

博士論文

論文題目 転写因子 **HIF-1 α** による関節軟骨の形成・維持の制御機構

氏名 岡田 慶太

目次

要旨	4 頁
第 1 章 序文	5 頁
第 2 章 研究材料および方法	9 頁
2-1. 細胞培養	
2-2. 初代軟骨細胞採取	
2-3. 実験動物	
2-4. マウスの遺伝子型の同定	
2-5. マウスの骨格二重染色	
2-6. 発現ベクターの作成	
2-7. リアルタイム RT-PCR	
2-8. マウス成長板軟骨の組織学的検討	
2-8-1. 免疫組織化学染色	
2-8-2. アポトーシスの評価 (TUNEL 染色)	
2-9. 実験的マウス変形性膝関節症モデルの作出	
2-10. タモキシフェン注射	
2-11. 放射線学的解析	
2-12. 低酸素プローブ	
2-15-1 関節軟骨 <i>in vitro</i> での評価	
2-15-2 関節軟骨 <i>in vivo</i> での評価	
2-15-3 変形性関節症モデルでの評価	

2-13.	基質分解能の評価	
2-14.	統計学的解析	
第3章	結果	18 頁
3-1.	成長板における HIF-1 α の発現解析	
3-1-1.	野生型マウス	
3-1-2.	<i>Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}</i> マウス	
小括 1		
3-2.	cKO マウスを用いた HIF-1 α の骨格形成への関与	
3-2-1.	<i>Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}</i> マウスの骨格・組織	
3-2-2.	<i>Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}</i> マウスの骨格・組織	
3-2-3.	<i>Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}</i> マウスの骨格・組織	
3-2-4.	<i>Coll0a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}</i> マウスの骨格・組織	
3-3.	<i>Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}</i> マウスの成長板軟骨評価	
3-2-1.	構造評価	
3-2-2.	免疫組織化学染色	
3-2-3.	TUNEL 染色	
3-2-3.	リアルタイム RT-PCR による発現解析	
小括 2		
3-4.	HIF-1 α による変形性関節症への関与	
3-4-1.	マウス変形性関節症における HIF-1 α の発現解	
3-4-2.	マウス変形性関節症における関節軟骨の 酸素濃度変化の検討	
小括 3		
3-5.	軟骨細胞における HIF-1 α の機能解析	
3-5-1.	HIF-1 α の基質分解への関与	
3-5-2.	軟骨細胞における HIF-1 α の機能解析 (<i>in vitro</i>)	
小括 4		
第4章	考察	27 頁
第5章	結論	34 頁
謝辞		35 頁
引用文献		36 頁

要旨(300文字)

本研究では関節軟骨の形成・維持における転写因子HIF-1の関与について*in vitro*および*in vivo*の両面から詳細な解析を行った。HIF-1 α の成長板軟骨における発現解析、および軟骨分化の各段階でコンディショナルノックアウトマウスを作出し、関節軟骨形成への関与、さらにマウス外科的変形性関節症モデルを用いて関節軟骨恒常性維持への関与も検証した。その結果、HIF-1 α は関節形成・維持に必須の遺伝子であり、HIF-1 α が欠損することで一部HIF-2 α を介してMmp13、Mmp9などの基質分解酵素の発現が上昇し、アポトーシスが亢進することが分かった。

序文

生体内の細胞や臓器が生存するためには栄養や酸素は不可欠な要素であり、主に血流によって運搬されている。しかし血流の豊富な臓器もあれば角膜や椎間板など血管に乏しい臓器もあり、無血管臓器の代表格が関節軟骨である。関節軟骨は関節液から栄養や酸素供給を直接受け恒常性を維持するが、血流の豊富な組織と比べ低酸素環境に置かれており、低酸素耐性能に優れていることが知られている(1,2)。関節内の酸素環境は関節液の酸素濃度に依存し、通常6-9%に保たれているが変性や炎症によってさらに低下することが報告されている(3)。しかしこれらの報告は関節液を解析した結果であり、関節軟骨の表面から深層にかけての酸素濃度がどのように分布しているかを示すものではない。数学的モデルを用いて関節軟骨が深層にいくほど酸素濃度が低下し、約1%まで低下しているとの報告はあるが、生体内で変性に伴う変化も含めた詳細な検討はなされていない(4)。そこで我々は低酸素環境に置かれている関節軟骨細胞がどのように適応しているかに着目し、低酸素環境下で生存するのに必須と言われる低酸素誘導因子(Hypoxia inducible factor, HIF)、特にHIF-1 α について研究を行うこととした。

低酸素誘導因子HIFはBasic-helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim (bHLH/PAS)ファミリーに属する転写因子で1995年に同定されて以降(5,6)、癌、血管新生、造血、細胞周期など様々な分野で研究されてきた(7)。 α 、 β のサブユニットが二量体を形成することではじめて作用するのだが、 α サブユニットは酸素濃度により厳密に制御されている。 α サブユニットには1 α 、2 α 、3 α の3種類があり、特に1 α 、2 α の研究が盛んに行われている。HIF-1 α とHIF-2 α はアミノ酸レベルで高い相同性を示し、構造的にもN末端側にbasic helix-loop-helix 領域とPer-ARNT-Sim homology (PAS)領

