

論文の内容の要旨

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

氏名：永瀬 弘之

【序論】

膝関節は、骨の関節面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、滑らかな表面によりスムーズな関節稼動を可能にしている。しかし変形性膝関節症では、関節軟骨が変性・磨耗し、関節の端の部分には骨棘と呼ばれる骨の異形成が認められる。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だが、病気の進行と共に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ばせず、日常生活に大きな支障をきたす。国内の患者数は約 2500 万人と推測されるが、根本治療薬はない。対症療法として鎮痛薬が使われているが、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、根本治療薬の開発が切望されている。

そこで私は、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査した。次に、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とした。最後に、この標的遺伝子を強制発現させた動物に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を目指した。

1. 疾患根本治療標的分子の探索

患者の関節軟骨で発現変動する遺伝子を網羅的に探索するため、マイクロアレイを実施した。変形性関節症のサンプルは、人工膝関節置換術の際に採取した関節軟骨を用いた。対照には、心不全や肺炎などで亡くなった患者の剖検により得られた、非損傷関節軟骨を

用いた。変形性膝関節症 13 症例、剖検 11 症例分の関節軟骨より RNA を抽出して、マイクロアレイに供した。各サンプルでの遺伝子発現を比較すると、群間で発現変動している遺伝子が多数見つかり、この中に根本治療を実現するための標的分子があるのではないかと考えられた。そこで次に、内部標準として用いられる遺伝子、および既知の発現変動遺伝子について発現を比較した。内部標準遺伝子は発現変動が認められなかつたが、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。この結果から、私の解析データは信頼性が高いことが示された。

関節軟骨を構成する軟骨細胞は、生理的条件では増殖・分化しない静止軟骨細胞だが、メカニカルストレスや炎症により、異常な細胞増殖や肥大分化が起こる。さらに、細胞外マトリックスの分解酵素により、軟骨破壊や骨棘形成が引き起こされる。一方、成長期にのみ見られる成長軟骨では、軟骨細胞が増殖から肥大化、細胞死というプロセスを経て骨が形成される。このため、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られ始めている。そこで私は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た Deiodinase 2（以下 Dio2）に着目した。Dio2 の代謝産物である甲状腺ホルモンは成長軟骨の肥大分化に関わることが報告されている。

マイクロアレイで認められた変化を qPCR で確認した。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、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つた。

2. Dio2 の軟骨における作用解析

Deiodinases は甲状腺ホルモンの合成・分解に関与する酵素で、甲状腺から分泌された T4 は、Dio1 または 2 によって脱ヨウド化され、より活性の強い T3 に変換されることが知られている。また、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、関節軟骨での発現は、これまで十分に検討されてこなかつた。そこで私は、ラットの膝関節軟骨での Dio1-3 の発現量を比較した。RNA 量あたりのコピー数を比較したところ、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、ラットの様々な臓器より 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 の作用を検討した。ラットの関節軟骨より酵素処理によって軟骨細胞のみを単離して培養した。この軟骨細胞を甲状腺ホルモンである T3 または T4 で刺激して、肥大分化マーカーであるアルカリリフォスファターゼ活性を測定したところ、T3 は 1 pM 程度から活性を亢進させ、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つた。このことから、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、初代培養軟骨細胞を 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。

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-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。

これまでの検討に用いた初代関節軟骨細胞は、単離後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検討した。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、肥大化関連遺伝子の発現量が数倍から数十倍に上昇することが示された。また、T3刺激軟骨組織を抗タイプ10コラーゲン(Col X)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。さらに、軟骨細胞の肥大化も認められた。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。

3. 軟骨特異的トランスジェニックラットの作製および評価

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(以下 Tg ラット)を作製した。これまでに軟骨特異的な Tg ラットは作成されていない。そこで私は、軟骨特異的に発現することが知られているタイプ2コラーゲンのゲノム配列のうち、第1エキソン中に存在する開始コドン ATG 直下にヒト Dio2 のゲノム配列を挿入し、このコンストラクトを受精卵に注入することで、関節軟骨特異的にヒト Dio2 を発現する Tg ラットを作製した。次に、作製した Tg ラットおよび同腹の野生型ラットの様々な臓器でのヒト Dio2 の発現量と膝関節軟骨での Dio2 活性を測定した。ヒト Dio2 遺伝子の発現は、関節軟骨および剣状突起でのみ認められたことから、発現組織特異性が確認できた。また、関節軟骨での Dio2 活性は、野生型に比べて約 10 倍上昇していた。以上の結果から、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。

遺伝子改変による骨格形成への影響を検討するため、胎児を組織染色により評価したが、骨・軟骨形成に影響は認められなかった。さらに、経時的に体重および血中の甲状腺ホルモン量を測定したが、遺伝子改変による影響は認められなかった。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しないことが示された。次に、関節軟骨を組織染色して観察したところ、非手術時には関節軟骨の損傷は認められなかったが、Tg 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。この結果は、組織培養での結果と一致する。

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、軟骨同士がぶつからないようにクッションの役割を果たしている。そこで次に、ラットの内側半月板を切除することで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、Tg 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。各 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、Tg ラットでは、野生型に比べて有意に関節軟骨の損傷が亢進していた。さらに、抗 Col X 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つたが、Tg ラットでは損傷部を中心に Col X の発現亢進が認められた。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。

【まとめ】

ヒトの臨床サンプルを用いた解析により、変形性膝関節症患者の関節軟骨では、Dio2 の遺伝子発現が大幅に上昇していることを初めて見出した。また、関節軟骨では Dio2 が高発現していることを明らかにした。Dio2 の産物である甲状腺ホルモンは、関節軟骨の肥大分化や炎症時の軟骨分解酵素の発現上昇を亢進させることを示した。さらに、軟骨特異的 Tg ラットの作製に初めて成功し、変形性関節症の病態が増悪することを明らかにした。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。