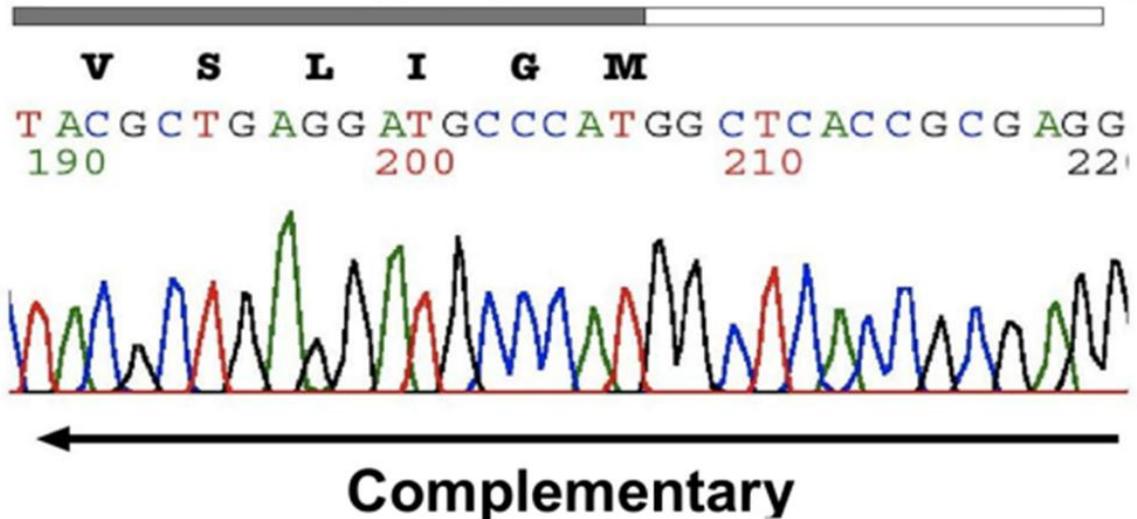
ラット Col2A1 およびヒト DIO2 の BAC クローンをライブラリーより BLAST 検索した。



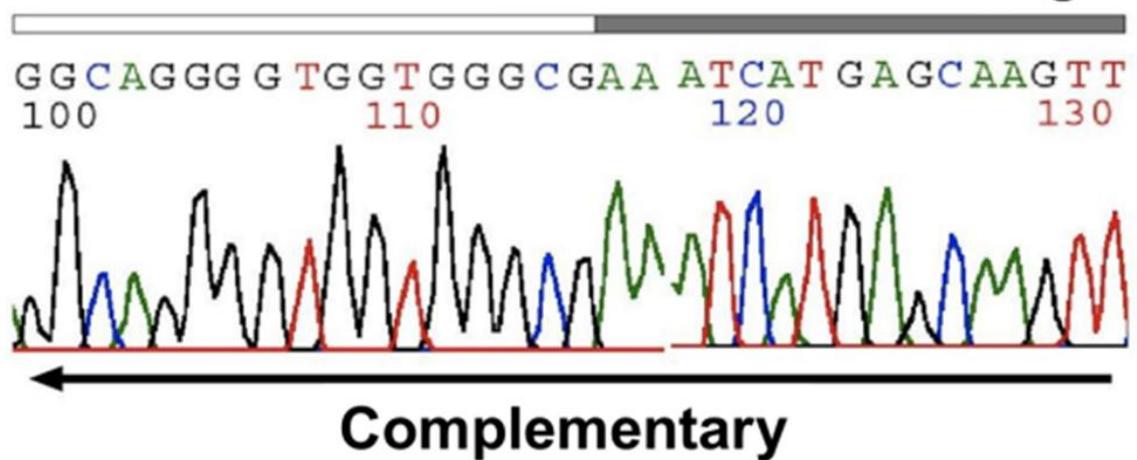
図表 4-3 ラットタイプIIコラーゲンに発現制御されたヒト Dio2 発現配列の作製

ヒト DIO2 のイントロンに *rpsI-neo* cassette を Red/ET による相同組換え法により挿入した。次に、Red/ET 相同組換え法で pDNR-1r ベクターに寄せ換えた (赤矢印)。組換えた配列の前後には、Rat Col2A1 のエキソン 1 開始コドンから 50bp および終始コドンの上流 50bp と相同配列を入れておく (青矢印)。このベクターより、目的の配列をサブクローニングし、得られたフラグメントを Red/ET 相同組換えを用いて Rat Col2A1 のエキソン 1 のコード配列と組み替えた。最後に、大腸菌のセレクションマーカーを置換・除去した。