域を持ち、C末端側に転写活性ドメインN-terminal trans-activation domain (N-TAD) とC-terminal trans-activation domain (C-TAD)を有している (図1)。タンパクの安定性を担うoxygen dependent degradation (ODD) ドメインがあり、この領域に存在するプロリン残基が通常酸素状態ではProlyl hydroxylase domain containing protein (PHD) によって水酸化され、von Hippel Lindau因子と複合体を形成してユビキチン化された後、プロテアソームによって分解される (図2)。ところが低酸素環境では α サブユニットが分解されず、 β サブユニットと二量体を形成し、低酸素応答配列 (Hypoxia Response Element, HRE) へ結合することで低酸素下における細胞生存、代謝調節、血管新生など生命維持に必要とされる多様な遺伝子発現を制御している (図2) (8、9)。

このように構造の似たHIF-1 α とHIF-2 α であるが、低酸素環境での安定性や下流の標的遺伝子は臓器や細胞種により同様の作用を示すこともあれば、正反対の作用を示すこともあり (10)、それぞれの制御機構や作用機序について不明な点が多く残されている。

基礎研究の分野ではHIF-1 α は糖代謝、細胞周期、造血や血管新生、そして最近ではオートファジーへの関与が知られている (11-15)。HIF-1 α は低酸素環境下で細胞生存を促す方向に作用し、現在までに100個以上の標的遺伝子を制御することがわかっている。例えば、低酸素環境下ではエネルギー産生が低下するためHIF-1 α がglucose transporter 1 (GLUT 1) や解糖系酵素の発現を促進しエネルギー産生を促進するように作用する (11)。またp21やp27などを介して細胞周期を低下させることでエネルギー消費を抑制することが可能となる (12,13)。さらに低酸素環境を改善するために血管新生を促すvascular endothelial growth factor (VEGF) を誘

導し(16)、erythropoietin (EPO)の発現を促進することで酸素運搬をつかさどる赤血球を増加させる(17)。

臨床分野ではHIF-1 α は癌の領域で盛んに研究が行われ、腫瘍増殖に伴い内部が低酸素になりHIF-1 α の発現が上昇することで腫瘍細胞が生存することが知られている。そこでHIF-1 α の発現を抑制することで腫瘍細胞の生存能を低下させ治療することが試みられている(18)。またHIF-1 α やアイソフォームであるHIF-2 α の発現量が予後予測に有用であることが報告されており、腫瘍内の血管新生を含めて注目されている。また虚血性疾患では慢性腎不全、虚血性心疾患、脳卒中などの病態にHIF-1 α が深く関与しており、臓器保護の観点から様々な研究が行われている(19)。

四肢発生においてHIF-1 α は関節軟骨に重要であることが知られている。HIF-1 α のノックアウトマウスは胎生8日で神経血管系の発育障害により成長しないため(20)、Col2a1プロモーター下にCre recombinaseを発現するマウスとHif1a^{fl/fl}マウスを交配させ軟骨特異的ノックアウトマウスを作製すると四肢および体幹の成長障害が生じて成長板軟骨の中央部が障害される(21)。また同様な実験でPrx1プロモーター下にCreを発現するマウスを用いて四肢間葉系細胞特異的にHIF-1 α をノックアウトすると四肢の短縮とともに関節形成までもが障害される(22)。しかしながらこれら現象の詳細な分子メカニズムは解明されておらず、さらには関節軟骨の恒常性維持のためにどのような作用をしているかは不明である。

我々の研究室では以前より軟骨分化の分子制御機構と変形性関節症発症の分子メカニズムについての研究を中心に行っており、特に軟骨の肥大分化の分子メカニズムが変形性関節症に重要であることに注目し多くの論文を報告している

(23-27)。軟骨内骨化の過程では未分化間葉系細胞が凝集し、その後軟骨前駆細胞、軟骨細胞へと分化して2型コラーゲン (COL2A1) に代表される軟骨特異的な細胞外基質を産生する。sex-determining region Y-type high mobility group box (SOX) ファミリー分子、特にその中のSOX9は軟骨形成のマスター転写因子として機能し、軟骨細胞の発生・分化を制御している。軟骨細胞は増殖しながら成熟し、10型コラーゲン (COL10A1) を分泌する肥大軟骨細胞を含む軟骨成長板を形成する。肥大軟骨細胞の一部は石灰化し、軟骨内への血管侵入とともにアポトーシスに至り、骨への置換が起こる (28)。我々はこの一連の過程が正常軟骨で起こることによって変形性関節症発症が発症すると考えている。その中で肥大分化に重要なX型コラーゲンを強く誘導する遺伝子スクリーニングでみつかったHIF-2 α に注目し、NF κ Bの下流にあつて様々な異化因子を誘導することで変形性関節症の進行を促進することを報告した (29)。そこで本研究ではHIF2 α のアイソフォームであるHIF-1 α に着目し、四肢発生におけるHIF-1 α の機能解析を様々なノックアウトマウスを製作して行った。また関節軟骨の恒常性維持におけるHIF-1 α の機能を解析するために我々が考案したマウス変形性関節症モデル (30) を用いて*in vivo*で検討し、変性の進行に伴う関節軟骨の酸素濃度変化とHIF-1 α の関連についても検証した。そして最後に関節軟骨の形成および恒常性維持に共通するHIF-1 α の機能解析を*in vitro*で検証した。

研究材料

2-1. 細胞培養

マウス未分化軟骨細胞株ATDC5細胞（RIKEN Cell Bank）は1% Penicillin/streptomycin solution（P/S solution、Sigma-Aldrich）と5%Fetal bovine serum（FBS、Sigma-Aldrich）を添加したDulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）/F-12（1:1）（Wako）にて培養した。Interleukin-1 β （Peprotech）はD-MEM/F-12に10 ng/mlの濃度で投与した