DIO2 coding region Col2a1 5'-flanking

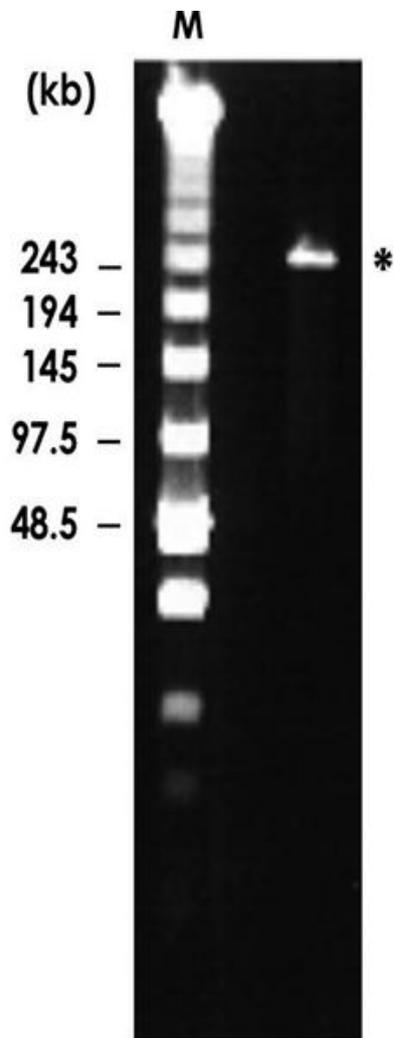


Col2a1 intron1 DIO2 3'-flanking



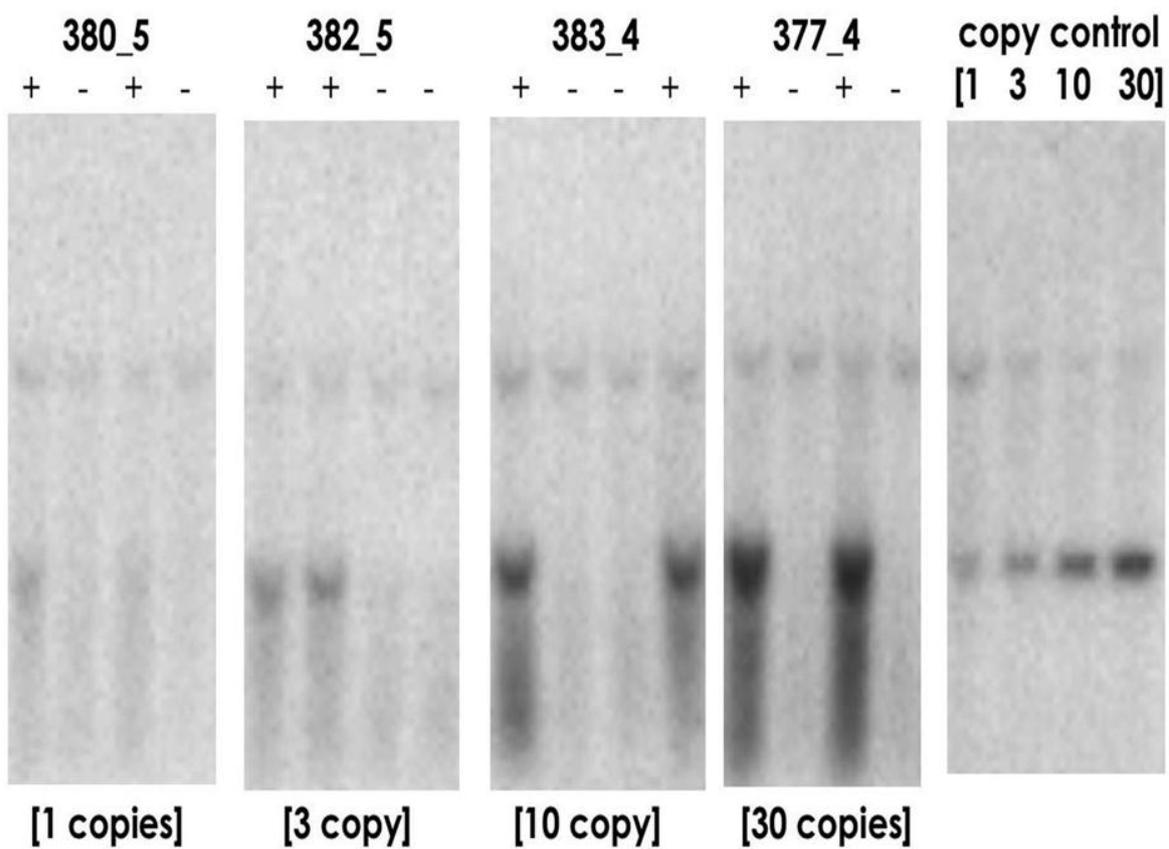
図表 4-4 作製した配列の確認

作製した組換え BAC 型発現ベクターの配列を読んだ。



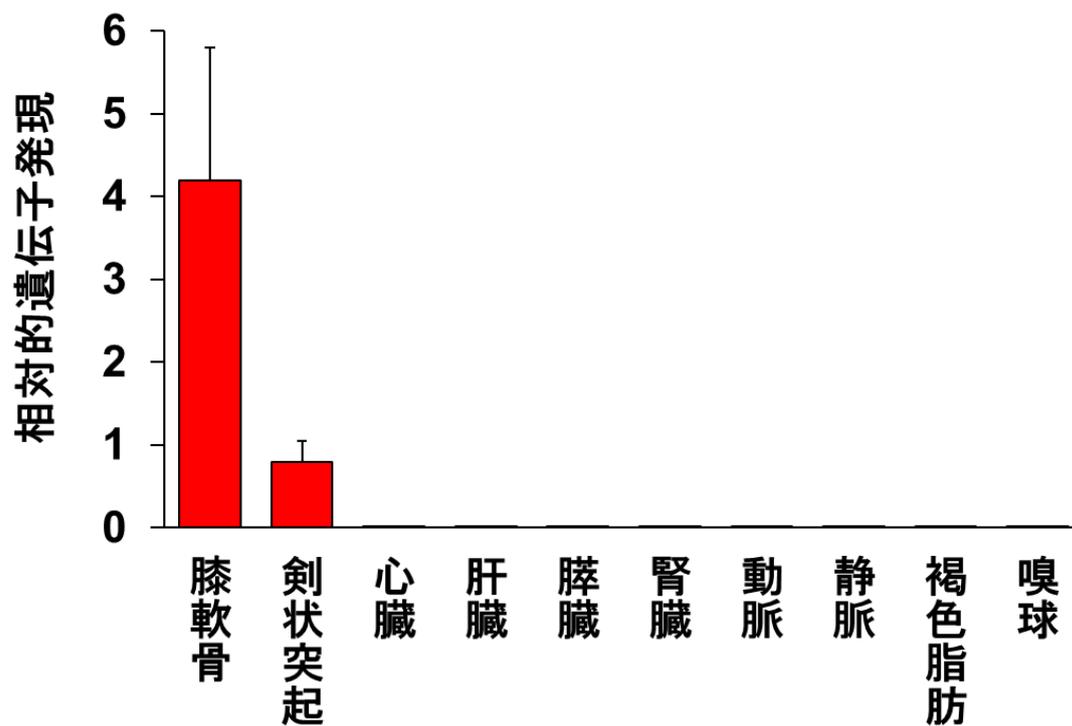
図表 4-5 大腸菌から発現ベクターの抽出および精製

ベクターでトランスフォームさせた大腸菌を培養し、Nucleobond Plasmid Purification Kit で抽出し、環状の BAC クロームを特異的制限酵素 *PI-SceI* で直鎖化した。直鎖化したベクターはパルスフィールド電気泳動により分離させ、目的のサイズの DNA 断片を含むゲルを切り出して、電気溶出により遊離させた。



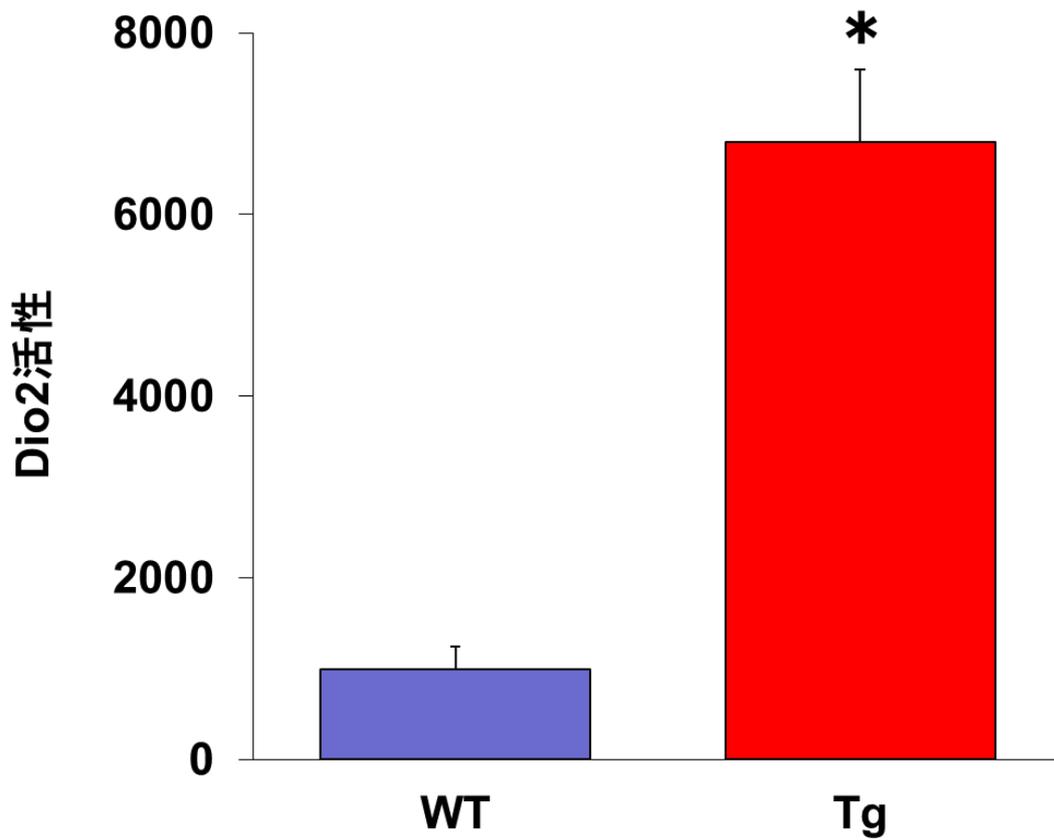
図表 4-6 トランスジェニックラットのジェノタイピング

BAC DNA 溶液を注入した産仔のさらに産仔のジェノタイピングを行い、挿入コピー数を検討した。



図表 4-7 ヒト Dio2 遺伝子の発現組織特異性

10週齢のトランスジェニックラットおよび同腹の野生型より各種臓器を採取し、ヒト Dio2 mRNA の発現量を比較した。



図表 4-8 関節軟骨の Dio2 活性

トランスジェニックラットまたは同腹の野生型ラットの関節軟骨を採取し、Dio2 活性を測定した。

第5章 軟骨特異的トランスジェニックラットの評価

第1節 序論

疾患研究には動物実験モデルが欠かせない。古く変形性関節症研究は大型動物（羊、ミニブタ、犬、ウサギ）を用いて行われてきたが、より扱いやすいげっ歯類での変形性関節症モデルの研究も進んでいる（1-4）。

近年マウスを用いた遺伝子改変技術の飛躍的な向上に伴い、変形性関節症の分子病態解明のためにマウスを用いた外科的な実験モデルが複数の施設で開発された。2005年 Glasson らは、内側半月板と脛骨を繋ぐ *meniscotibial ligament* を切離する DMM モデルを開発した（5）。同年に半月板や靭帯の切断部位数を変えることで発症の重症度をコントロールできる様々な方法が報告された（6）。両者ともマウスの膝関節軟骨に過剰な力学的負荷を加える実験モデルであり、これによって4~12週という短期間で関節軟骨の変性を *in vivo* で再現することが可能となった。

これらのマウスモデルでの発展に伴い、ラットでも様々な変形性関節症モデル動物が検討されてきた。大別すると、関節内への注入モデルと外科的な手術によるモデルがある（2）。関節内への注入モデルとしては、モノヨード酢酸の関節内投与モデルが特に痛み行動の評価で汎用されている（1, 7-9）。しかしながら、本モデルは軟骨組織や軟骨下骨の損傷・炎症などは変形性関節症を模しているが、化学物質により直接的に軟骨細胞死を誘導するのが主なメカニズムであるため、変形性関節症の発症原因の研究に用いるのは必ずしも適切ではない（図表 5-1, 2）。一方、外科的な手術モデルとしては、内側半月板の全切除または部分切除モデル、前十字靭帯切断モデル、およびこれらを組み合わせたものが報告されている（10-19）。これらのモデルの中でも内側半月板全切除モデルは、MMP 阻害剤や Aggrecanase 阻害剤、および FGF-18 などの評価にも用いられ、最も実績のあるモデルであるため、私も本モデルを用いて変形性関節症病態への Dio2 の関与を検討することとした（8, 9, 20）。

第2節 材料と方法

1. 試薬

モノヨード酢酸は和光純薬から、アリザリンレッド S は関東化学から、Alcian blue 8GS、Safranin-O、Fast green は Sigma-Aldrich Corporation から、ベトルフェール、イソジンスクラブは明治製菓 (Tokyo, Japan) から、ドミトール、アンチセダンは日本全薬工業 (Fukushima, Japan) から、ミダゾラムはサンド (Tokyo, Japan) から購入した。

2. 動物

SPF 環境下、12 時間の明暗サイクルおよび餌と水は随時摂取が可能な条件下で飼育した。すべての動物実験は、三共(株)および第一三共(株)の実験動物倫理委員会にて承認されたものである。

3. 胎児の組織学的評価

妊娠後期の仔の骨格を既報に倣って評価した (21)。簡潔に述べると、妊娠 20 日目のラットを安楽殺して胎児を取り出し、各仔の胎盤を採取してジェノタイピングした。胎児は過剰麻酔により安楽殺した後、95%エタノールで固定してアリザリンレッド S およびアルシアンブルーを用いて骨・軟骨二重染色標本作製した。

4. 血中甲状腺ホルモン測定

イソフルラン吸入麻酔下でトランスジェニックラットまたは同腹のワイルドタイプ個体より尾静脈採血した。採血には、翼付静注針 (テルモ, Tokyo, Japan) および注射筒 (テルモ) を用いた。採取した血液は、マイクロティナ微量採血管 (バクトンディッキンソン) またはキャピジェクト少量採血管 (キャピジェクト, テルモ) に回収し、速やかに転倒混和してから氷冷下で 2 時間程度静置した。少量採血管は遠心機 (Himac CF15-RX II、Hitachi Koki Co.,Ltd.、ローターは T15A39) を用いて遠心 (4°C, 3,000 rpm, 10 min) し、上清 (血清)のみ回収して測定まで冷凍保存した。微量採血管に回収した血液は、ADVIA2120 (SIEMENS, Munich, Germany) で血球数の測定を行った。