2-2. 初代関節軟骨細胞採取

初代関節軟骨細胞は生後5-7日のマウスより大腿骨遠位、脛骨近位、大腿骨頭を採取した。軟部組織を除去した後、0.3%コラゲナーゼD（Roche）を含んだ無血清DMEM/F-12（1:1）を加え、45分インキュベートした。2回攪拌を繰り返した後、0.06%コラゲナーゼDを含んだDMEM/F-12（1:1）を加えovernightでインキュベートし、攪拌・濾過・遠心して採取した。1% P/S solutionと10%FBSを含むDMEM/F-12（1:1）培地で1週間単層培養した。培養は全て37°Cの炭酸ガス培養器中（5%CO₂）で行った。

2-3. 実験動物

Hif1a-floxedマウス(31)は東京大学循環器内科の武田憲彦博士より供与された。*Col2a1-Cre*マウス (32)、*Prx-Cre1* (33)マウスは米国Jackson研究所より購入した。*Sox9-Cre*マウス (34)、*Coll10a1-Cre*マウス (35)は岐阜大学の秋山治彦博士より供与された。*Col2a1-Cre^{ERT2}*マウス (36)はRush UniversityのDi Chen博士より供与された。これらのマウスはC57BL/6 backgroundで維持した。

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

2-4. マウスの遺伝子型の同定

胎生マウスの皮膚あるいは生後 10 日から離乳時期である 21 日までの間のマウスから尾を約 0.5 cm 切断し組織を採取した。これらの組織よりアルカリブレップ法を用いて、ゲノム DNA を抽出した。これを用いて遺伝子上の以下の配列を用いた PCR により、DNA 断片の有無を電気泳動で確認した。

Hif1a forward primer: 5'-CGTGTGAGAAAACCTTCTGGATG-3'
 reverse primer: 5'- AAAAGTATTGTGTTGGGGCAGT -3''
 WT : 565bp、Hif1a floxed : 615bp

Cre forward primer: 5'- GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC -3'
 reverse primer: 5'- GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT -3'
 Cre : 100bp

PCR 条件

Hif1a

1. 94°C (3 min)
2. 94°C (30 sec) , 55°C (30 sec) , 72°C (1 min) × 35 cycles
3. 72°C (2 min)

Cre

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

2-5. マウスの骨格二重染色

胎生 15.5-18.5 日における各遺伝子型のマウス胎仔を帝王切開にて取り出し、皮膚・内臓・その他軟部組織を可及的に取り除き、その骨格全体を 100%エタノールで 1 週間固定した。これをまず 0.3%アルシアンブルー8GX (Sigma) 溶液に浸し、37°Cで 2 日間振盪した。エタノールリンスを 2 日間行った後、次に 0.1%アリザリンレッド S (Sigma) 溶液に浸し、遮光・室温で 12 時間振盪した。その後はグリセリン/1%水酸化カリウム溶液に浸して振盪させ、残存した軟部組織を溶解させた。保存のため、グリセリン濃度は段階的に 50%、80%、100%と上げていった。

2-6. 発現ベクターの作成

解析を行った分子の発現ベクターの作成は、以下のような手順で行った。まず目的遺伝子のcDNA全長の塩基配列をヒトcDNAライブラリーを鋳型として KOD-plusポリメラーゼ (Takara bio) を用いたPCR法によって増幅した。PCR条件は目的遺伝子塩基配列長・デザインしたプライマーの特性に基づいてそれぞれ調節した。次いでこれをサブクローニングした後、PCMV-HAベクター (Clontech) にそれぞれ適切な制限酵素サイトを用いて組み込んだ。得られたクローンの塩基配列はサイクルシーケンス法を用いて確認し、正しく増幅されているものを発現ベクターとしてアッセイに使用した。レトロウィルスベクター作成は、適切な

制限酵素サイトを用いてpMxベクター（東京大学 北村俊雄教授より供与）に組み込んだ後、PlatE細胞（北村俊雄教授より供与）を用いてパッケージングを行った(37)。トランスフェクションは目的の細胞にレトロウィルス液とポリブレンを添加し行った。pMxベクターにはpuromycin耐性遺伝子・blastcidin耐性遺伝子をそれぞれ組み込んだ2種類を用意し、これらの薬剤はレトロウィルス感染後に安定発現細胞を選択する際に培養培地に添加して使用した。アデノウィルス発現ベクターはpShuttle2ベクター（Clontech）を使用して目的遺伝子をクローニングした後、後述するAdenoX expression system（Clontech）を使用して作成した。siRNAに使用する発現ベクターはオリゴヌクレオチドをデザインしてアニーリングを行い、制限酵素を用いてpiGENE mU6ベクター（iGENE Therapeutics）に組み込んで作成した。コントロールとしてGFPの発現ベクターも作成した。レンチウィルス発現ベクターはpTRE3Gベクター（Clontech）を使用して目的遺伝子をクローニングした後、Tet-On®3G Inducible Expression Systems（Clontech）を使用して作成した。

Gene Bankへのアクセスナンバーは以下の通りである。

Hif1a (NM_010431.2)

2-7. リアルタイムRT-PCR

RNAはTRIzol（Invitrogen）を用いて回収し、RNeasy Mini Kit（QIAGEN）を用いて精製した。破碎が必要な組織サンプルはPrecellys 24（Bertin technologies）を用いて5000rpm 30sec x 6 cycleで破碎した。1 µgのRNAをQuantiTect reverse transcription Kit（Qiagen）により逆転写してsingle-stranded cDNAを得た。Mx3000P QPCR System（Agilent Technologies）を使用し、QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix（Qiagen）、

各種プライマーを用いてPCRを行った。スタンダードプラスミドはBlunt II TOPO cloning kit (Invitrogen) を用いて合成し、希釈系列を調整し、各種のスタンダードカーブを得た。Rodent total RNA (Applied Biosystems) でマウス β -Actinを測定し、内因性コントロールとした。これらによりそれぞれの遺伝子のmRNAコピー数を測定した。各サンプルの測定値は、3 wellでの計測値の平均値とした。

リアルタイムRT-PCR用のプライマーは下記表のとおりである。

Hif1a	Forward primer	5'-TGCTCATCAGTTGCCACTTC-3'
	Reverse primer	5'-TGGGCCATTTCTGTGTGTAA-3'
Hif2a	Forward primer	5'-TGAGTTGGCTCATGAGTTGC-3'
	Reverse primer	5'-CTCACGGATCTCCTCATGGT-3'
Pol2	Forward primer	5'-CTTTGAGGAAAC GGTGGATGTC-3'
	Reverse primer	5'-TCC CTT CAT CGG GTC ACT CT-3'
Col2a1	Forward primer	5'-GCCAAGACCTGAAACTCTGC-3'
	Reverse primer	5'-GCCATAGCTGAAGTGAAGC-3'
Mmp13	Forward primer	5'-AGGCCTTCAGAAAAGCCTTC-3'
	Reverse primer	5'-TCCTTGGAGTGATCCAGACC-3'
Mmp9	Forward primer	5'-TGAATCAGCTGGCTTTTGTG-3'
	Reverse primer	5'-GTGGATAGCTCGGTGGTGTGTT-3'
Vegfa	Forward primer	5'-TACTGCTGTACCTCCAC-3'
	Reverse primer	5'-ACAGGACGGCTTGAAGATG-3'

2-8. マウス成長板軟骨の組織学的検討

2-8-1. 免疫組織化学染色

パラフィン組織切片はキシレンにて脱パラフィン後エタノール置換して親水化した。Safranin-O染色は0.1%Fast Greenで5分間染色後、1%酢酸に15秒つけてから1% Safranin-O液で2分間染色した。免疫化学染色の場合は脱パラフィン後、室温で0.3% H₂O₂と30分間反応させて内因性ペルオキシダーゼを除去した。さらに室温で1% BSAと30分間反応させてブロッキングし、4°Cで一次抗体； Hif1a (1:100; Novus)、

Hif2a (1:100; Santa cruz) Col2a1 (1:500; LSL) 、 Col10a1 (1:500; LSL) 、 Mmp13 (1:200; Chemicon) 、 CC3 (1:500; Cell signaling) と一晩反応させた。翌日室温で HRP標識二次抗体 (Promega) と1時間反応させた後に CSA II Biotin-Free Catalyzed Amplification System (Dako) または TSA plus kit (Perkin Elmer) を使って増感させた。

2-8-2. アポトーシスの評価 (TUNEL 染色)

2-10-1と同様に、組織切片を脱パラフィン後、エタノール処置、親水化した後に 10 µg/ml Protein K(Invitrogen)にて室温、15分間前処置を行い、PBSで洗浄後、In Situ cell Death Detection Kit(Roche)のTUNEL Reaction Mixture 50 µlにて37°Cで1時間反応させてTUNEL染色を行った。

2-9. 実験的マウス変形性膝関節症モデルの作出

8週齢の雄マウスに対し、イソフルラン麻酔下に右膝関節を展開して内側側副靭帯および内側半月板を切除し、人為的な不安定性を誘導して変形性膝関節症を誘発した (26)。術後8週にてマウスを安楽死させ、固定液 (リン酸緩衝液 4%パラホルムアルデヒド、pH7.4) で灌流固定の後、膝関節を摘出、10%EDTA (pH7.4)、4°Cで2週間ほど脱灰を行い、パラフィン包埋した。その後 4µm スライス of 組織切片を作成した。切片は HE 染色の他、Safranin O と Fast green の二重染色を行った。

変形性関節症の組織学的評価には OARSI (Osteoarthritis Research Society International) の定める grading system を用いて評価した (38)。

2-10. タモキシフェン注射

*Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1aI^{fl/fl}*雄マウスと *Hif1aI^{fl/fl}*雌マウスを交配し翌日にプラグを確

認して分離した。妊娠 12.5-16.5 日の雌にコーンオイルに溶解したタモキシフェン (Sigma) を 100 μ g/g body weight で 1 回注射し、妊娠 18.5 日で前述の通り骨格標本を作製した。また変形性関節症モデルでは 7 週齢の雄の同胞 *Hif1a^{fl/fl}* マウスと *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1aI^{fl/fl}* マウスに対し、タモキシフェンを同量で 5 日間連続で腹腔内注射した (39)。(*Hif1a^{fl/fl}* : *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1aI^{fl/fl}* = 8 匹 : 8 匹)

2-11. 放射線学的解析

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

2-12. 低酸素プローブ

東京大学薬学部の花岡健二郎博士、朴文氏から低酸素プローブを供与された (40) (図 3)