5. 外科的な変形性関節症モデルの作製

手術は既報に準じて行った (2, 10)。ラットにベトルフェール/ドミトール/ミダゾラム混合麻酔を 0.5 mL/kg 筋肉内注射し、麻酔する。両足の手術部分を剃毛した後、イソジンスクラブおよびアルコールで消毒する。膝関節内側の皮膚をはさみで切開後、メスまたははさみで膝蓋腱 (脛骨付近) の脇に少し切れ目を入れてから、はさみで膝蓋腱から大腿四頭筋に沿って切り進めた後、膝蓋骨を外側に脱臼させて、関節を露出させる。

右足は、膝内側の側面から筋膜を眼科用はさみ (夏目製作所 N-110-085-ZMK 他) で剥離して内側側副靭帯を露出させ、関節つぎ目付近で側副靭帯をすくい上げるようにしてメス (医療用刃、No.11、Surgical Blade、Feather) で切断した後、関節の前後に関節包を切り進み、内側半月板を露

出させる。半月板の付着組織をメスで剥離した後、ピンセット（No.7、夏目製作所）で半月板を引っ張り出す。前面からピンセットで半月板をつまみながら、半月板と脛骨の付着部をメスまたは眼科用はさみで切り、内側半月板を摘出する。足を伸展し、膝蓋骨を元の位置にもどした後、膝蓋腱の大腿骨側の付着部付近から筋膜をすくい、ナイロン 4-0（形成外科用角針、弱彎、号数：4-0、夏目製作所）で1針縫合、2針目は膝蓋腱あたりで縫う。最後に皮膚を自動縫合器（夏目製作所）で縫合する。

左足は、偽手術（Sham）として、関節包を切開し膝蓋骨を脱臼した後、縫合する。

以上の手術はすべて滅菌した器具を用いて、清潔に行う。手術終了後は、アンチセダンを 0.1 mL/kg 筋肉内注射して覚醒させる。ただし、覚醒後は無痛状態で他個体の手術部をかじるため、しばらくは個飼いにする。

6. 膝関節組織の免疫染色（Safranin-O, Col10）および軟骨損傷スコアリング

評価に供するラットを二酸化炭素により安楽殺させる。後肢の皮膚を切除してから大腿骨頭より外す。大腿骨頸部および足首付近で骨を切断し、周囲の肉を除いた後に氷冷した 10% 中性緩衝ホルマリンに浸けて 4°C で数日かけて固定した。10% EDTA（pH 7.4）で十分に脱灰した後、エタノールで脱水し、パラフィン包埋した。クライオスタットで薄切して最も損傷が重篤な部位を選んで Safranin-O-fast green 染色を行った。さらに、第3章第2節と同様の方法で免疫染色を行った。関節軟骨の損傷は、ラット OARSI スコアリングに準じて点数化した（2）。

7. 統計解析

有意差検定には、SAS, Version 8.2（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用い、F検定で分散が等しいものはt検定、等しくないものはWelch検定で解析を行った。

第3節 結果

1. 遺伝子改変による骨格形成および成長への影響検討

骨格形成期の仔における遺伝子改変の影響を検討するため、トランスジェニックラットと野生型ラットを交配させて妊娠 20 日目の胎児の骨格検査を行った。骨格異常、骨格変異、骨化進行度について検討したが、両群で優位な差は認められなかった（図表 5-3）。

Dio1-3 のノックアウトマウスでは、血中甲状腺ホルモン濃度の変動や体重変化が報告されているため、これらについて検討した。体重は生後 6 週目から 60 週目まで経時的に測定したが、雌の 25 週齢および 30 週齢で差が認められたが、その後は差が認められなかったことから、遺伝子改変による影響はないものと考えられる（図表 5-4）。また、生後 20, 40, 60 週目の血中 T3 および T4 濃度を測定したが、遺伝子改変による影響は認められなかった（図表 5-5）。以上のことから、軟骨組織特異的な Dio2 発現亢進は、骨格形成や血中甲状腺ホルモン量には影響を及ぼさないことが示された。

2. 遺伝子改変による関節軟骨への影響検討

ヒト Dio2 を軟骨特異的に発現させた影響を検討するため、20 週齢ラットの膝関節軟骨を評価した。関節軟骨の厚さは変わらず、また損傷も認められなかったが、細胞の形態を観察したところ、トランスジェニックラットの関節軟骨深層では関節軟骨の肥大化が認められた（図表 5-6 矢印）。この結果は、図表 3-8 で示した組織培養での結果と一致する。さらに、全身の骨格への変化を検討するため、X 線撮影を行ったが、目立った変化は認められなかった（図表 5-7）。ヒト由来のタンパクをラットで発現させたことで、免疫応答が起こってしまう可能性が完全には否定できないが、一般的には、発生期から異種のタンパクを発現させることで免疫寛容が起こるものと考えられる。実際、マウスにヒト Dio2 を発現させた報告では、Dio2 は排除されずに生物学的な機能を示している（22）。そこで、幼弱ラットの関節で免疫応答による関節炎が起きていないか確認したが、顕著な変化は認められなかった（図表 5-8）。さらに、血中の白血球数を測定したが、変動は認められなかった（図表 5-9）。以上のことから、ヒト Dio2 タンパクが免疫反応を引き起こしている可能性は低いものと考えた。

3. メカニカルストレス負荷による変形性関節症動物モデルでの評価

大腿骨と脛骨の関節軟骨の間には半月板が挟まっており、十分なスペースが確保されるとともに、軟骨同士が直接ぶつからないようにクッションとなり、膝の円滑な運動を助ける役割を果たしている。そこで次に、17 週齢のラットの内側半月板を切除することで過剰なメカニカルストレスをかけて変形性膝関節症を誘導し、その 3 週間後に膝関節の組織学的な評価を行った。野生型では軟骨表面の軽度な損傷しか認められないのに対して、トランスジェニックラットでは、過重がかかる部分に関節軟骨の大きな欠損が認められた（図表 5-10）。各ラットで 7 例ずつ検討して、関節軟骨の損傷度合いをスコア化したところ、トランスジェニックラットでは、ワイルドタイプに比べて

有意に関節軟骨の損傷が亢進していた（図表 5-11）。さらに、抗タイプ X コラーゲン抗体を用いて免疫染色を行ったところ、野生型ではあまり染色性が認められなかったが、トランスジェニックラットでは損傷部を中心にタイプ X コラーゲンの発現亢進が認められた（図表 5-12）。この結果も組織培養での結果と一致する。以上のことから、Dio2 高発現により、変形性関節症の病態が増悪することが動物レベルでも示された。

第4節 考察

ヒト Dio2 の発現を軟骨組織のみに限局したことで、体重や骨格形成、血中甲状腺ホルモン濃度などのノックアウトマウスで認められた表現型に影響を及ぼさない動物を作ることが出来た。体重や骨格異常は変形性関節症のリスクファクターであることから、このような表現系に影響を及ぼさない動物ができたことは、関節軟骨での Dio2 発現亢進の影響を正しく評価するために極めて重要である (23-25)。また、血中甲状腺ホルモン濃度も正常であったことは、関節軟骨以外の組織で Dio2 が発現していないことを示唆している。一方で、今回行った骨格評価は全身評価のみであることから、今後より詳細に成長板軟骨への影響などを検討する必要がある。

ラットに外科的手術を施すことでメカニカルストレスをかけて軟骨損傷を誘導する動物モデルにおいて、トランスジェニックラットでより軟骨損傷が亢進したことは、Dio2 が変形性関節症による軟骨破壊に関わるという私の仮説を強く支持する結果であった。一方、施術していない 20 週齢のトランスジェニックラットでは、関節軟骨の損傷が起こっていなかった。これは、Dio2 の発現亢進は変形性関節症の発症および進行の必要十分条件ではなく、メカニカルストレスや炎症などと相まって病態に関わることを示唆している。この結果は、私が第3章で示した炎症性サイトカインの作用を T3 が増強したことと一致する。また、動物モデルでの軟骨損傷は雌に比べて雄で重篤であった。この結果は、マウスでの報告と一致する (26)。ヒトでは女性の方が変形性関節症の罹患率が高いが、今回の私の検討およびマウスでの検討では、雄のほうが疾患の重症度が高かった。ヒトでは女性が罹患率が高い理由としては、女性の発症率と閉経による女性ホルモンの低下の関連性が考えられる (27)。実際、動物モデルでは、卵巣摘出術を施した雌にエストロゲン補充療法を施すと、変形性関節症の重症度が緩和されることが報告されている (28, 29)。今回評価に用いた動物は 20 週齢と若く、また卵巣摘出も行っていないため、メスでの発症率上昇に繋がらなかったものと考えられる。

私はトランスジェニックラットで軟骨損傷が亢進することを示したが、この検討は 1 ラインの動物でしか行っていない。そのため、ヒト Dio2 が軟骨保護的な遺伝子のゲノム中に挿入されたために、今回の結果が得られた可能性を完全には排除できない。そのため、今後はより多くのラインで検討を行う、または挿入部位を明らかにすることで、この可能性を否定することが必要である。さらに、今回の検討ではトランスジェニックラットでの評価のみであるため、Dio2 ノックアウト動物では軟骨損傷が軽減されるのかを検討することは、極めて意義がある。

第5節 小括

軟骨特異的トランスジェニックラットは骨格形成や体重、および血中甲状腺ホルモン量は正常であった。一方、軟骨特異的 Dio2 トランスジェニックラットでは変形性関節症の病態が増悪することを明らかにした。