2-12-1. 関節軟骨 in vitro での評価

まずプローブが関節軟骨で機能するかを検討するため初代培養関節軟骨を 35mm ガラス底細胞培養 Dish (松波硝子) に培養した。DMEM に 1mM の濃度でプローブを調整し、細胞が集密的な状態になってからカバーガラスをガラス底部に被せて中央部分が低酸素状態となるようにした。1 時間後にプローブの発光強度を確認した。

2-12-2. 関節軟骨 in vivo での評価

つぎに膝関節で機能するかを確認するため、8 週齢の雄 C57/B6J マウスの膝関節

に 1mM で 10 μ l 関節注射した。イソフルラン麻酔下に膝関節の直上で皮膚切開を行い、直視下に投与した。低酸素状態を作成するため、大腿動脈を結紮し、5 時間後に安楽死させ、固定液（リン酸緩衝液 4%パラホルムアルデヒド、pH7.4）で灌流固定の後、凍結切片作製のため SCEM（Section-lab）に包埋した。川本法を用いて 4 μ m の厚みで切片を作成した。切片は作成後-80 度に保管された。

2-12-3. 変形性関節症モデルでの評価

8 週齢 C57/B6J 雄マウスに変形性関節症モデルを作製した。0 週、4 週、8 週の各経過期間で上記と同様の方法でプローブを関節注射し、灌流固定の後、凍結切片を作製した（図 4）。

2-13. 基質分解能の評価

3 週齢 C57/B6J マウスの大腿骨頭を採取し、2 個の大腿骨頭を DMEM 400 μ l で 72hr ex vivo で培養した。IL1 β 10ng/ μ l となるよう添加して基質分解を促し、培養液中の Glucose aminoglycan (GAG) 含有量を DiMethylMethylene Blue Assay (DMMB) で半定量的に評価した。これを HIF-1 α の過剰発現系と抑制系で行った (41) (図 5)。過剰発現系として HIF-1 α を安定化する塩化コバルト (100 μ M) を使用した。抑制系では 2 週 4 日齢の *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}* マウスにタモキシフェンまたは vehicle としてのコーンオイルを 100 μ g/g body weight で腹腔内投与し、3 日後に安楽死させ、大腿骨頭を採取した。また抑制系の大腿骨頭をパラフィン包埋して、組織切片を作成し免疫組織化学染色を行った。

2-14. 統計学的解析

各実験から得られた結果は、平均 \pm 標準偏差として表記した。2 群間の比較には、

t検定を用いて有意水準 0.01、および 0.05 で検定した。

結果

3-1. 成長板における HIF-1 α の発現解析

3-1-1. 野生型マウス

成長板軟骨における HIF-1 α の発現パターンを確認するために野生型マウスの脛骨近位成長板軟骨の切片を胎生 14.5 日から 18.5 日まで作製し、抗 HIF-1 α 抗体を使用して免疫組織化学染色を行った。増殖層の一部や肥大細胞層の一部に発現がみられたが、胎生 15.5 日以降では前肥大層に最も強く発現していた。(図 6)

3-1-2. *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}* マウス

上記の結果を確認するため、*Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}* マウスを用いて軟骨発生の異なる段階で HIF-1 α を軟骨特異的にノックアウトして成長板軟骨の形態を評価することで発現部位を間接的に特定することとした。*Col2a1-Cre^{ERT2}* マウスはタモキシフェンを腹腔内投与することで時間特異的に Cre を作動させることが可能となる。そこで *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}* 雄マウスと *Hif1a^{fl/fl}* 雌マウスを交配させ、妊娠 12.5 日から 16.5 日までの各段階でタモキシフェンを雌マウスの腹腔内へ一回投与することで成長板軟骨の発生の各段階で HIF-1 α をノックアウトした。胎生 18.5 日でそれぞれを安楽死させ、骨格標本 (図 7) ならびにパラフィン切片 (図 8) を作成し脛骨近位成長板軟骨を評価した。すると胎生 15.5 日以前に軟骨特異的に HIF-1 α をノックアウトすると四肢および体幹の成長障害が明らかとなり、脛骨近位成長板軟骨では前肥大層から細胞が障害されていることが分かった。

以上の結果より HIF-1 α は前肥大細胞層で多く発現しており、軟骨形成に不可欠であることがわかった。

3-2. cKO マウスを用いた HIF-1 α の骨格形成への関与

四肢形成ならびに軟骨内骨化におけるHIF-1 α の機能解析を行うために四肢間葉系細胞特異的遺伝子欠損するpaired-related homeobox gene 1 (Prx1) プロモーター一作動性Creマウス (*Prx1-Cre*)、軟骨前駆細胞特異的遺伝子欠損するSox9 プロモーター一作動性Creマウス (*Sox9-Cre*)、軟骨細胞特異的遺伝子欠損するCol2a1 プロモーター一作動性Creマウス (*Col2a1-Cre*)、肥大軟骨特異的遺伝子欠損するCol10a1 プロモーター一作動性Creマウス (*Col10a1-Cre*) と *Hif1a^{fl/fl}* マウスと交配させ、それぞれ組織特異的遺伝子欠損マウス (*Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*、*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*、*Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*、*Col10a1-CreHif2a^{fl/fl}*) を作成し、胎生 17.5 日で解析した。骨格二重染色ならびに胎生 17.5 日の脛骨全長を遺伝子間で比較した (図 9)。

3-2-1. *Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}* マウスの骨格・組織

Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl} と *Hif1a^{fl/fl}* の体表を比較すると体幹長に差はなかったが、四肢の著明な短縮が見られ、骨格二重染色で長管骨の成長障害が明らかとなった (図 10)。*Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}* の脛骨全長H-E 染色では成長障害と共に成長板軟骨中央部に組織欠損が見られ、さらには大腿骨と脛骨が軟骨性に癒合し関節形成障害も見られた (図 11)。これらのマウスは四肢短縮を認めたが生後数週間生存した。しかし移動能力障害のため、離乳時期を過ぎた頃多くは餓死した。

3-2-2. *Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}* マウスの骨格・組織

次に *Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}* と *Hif1a^{fl/fl}* の体表を比較すると体幹短縮と共に四肢短縮も見られ、骨格二重染色では明らかな胸郭低形成が見られた (図 12)。*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}* の脛骨全長H-E 染色では成長障害と共に骨端部に関節腔から連続した陥凹が見られ、トランペット型を呈していた (図 13)。脛骨と大腿骨は分離していたが、関節

内の靭帯組織や半月板は観察することができなかった。これらのマウスは出生直後に呼吸不全のため死亡した。

3-2-3. *Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*マウスの骨格・組織

*Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*と*Hif1a^{fl/fl}*の体表を比較すると*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*と同様に体幹短縮と四肢短縮が見られた(図14)。しかし*Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*の脛骨全長H-E染色では成長障害は見られるものの、関節表面は比較的形成されており、形態異常は骨端中央部が主であった(図15)。また靭帯と思わしき組織が関節腔内に見られ関節腔の形成に異常は見られなかった。このマウスも*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*同様に出生直後に呼吸不全のため死亡した。

3-2-4. *Col10a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*マウスの骨格・組織

最後に*Col10a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*と*Hif1a^{fl/fl}*を比較すると、体幹長と四肢長に有意な差は見られず(図16)、脛骨全長H-E染色でも形態異常なども見られなかった(図17)。これらのマウスは正常に発育し、妊孕性に問題もなかった。

小括 1

HIF-1 α は成長板軟骨の前肥大層を中心に発現していた。*Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*マウスは長管骨の成長障害と関節形成障害を呈していた。*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*、*Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*は長管骨の成長障害、体幹短縮と胸郭形成不全を呈していたが前者の方が骨端部の形成障害が強かった。一方で*Col10a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*は明らかな成長障害をきたさなかった。以上の結果より、HIF-1 α は骨格形成において関節形成および長管骨の成長に重要な作用を有するが、肥大軟骨細胞以降では生理的な作用を有さないことが示唆された。

3-3. *Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*マウスの成長板軟骨評価

そこでHIF-1 α の成長板軟骨における作用を検討するため、これまでに報告されていない*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*マウスの成長板軟骨を詳細に解析した。

3-3-1. 構造評価

胎生 17.5 日の*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*マウス膝関節をH-E染色した連続切片で観察すると、関節中央部が陥凹しており、脛骨近位骨端部はトランペット型を呈していた(図 18)。軟骨のカラム構造は崩壊し、前十字靭帯などの関節内構造物は確認できなかった。そこで陥凹形成過程を観察するため胎生 15.5 日の*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*マウス膝関節をトルイジンブルー染色した連続切片を作製するとやはり関節中央が陥凹しており、一次骨化中心の肥大分化が遅延していた(図 19

)。しかし陥凹形成が関節面側から起きているか、一次骨化中心の形成障害によるものかは判別できなかった。

3-3-2. Safranin- O 染色および免疫組織化学染色

続いてHIF-1 α 欠失に伴う上記表現型の機序とHIF-1 α の軟骨内骨化における機能を検討するため、出生直後の*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*マウス脛骨近位骨端部をSafranin O染色と免疫組織化学染色で解析した。

*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*ではSafranin-O染色の染色性が悪く、軟骨基質合成能の低下が示唆された(図 20)。続いて様々な軟骨分化マーカーを免疫組織化学染色したところ、軟骨変性に強く関与するCatabolic factorのMmp13 とHif2aの発現が陥凹部を中心に上昇していた(図 20)。

3-3-3. TUNEL 染色

次に軟骨細胞のアポトーシスを調べるために*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*でTUNEL染色を

行った。*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*では陥凹部を中心にTUNEL陽性細胞が多く存在し、Cleaved Caspase 3 も同様に上昇していた (図 21)。よってHIF-1 α 欠失により軟骨細胞でのアポトーシスが亢進していた。

3-3-4. リアルタイム RT-PCR による発現解析

mRNAレベルでの発現解析を行うため、胎生 18.5 日の*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*と*Hif1a^{fl/f}*から大腿骨骨頭、大腿骨遠位、脛骨近位の軟骨を採取した。これらの組織を破碎後にmRNA精製し、逆転写の後、リアルタイムRT-PCRで発現解析を行った。

*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*ではHif1aはおおよそ 90%ノックアウトされ、下流とVegfは低下していた。軟骨基質の*Col2a1*の発現は低下し、軟骨変性マーカーの*Mmp13*、*Mmp9*が上昇していた。一方で、免疫組織染色で発現が上昇していたHif2aはmRNAレベルでは上昇は見られなかった (図 22)。

小括 2

*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*の脛骨近位骨端部は胎生 15.5 日、胎生 17.5 日でトランペット型を呈し、軟骨基質が低下していた。陥凹部を中心にCatabolic factorであるMmp13とHif2aの発現が上昇し、アポトーシスも亢進していた。

3-4. HIF-1 α による変形性関節症への関与

以上の結果より関節軟骨の形成においてHIF-1 α が重要な作用を有することがわかったが、次にHIF-1 α が関節軟骨の恒常性維持にどのように関与しているかをマウス変形性関節症モデルで検討した。