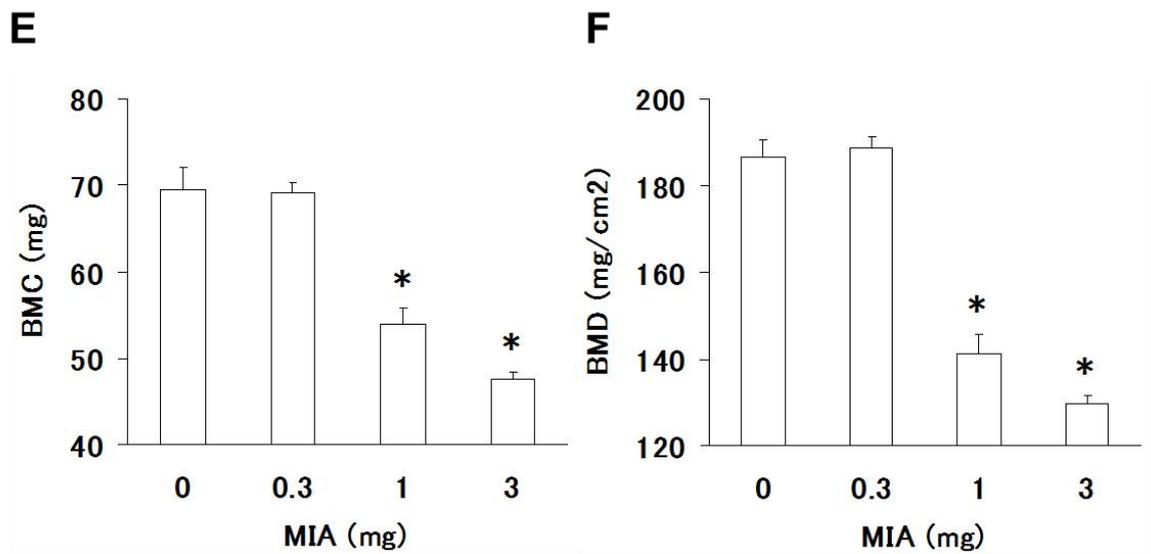
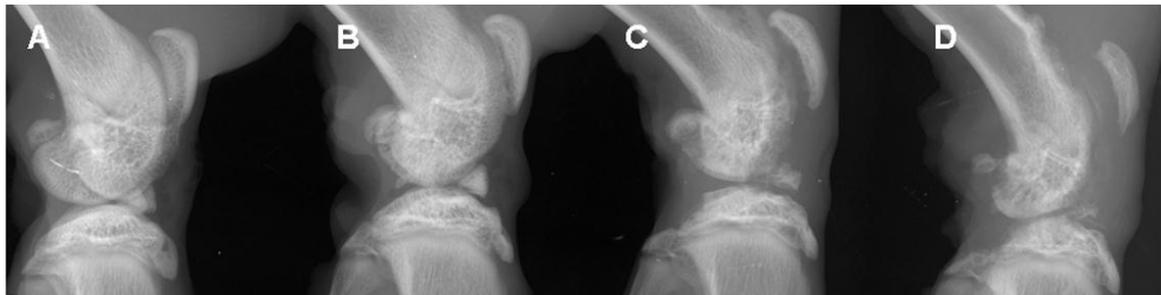
軟骨組織特異的な Dio2 発現亢進は、骨格形成や血中甲状腺ホルモン量および体重には影響を及ぼさないことが示された。この動物の内側半月板を切除することで過剰なメカニカルストレスをかけて変形性膝関節症を誘導したところ、ワイルドタイプラットと比較して有意に関節軟骨の損傷が亢進したことから、Dio2 はメカニカルストレスによる関節軟骨の損傷を促進することが示された。さらに、タイプ X コラーゲンの免疫染色により関節軟骨の肥大分化が亢進していることが示されたことから、Dio2 高発現による変形性関節症の病態進行には関節軟骨細胞の肥大分化が関与することが示唆された。

引用文献

1. Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001;1(4):363-376.
2. Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 3:S24-34.
3. Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 3:S17-23.
4. Kraus VB, Huebner JL, DeGroot J, Bendele A. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the guinea pig. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 3:S35-52.
5. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature.* 2005;434(7033):644-648.
6. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(7):632-641.
7. Janusz MJ, Little CB, King LE, Hookfin EB, Brown KK, Heitmeyer SA, Caterson B, Poole AR, Taiwo YO. Detection of aggrecanase- and MMP-generated catabolic neoepitopes in the rat iodoacetate model of cartilage degeneration. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12(9):720-728.
8. Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(10):785-791.
9. Moore EE, Bendele AM, Thompson DL, Littau A, Waggie KS, Reardon B, Ellsworth JL. Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13(7):623-631.
10. Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, Osborn MN, Sanchez BM, Guzman RE, Hook KE, Juneau PL, Connor JR, Kilgore KS. Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(10):1041-1048.
11. Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, Kidd B, Bevan S, Winter J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain.* 2004;112(1-2):83-93.
12. Wancket LM, Baragi V, Bove S, Kilgore K, Korytko PJ, Guzman RE. Anatomical localization

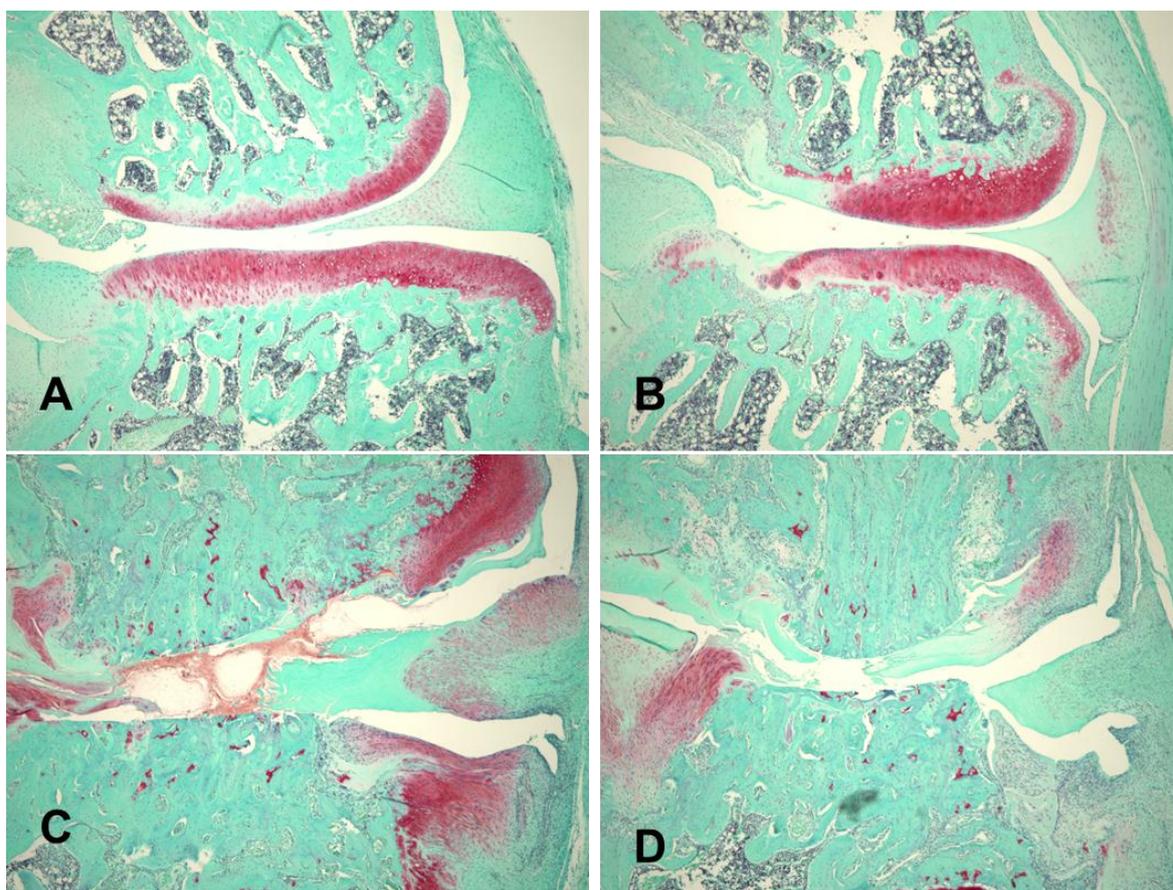
- of cartilage degradation markers in a surgically induced rat osteoarthritis model. *Toxicologic pathology*. 2005;33(4):484-489.
13. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, Rodan GA, Duong le T. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum*. 2004;50(4):1193-1206.
 14. Jean YH, Wen ZH, Chang YC, Hsieh SP, Tang CC, Wang YH, Wong CS. Intra-articular injection of the cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib attenuates osteoarthritis progression in anterior cruciate ligament-transected knee in rats: role of excitatory amino acids. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(6):638-645.
 15. Appleton CT, McErlain DD, Pitelka V, Schwartz N, Bernier SM, Henry JL, Holdsworth DW, Beier F. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):R13.
 16. Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duong le T. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone*. 2006;38(2):234-243.
 17. Yorimitsu M, Nishida K, Shimizu A, Doi H, Miyazawa S, Komiyama T, Nasu Y, Yoshida A, Watanabe S, Ozaki T. Intra-articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(7):764-771.
 18. Karahan S, Kincaid SA, Kammermann JR, Wright JC. Evaluation of the rat stifle joint after transection of the cranial cruciate ligament and partial medial meniscectomy. *Comparative medicine*. 2001;51(6):504-512.
 19. Lozoya KA, Flores JB. A novel rat osteoarthrosis model to assess apoptosis and matrix degradation. *Pathology, research and practice*. 2000;196(11):729-745.
 20. Baragi VM, Becher G, Bendele AM, Biesinger R, Bluhm H, Boer J, Deng H, Dodd R, Essers M, Feuerstein T, Gallagher BM, Jr., Gege C, Hochgurtel M, Hofmann M, Jaworski A, Jin L, Kiely A, Korniski B, Kroth H, Nix D, Nolte B, Piecha D, Powers TS, Richter F, Schneider M, Steeneck C, Sucholeiki I, Taveras A, Timmermann A, Van Veldhuizen J, Weik J, Wu X, Xia B. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. *Arthritis Rheum*. 2009;60(7):2008-2018.
 21. Inouye M. Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red S. *Congenital Anomalies*. 1976;16:171-173.
 22. Pachucki J, Hopkins J, Peeters R, Tu H, Carvalho SD, Kaulbach H, Abel ED, Wondisford FE,