3-4-1. マウス変形性関節症におけるHIF-1 α の発現解析

変形性関節症の進行に伴う HIF-1 α の発現パターンを観察するため 8 週齢の野生型マウスで内側側副靭帯と内側半月板を切除しマウス変形性関節症モデルを作製した。術後 2、4、6、8 週で安楽死させ、パラフィン切片を作製して免疫組織化学染色で HIF-1 α の発現を調べると変性の進行に伴い HIF-1 α の発現が減少していた (図 23)。

3-4-2. マウス変形性関節症における関節軟骨の酸素濃度変化の検討

そこで HIF-1 α の発現低下が関節軟骨の酸素濃度の変化に起因するものか検討した。市販されている低酸素プローブで予備実験を重ねたが関節軟骨の酸素状態を観察することに難渋したため東京大学薬学部が開発した低酸素プローブを用いることとした。まず初代培養関節軟骨細胞を採取し、人為的に低酸素環境を作製して低酸素プローブの作動性を確認した。ガラス底培養皿で初代培養関節軟骨を培養し、集密的な状態になった時点で培養液中に低酸素プローブを添加した。4 時間後にカバーガラスを被せ中心部が低酸素状態となるようにすると 1 時間後には中央の低酸素領域でロダミンの発光が確認できた (図 24)。そこで *in vivo* で検討するため、関節内注射でプローブを投与し、観察した。予備実験として低酸素プローブを注射後に大腿動脈を結紮し、低酸素状態を作製すると 5 時間後に作成した凍結切片では関節軟骨で発光が確認できた (図 25)。次に 8 週齢マウスにマウス変形性関節症モデルを作製し、術後 0 週、4 週、8 週で低酸素プローブを関節内注射し、凍結切片で検討した。すると変性の進行に伴い発光が減弱し、酸素濃度の上昇が示唆された。さらに免疫組織化学染色で HIF-1 α の発現を確認するとパラフィン切片と同様に変形性関節症の進行に伴って HIF-1 α の発現が低下していた (図 26)。

3-4-3. *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}* マウスの外科的 OA モデルの検討

そこで関節軟骨におけるHIF-1 α の機能を詳細に解析するため軟骨特異的にHIF-1 α をノックアウトすることで変形性関節症の進行がどのように変化するかを検討した。出生前から軟骨特異的にHIF-1 α をノックアウトすると前述のように出生直後に死亡するため、*Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}*マウスを用いてタモキシフェン誘導性にCreリコンビナーゼを生後7週から発現させ、軟骨特異的にHIF-1 α をノックアウトした。8週齢の時点では*Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}*マウスと*Hif1a^{fl/fl}*マウスの骨格に差はなく、タモキシフェン5日連続腹腔内投与によってHif1aが8割以上ノックアウトされていることを免疫組織化学染色で確認した(図27)。8週齢でマウス変形性関節症モデルを作製し、8週間後(16週齢)に安楽死させ、X線写真と組織切片のSafranin-O染色とOARSIスコアで評価すると*Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}*マウスでは*Hif1a^{fl/fl}*マウスと比べ軟骨の変性が進行しており、X線写真でも関節裂隙の狭小化がみられ、OARSIスコアで有意差をもって変形性関節症が進行していた(図28)。そこで免疫組織化学染色を行なったところ、Mmp13とHif2aが上昇し、TUNEL染色ではアポトーシスが亢進していた(図29)。

小括3

以上の結果より、HIF-1 α は変形性関節症の進行に伴い発現が低下し、その一因として関節軟骨の酸素濃度の上昇が関与している可能性が示唆された。HIF-1 α の欠失により変形性関節症は進行し、Hif2aとMmp13の発現が上昇し、アポトーシスが亢進した。よってHIF-1 α は変形性関節症に対し保護的に作用し、関節軟骨の恒常性維持に重要な作用を有していた。

3-5. 軟骨細胞における HIF-1 α の機能解析

これら *in vivo* の結果を受け、HIF-1 α が保護的に作用する機序を *ex vivo* と *in vitro* で検討した。

3-5-1. HIF-1 α の基質分解への関与

HIF1- α の基質分解への関与を検討するため、3週齢の野生型マウスから大腿骨頭を採取し、IL1 β を添加した培地で72時間 *ex vivo*培養した。培養液中のグリコースアミノグリカン(GAG)の量をDMMBアッセイで比較すると、塩化コバルト(CoCl₂)でHIF-1 α を安定化させた骨頭ではGAGの溶出がIL1 β の有無にかかわらず有意に低下していた(図30)。そこでHIF-1 α が低下した状態でGAGの溶出を見るために *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1 α ^{fl/fl}*マウスを用いて2週齢の段階からHIF-1 α をノックアウトして3週齢で同様の実験を行ったところ、GAGの溶出は有意に上昇した(図31)。この大腿骨頭で切片を作製し、免疫組織化学染色を行うとここでもHif2aとMmp13の発現が上昇していた(図32)。

3-5-2. 軟骨細胞における HIF-1 α の機能解析 (*in vitro*)