- Ingwall JS, Larsen PR. Type 2 iodothyronin deiodinase transgene expression in the mouse heart causes cardiac-specific thyrotoxicosis. *Endocrinology*. 2001;142(1):13-20.
23. Wluka AE, Lombard CB, Cicuttini FM. Tackling obesity in knee osteoarthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2012.
24. Brouwer GM, van Tol AW, Bergink AP, Belo JN, Bernsen RM, Reijman M, Pols HA, Bierma-Zeinstra SM. Association between valgus and varus alignment and the development and progression of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 2007;56(4):1204-1211.
25. Sharma L, Song J, Dunlop D, Felson D, Lewis CE, Segal N, Torner J, Cooke TD, Hietpas J, Lynch J, Nevitt M. Varus and valgus alignment and incident and progressive knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(11):1940-1945.
26. Ma HL, Blanchet TJ, Peluso D, Hopkins B, Morris EA, Glasson SS. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(6):695-700.
27. Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, Buyuktur AG, Hochberg M, Jamadar DA. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2481-2487.
28. Sniekers YH, Weinans H, Bierma-Zeinstra SM, van Leeuwen JP, van Osch GJ. Animal models for osteoarthritis: the effect of ovariectomy and estrogen treatment - a systematic approach. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(5):533-541.
29. Roman-Blas JA, Castaneda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):241.



図表 5-1 関節内 MIA 投与による関節破壊

関節内に (A) Saline、(B) 0.3 mg、(C) 1 mg、(D) 3 mg MIA を投与して、28 日後の関節破壊を X 線撮影した。骨塩量 (BMC) および骨密度 (BMD) を測定した。

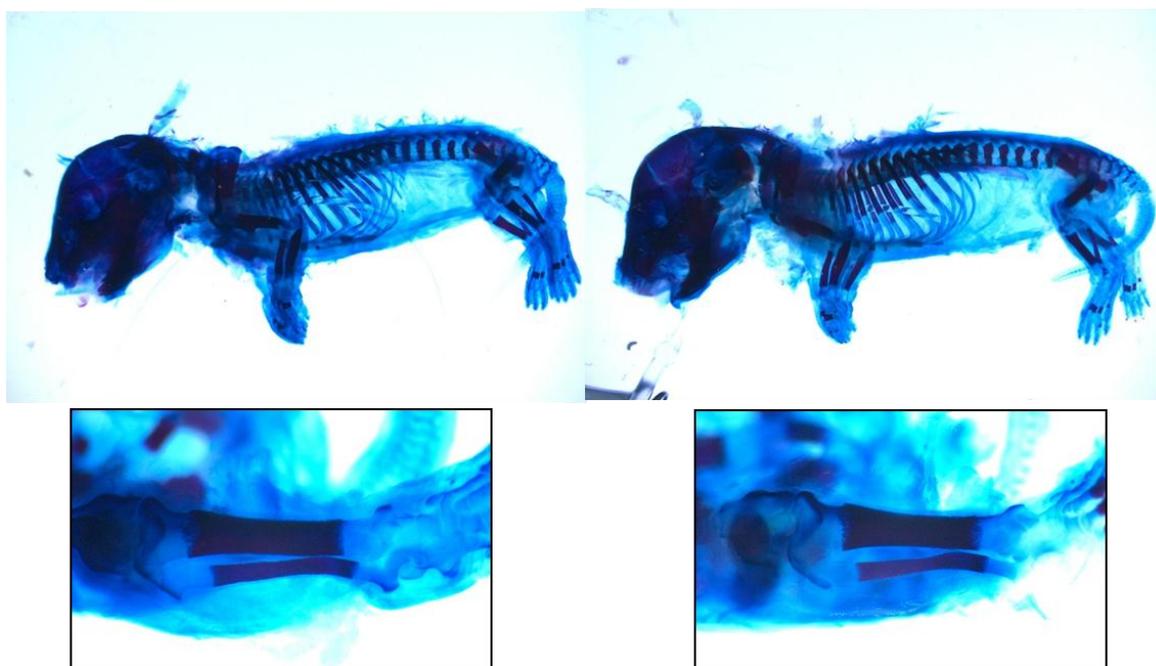


図表 5-2 関節内 MIA 投与ラットの関節軟骨組織学的評価

関節内に (A) Saline、(B) 0.3 mg、(C) 1 mg、(D) 3 mg MIA を投与して、28 日後の膝関節をサフラン-O 染色して組織学的に評価した。

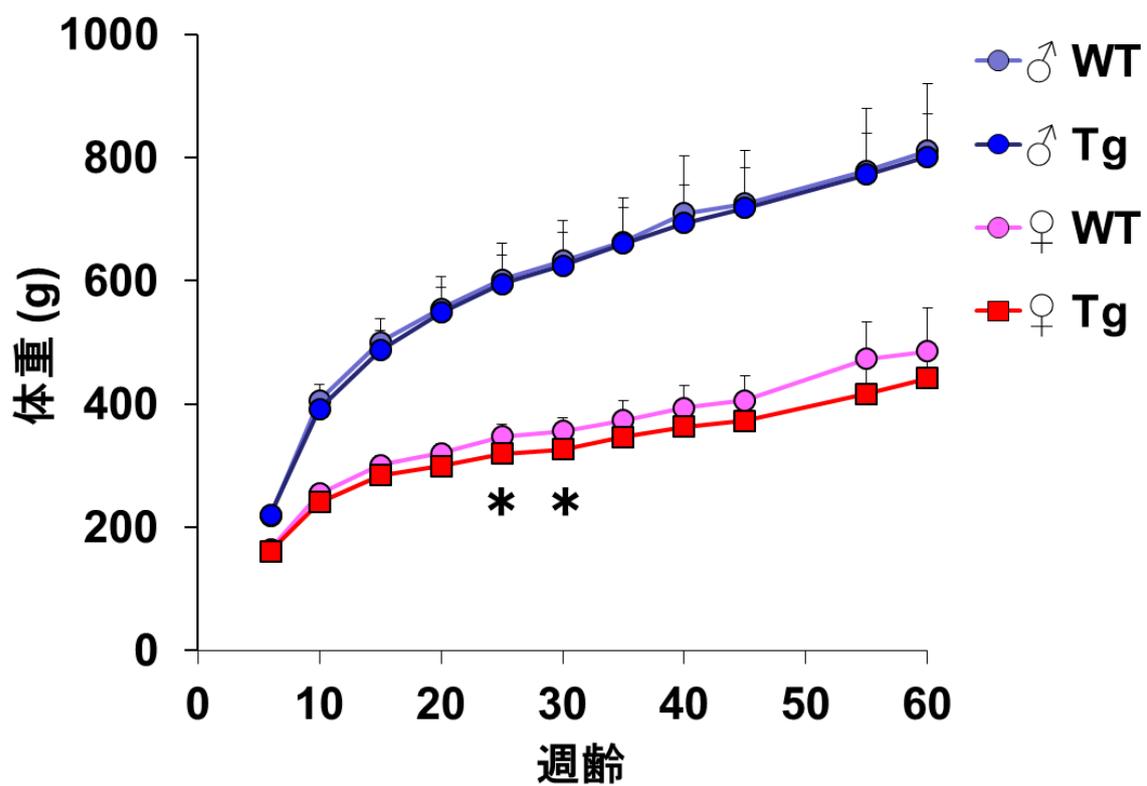
野生型

トランスジェニック



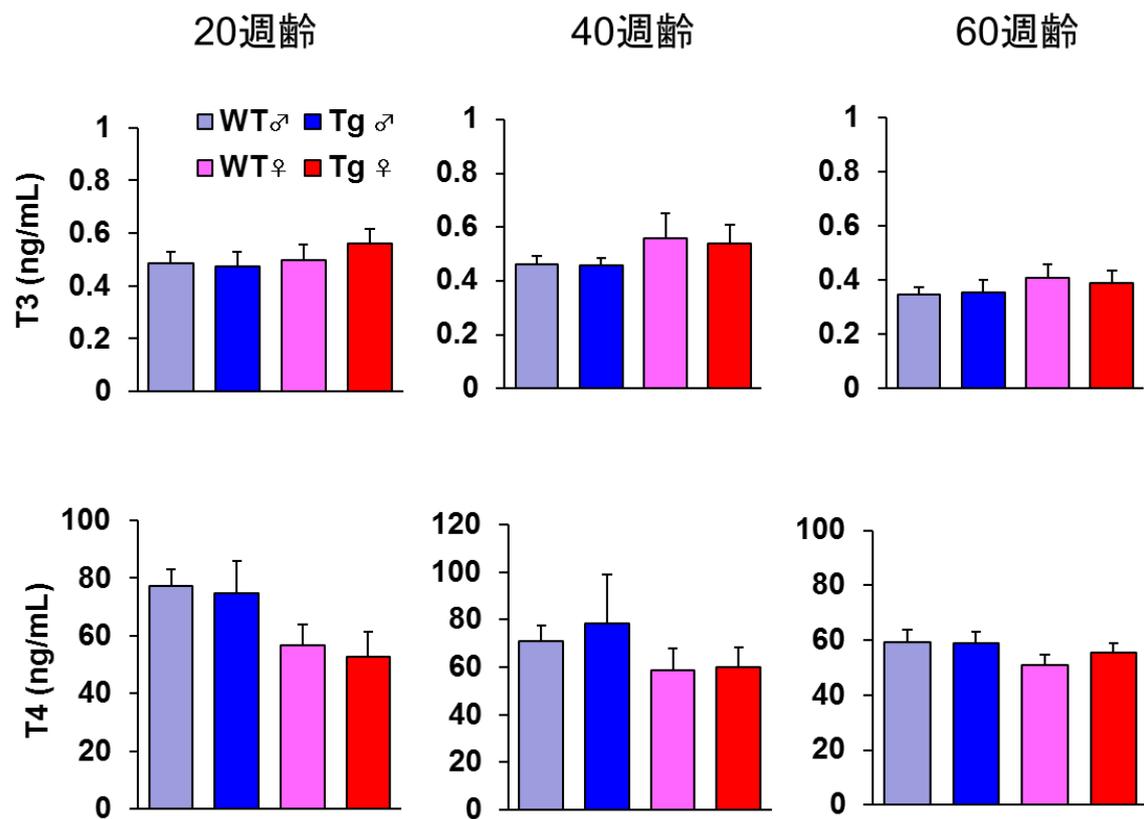
図表 5-3 骨格形成期の仔における遺伝子改変の影響を検討

トランスジェニックラットと野生型ラットを交配させ、妊娠 20 日目の胎児の骨格異常、骨格変異、骨化進行度を検討した。



図表 5-4 軟骨特異的ヒト Dio2 トランスジェニックラットの成長モニタリング

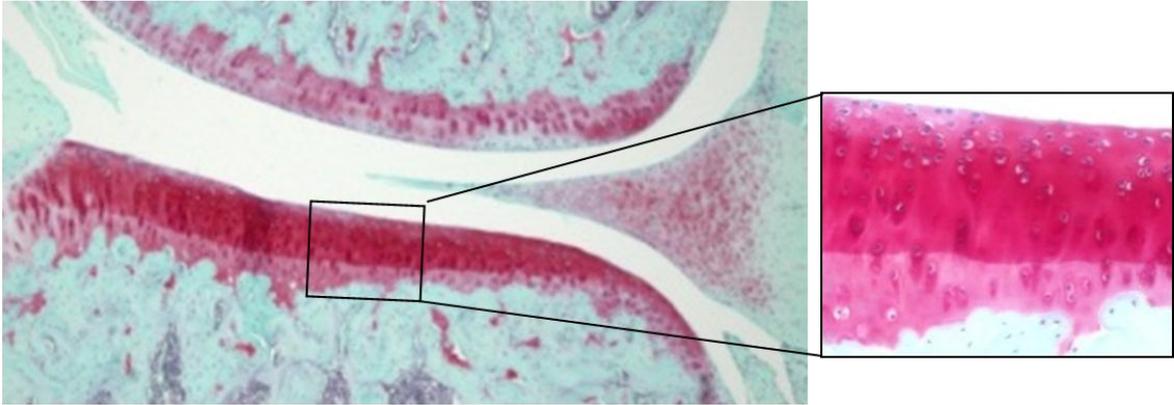
野生型およびトランスジェニックラットの雌雄について、生後 6 週目から 60 週目まで経時的に体重を測定した。



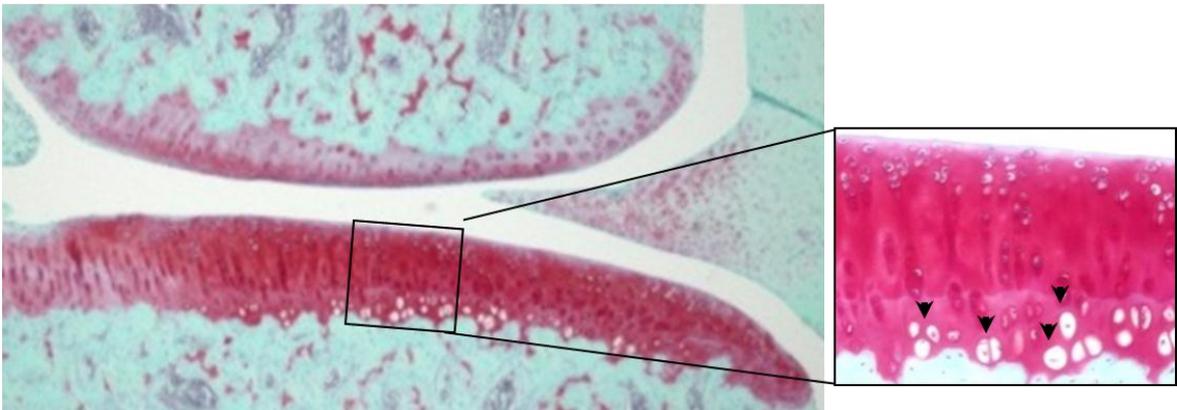
図表 5-5 軟骨特異的ヒト Dio2 トランスジェニックラットの血中甲状腺ホルモン濃度

野生型およびトランスジェニックラットの雌雄について、生後 20, 40, 60 週目の血中 T3 および T4 濃度を測定した。

野生型



トランスジェニック

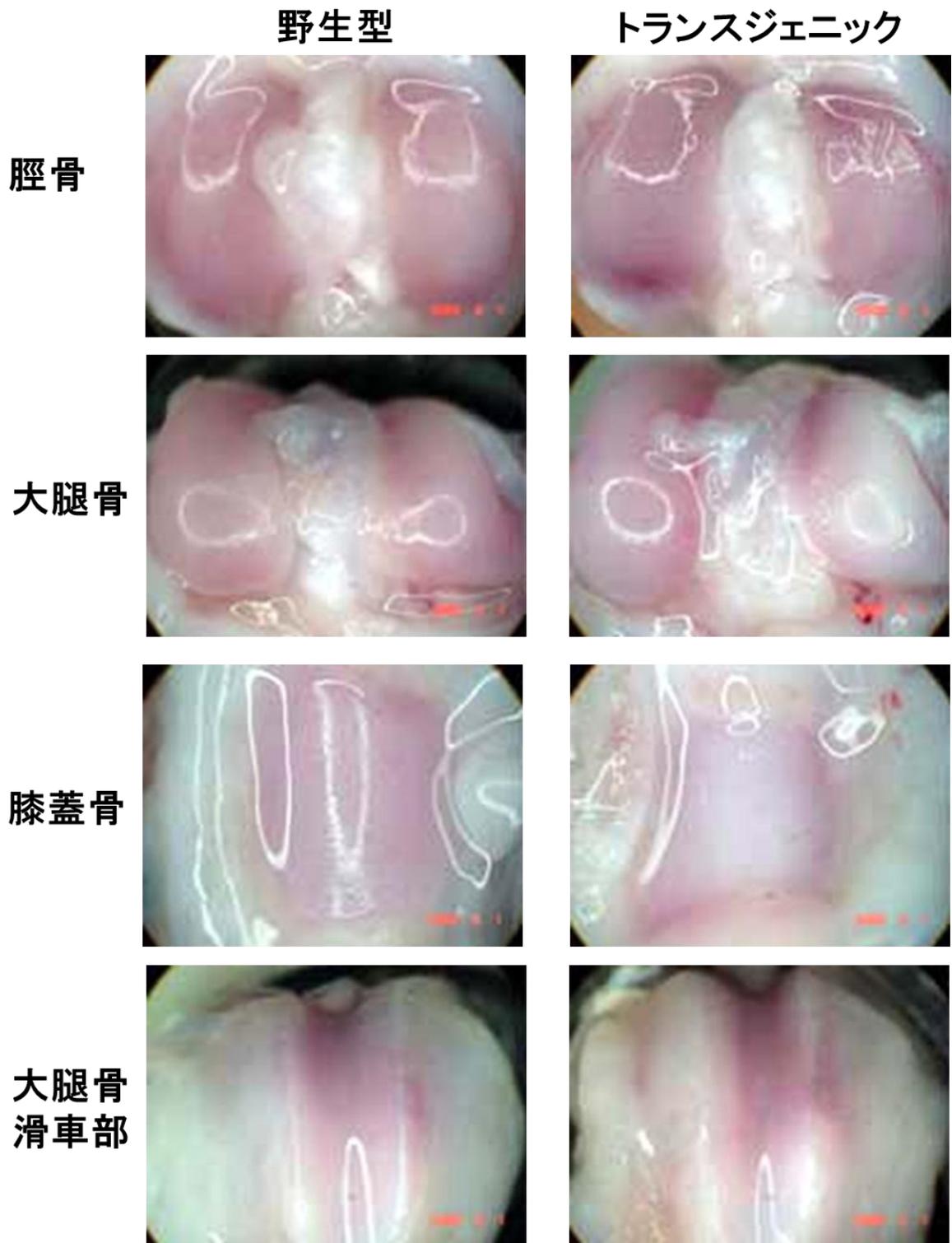


図表 5-6 軟骨特異的ヒト Dio2 トランスジェニックラットの関節軟骨

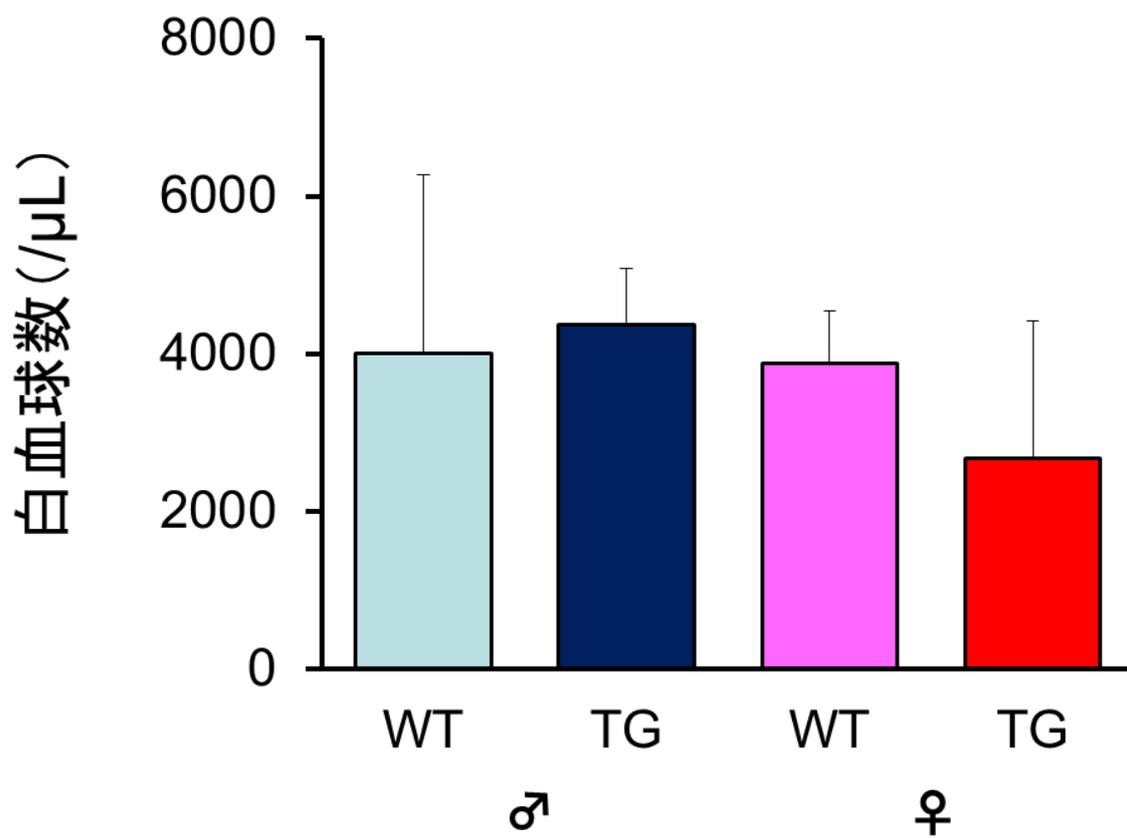
20 週齢ラットより膝関節軟骨切片を作製し、サフランニン O 染色した。肥大化した関節軟骨細胞を矢頭で示した。



図表 5-7 軟骨特異的ヒト Dio2 トランスジェニックラットの骨格
10 週齢ラットの全身骨格を X 線撮影した。

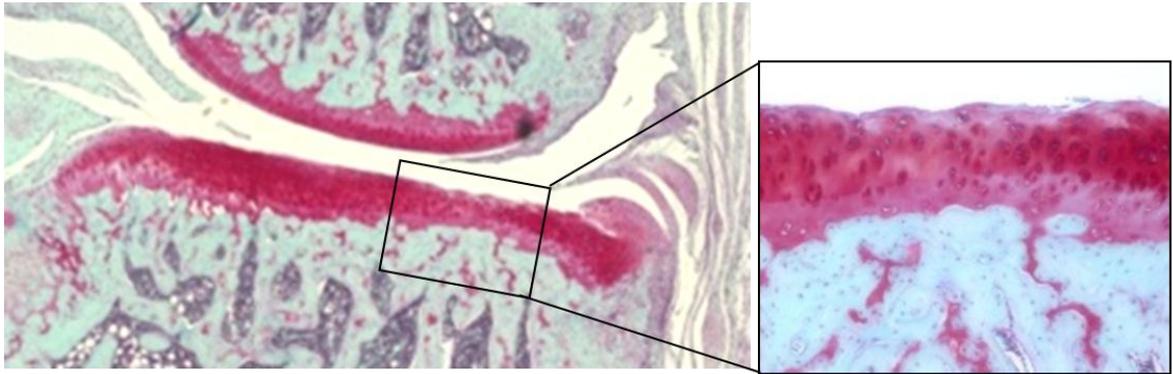


図表 5-8 軟骨特異的ヒト Dio2 トランスジェニックラットの関節軟骨
野生型およびトランスジェニックラットの膝関節軟骨の組織像

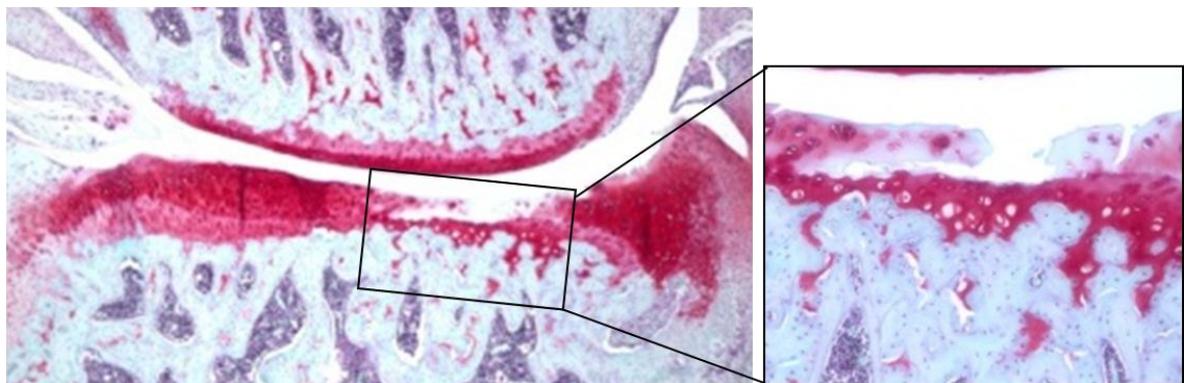


図表 5-9 軟骨特異的ヒト Dio2 トランスジェニックラットの血中白血球数

野生型

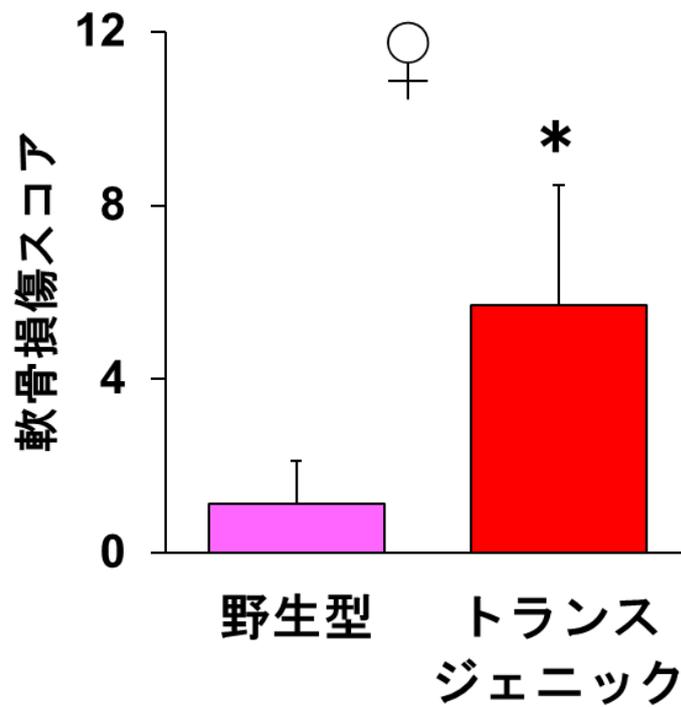
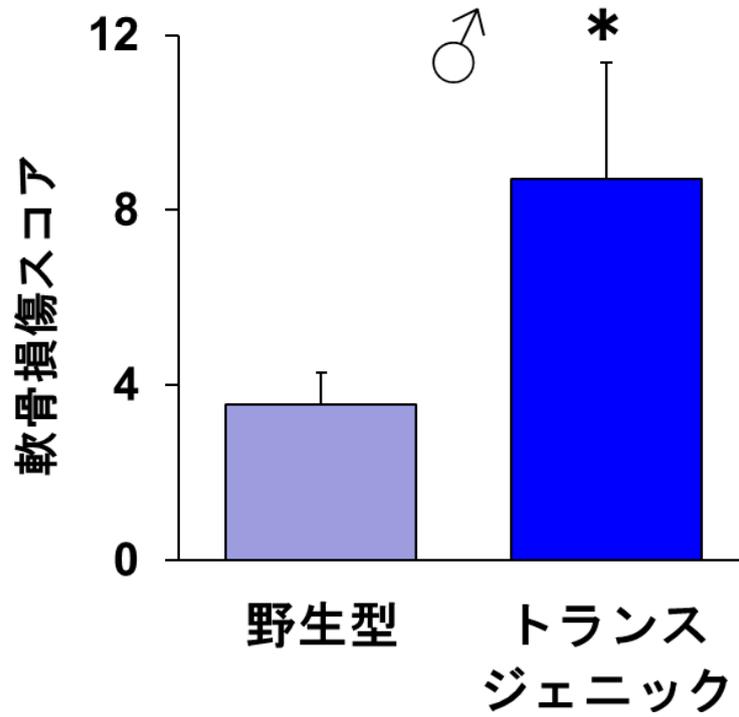


トランスジェニック



図表 5-10 メカニカルストレス負荷による変形性関節症の病態進行

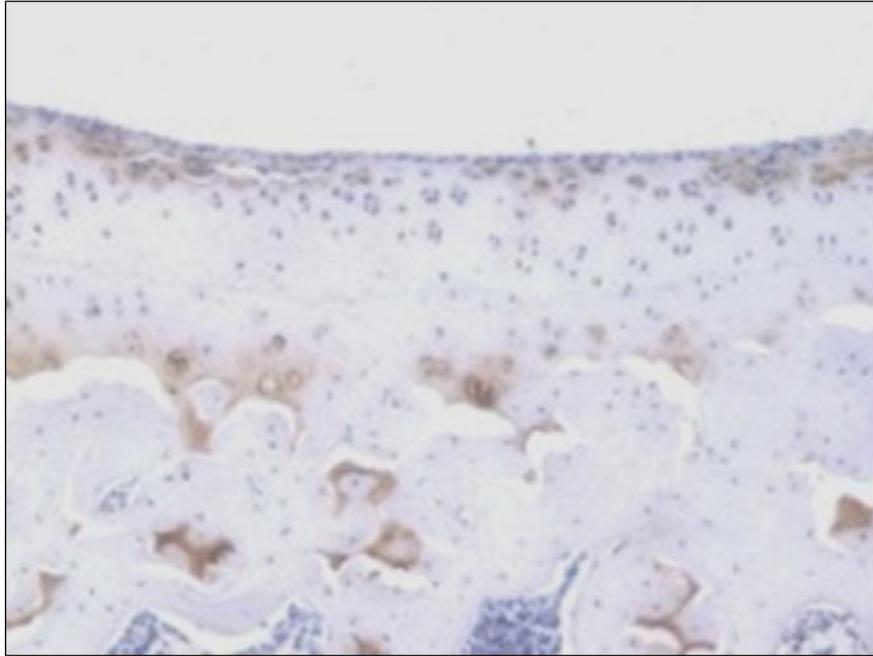
17 週齢の野生型およびトランスジェニックラットの内側半月板を切除し、その 3 週間後に膝関節の組織学的な評価を行った。



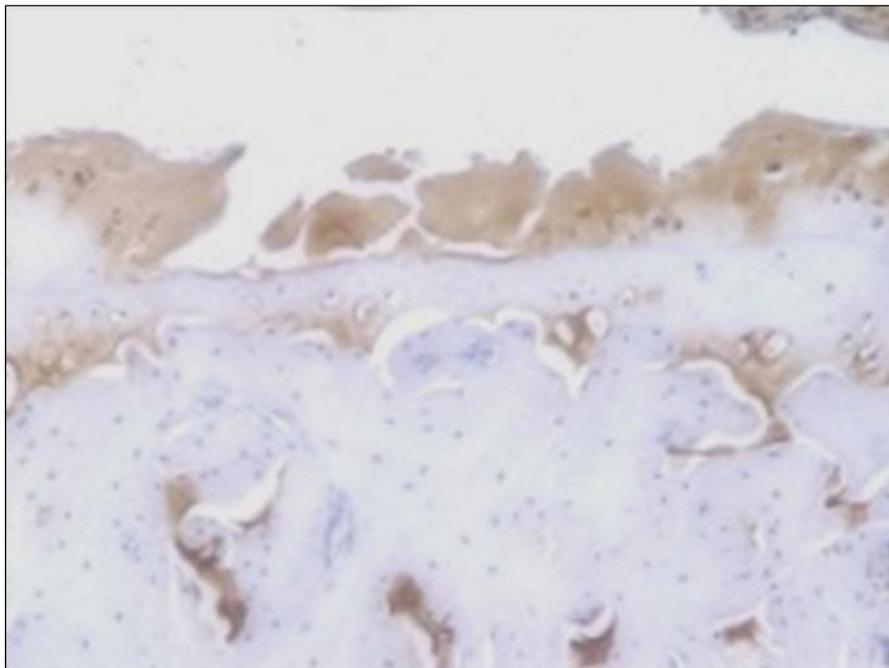
図表 5-11 メカニカルストレス負荷による変形性関節症の病態進行度合い

野生型およびトランスジェニックラットの内側半月板を切除し、その3週間後の関節軟骨の損傷度合いをスコア化した。

野生型



トランスジェニック



図表 5-12 メカニカルストレス負荷による軟骨損傷部でのタイプ 10 コラーゲン発現

第5章 総括

変形性関節症の根本的治療薬の探索を目的として、ヒトの臨床サンプルを用いたマイクロアレイ解析を行った。人工膝関節置換術の際に採取した関節軟骨と、心不全や肺炎など他の疾患で亡くなった患者の剖検により得られた関節軟骨を材料として用いた。内部標準遺伝子は発現変動が認められなかったが、既知の発現変動遺伝子は報告どおり著しい変動が認められたことから、信頼性が高い解析データであることが示された。そこで、変形性関節症で発現変動している遺伝子を抽出したところ、非常に多くの発現変動遺伝子が見出された。

変形性関節症の関節軟骨と胎生期の成長軟骨では共通するメカニズムが働くのではないかと考え、発現変動遺伝子の中で、変形性関節症で発現が大きく上昇していて、かつ代謝産物が成長軟骨の肥大分化に関わることが報告されている Dio2 に着目した。Deiodinase には 1-3 のファミリーが存在するため、Dio1,3 の発現を検討したところ、Dio1 は検出限界以下であり、Dio3 は変形性関節症で有意な発現変動を認めなかった。

Dio2 の発現量が多い組織として、甲状腺や褐色脂肪細胞などが知られているが、関節軟骨は主要な臓器ではないため、これまで発現量の検討が行われていなかった。そこでラットの膝関節軟骨での Dio1-3 の発現量を比較したところ、関節軟骨での Dio2 の発現量は、Dio1 および 3 に比べて極めて高いことが示された。さらに、様々な臓器より RNA を抽出して Dio2 発現量を比較したところ、関節軟骨での Dio2 発現量は、高発現組織として知られる褐色脂肪と同程度に高いことが初めて示された。

次に、軟骨細胞の肥大分化に対する Dio2 の作用を検討するため、初代培養軟骨細胞を T3 または T4 で刺激して軟骨細胞の肥大分化マーカーを測定したところ、T4 を T3 に変換する Dio2 は、軟骨細胞の肥大分化を亢進させることが示唆された。さらに、軟骨細胞を T3 で刺激して遺伝子発現変動を検討したところ、T3 刺激によって細胞の肥大分化によって発現亢進することが知られている遺伝子の発現上昇が認められた。また、変形性関節症の患部では、しばしば炎症が認められることから、関節軟骨細胞を炎症性サイトカインである IL-1 α 単独、または IL-1 α と T3 で刺激して遺伝子発現を検討したところ、T3 は IL-1 α による関節軟骨細胞外基質の分解酵素の発現上昇をさらに亢進させることが示された。

軟骨細胞は、単層培養により形質が変わってしまうことがあるため、より生理的条件に近い組織培養系においても同様の変化が認められるかを検討したところ、細胞の肥大分化によって発現亢進することが知られている遺伝子の著しい発現上昇が認められた。また、タイプ X コラーゲンの免疫染色によりタンパクレベルでも軟骨細胞の肥大分化の亢進が認められた。以上の結果から、Dio2 によって産生される甲状腺ホルモンは、生理的には分化能をもたない関節軟骨細胞および関節軟骨組織において肥大分化を亢進することが示された。

Dio2 の変形性関節症病態への関与を明らかにするため、変形性膝関節症患者と同様に、軟骨特異的に Dio2 を高発現するトランスジェニックラットを作製し、酵素活性をもったヒト Dio2 が軟骨組織特異的に発現するラットの作製に成功した。また、軟骨組織特異的な Dio2 発現亢進は、骨格

形成や血中甲状腺ホルモン量には影響を及ぼさないことが示された。そこで次に、内側半月板を切除することで過剰なメカニカルストレスをかけて変形性膝関節症を誘導し、膝関節の組織学的な評価を行った。ワイルドタイプでは軟骨表面の軽度な損傷しか認められないのに対して、トランスジェニックラットでは有意に関節軟骨の損傷が亢進していた。さらに、タイプ X コラーゲンの免疫染色により関節軟骨の肥大分化が亢進していることが示され、Dio2 高発現により変形性関節症の病態が増悪することが動物レベルでも示された。

以上の結果から、Dio2 は変形性関節症の病態進行に重要な役割を果たすことが示唆され、この酵素の阻害剤は、変形性関節症の根本治療薬となることが期待される。

公表文献

Nagase H, Kumakura S, Shimada K. Establishment of a novel objective and quantitative method to assess pain-related behavior in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rat knee. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 65(1):29-36 2012.

Nagase H, Nagasawa Y, Tachida Y, Sakakibara S, Okutsu J, Suematsu N, Arita S, Shimada K. Deiodinase 2 upregulation demonstrated in osteoarthritis patients cartilage causes cartilage destruction in tissue-specific transgenic rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 21(3):514-23 2013.

謝辞

本学位論文の発表および作成にあたり、終始ご懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院 薬学系研究科 薬科学専攻 生物薬科学大講座衛生化学 新井 洋由教授に深く感謝申し上げます。

本研究の発表の機会を与えて下さり、本研究遂行において当初より懇切なるご指導ご助言を賜りました第一三共株式会社 蔵方 慎一博士に深く感謝申し上げます。

本研究の発表の機会を与えて下さり、懇切なるご指導ご助言を賜りました同 磯野 藤男博士に深く感謝申し上げます。

本研究を行う機会を与えて下さいました同 熊倉 誠一郎博士に深く感謝申し上げます。

本研究を実施するにあたり、多くのご指導ご助言を賜りました同 嶋田 康平博士に深く感謝申し上げます。

また、本研究にご協力いただきご助言を賜りました同 長澤 康男博士、今村 ことよ博士、奥津潤一研究員、榊原 佐知子研究員、多くのご協力をいただきました須田 幸治博士、舘田 悠樹研究員、加藤 康子研究員、下村 和裕博士、本研究に関して多くのご助言を賜りました同 窪田 一史博士をはじめとする同 旧生物医学第三研究所第一グループの皆様、同 先端医薬研究所の皆様にご深く感謝申し上げます。

最後に、本学位論文の作成にあたり、精神的な支えとなってくれた家族にあらためて感謝の意を表します。

2013年5月

永瀬 弘之