次に*in vitro*でHIF-1 α の機能解析を行った。まず関節軟骨細胞にsiRNAをリポフェクションし、HIF-1 α を抑制した状態でIL1 β 刺激を加えmRNAの発現解析をリアルタイムRT-PCRで行った。すると軟骨基質である*Col2a1*の発現が低下し、*Hif2a*、*Mmp13*、*Mmp9*のcatabolic factorの発現が上昇した(図33)。続いて*Hif1 α ^{fl/fl}*マウスから関節軟骨細胞を採取し、Creリコンビナーゼを発現するアデノウィルスを感染させてHIF-1 α を抑制するとsiRNAで見られた遺伝子発現と同様の結果が得られた(図34)。

最後にHIF-1 α の強制発現系によるcatabolic factorの変動を調べるためATDC5細胞

株にレンチウイルスを安定導入し、ドキシサイクリン誘導性にHIF-1 α を強制発現させる細胞株を樹立した。ドキシサイクリン添加後、通常のインキュベーターで48時間培養した。その後、低酸素インキュベーター（1%O₂、5%CO₂、37°C）に移して24時間培養しmRNAを回収した。発現解析の結果、HIF-1 α の抑制系とは逆にMmp13、Mmp9、Hif2aの発現が低下した（図35）。

小括4

以上の結果より HIF-1 α は *ex vivo*、*in vitro* ともに Hif2a、Mmp13、Mmp9 などの catabolic factor を抑制し、軟骨細胞に対して保護的に作用している可能性が示唆された。

第4章 考察

今回の研究では転写因子HIF-1 α の関節軟骨形成および恒常性維持への関与をin vitroとin vivoで検討した。関節軟骨の発生においてHIF-1 α は特に初期分化で重要な作用を有し、関節腔形成および成長板軟骨の形成に必須であることがわかった。また関節軟骨の恒常性維持においてはHif2a、Mmp13、Mmp9などのcatabolic factorを抑制するanti-catabolicな作用を有し、アポトーシスも抑制していることが示唆された。

四肢発生における分子制御機構の研究は以前から盛んに行われている。四肢発生には骨の長軸方向への成長を促す軟骨内骨化、横軸方向への成長を促す膜性骨化、そして手指の本数や関節形成を決定するパターンニングが絶妙に調和して、はじめて正常に発生する。これらは複雑な分子メカニズムによって制御されており、これまでに様々な遺伝子の関与が解明されてきた(28、42)。ヒトでの四肢発生異常を含む先天的な骨格系の異常は骨系統疾患と称され、古くは表現型を事細かに観察ことで分類されていた。ところが次世代シーケンサーなど遺伝子解析技術が進歩した昨今では原因遺伝子による分類へと変わり、同一疾患でも遺伝子変異の部位によって重症度が異なることがわかってきた(43)。しかしながら様々な技術が進歩したにもかかわらず、軟骨内骨化の詳細な分子メカニズムや一つの軟骨細胞がどの様に終焉を迎えるかなど多くの基本的なことが未だに謎に包まれている。ましてや関節形成についてはWnt/ β cateninシグナル、BMPシグナルやGDF5の関与が報告されているが(45-47)、靭帯、半月板そして最表層の関節軟骨がどのように形成されるかいまだにわかっていない。最近ではセルトラッキングの技術が進歩したことにより前駆細胞がその後どのような運命をたどり最終的にどこに

行きつくのかが分かるようになってきた。そこでもともと分化を繰り返すことが知られている軟骨細胞に注目が集まり、軟骨前駆細胞や肥大細胞が最終的に骨芽細胞や骨細胞になることが報告されている（48、49）。これらの新しい技術を用いた研究によって解明されることは非常に興味深く、例えば適度な骨に対するメカニカルストレスが骨粗鬆症の予防につながると考えられていたが、軟骨細胞から骨芽細胞への分化をメカニカルストレスが促すならば現在の骨粗鬆症治療とは全く異なる機序の治療薬や新しいコンセプトの予防医学が開発される可能性がある。そこで今回我々は、軟骨が低酸素状態におかれていることに着目し研究をおこなった。

今回の研究ではまずHIF-1 α の関節形成における機能解析から行った。HIF-1 α は関節軟骨の前肥大細胞層中央部で多く発現していたが、中央部のみならず増殖細胞および肥大細胞にも発現がみられた。さらに*Col2a1-Cre^{ERT}*マウスを用いて経時的にHIF-1 α を軟骨特異的にノックアウトすると発現の多かった部位から細胞死が始まることがわかった。そこで様々な低酸素プローブを用いてHIF-1 α の発現部位が低酸素環境にあるかを検討したが残念ながらこのことを証明することはできなかった。しかし*Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*や*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*と*Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*マウスで関節軟骨の形態が著しく異なることからHIF-1 α は低酸素領域での生存のため以外にも何らかの作用を有する、あるいは間葉凝集や軟骨原基の段階で低酸素領域が存在し、HIF-1 α が欠失することで*Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*や*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*のような表現型を示すことが考えられる。関節軟骨の形態を詳細に観察すると*Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*マウスでは関節の表層は形成されており、前十字靭帯もしくは後十字靭帯が形成され始めている。しかし*Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*と*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*では

靱帯構造が存在せず、関節面が正常に形成されていない。また*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*の陥凹中央部ではMmp13の発現が上昇し、アポトーシスが亢進しているため、陥凹形成は何らかのcatabolicなメカニズムが作動して起きたと考えられる。よってSchipaniら (21) が報告している中央部以外の細胞増殖能が亢進することにより起こったとされる*Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*のメカニズムとは異なる可能性が示唆される。そこで陥凹形成が関節軟骨表面から発生するかをみるために*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*の胎生期を遡ることとした。ところが胎生14.5日以前は組織の脆弱性や大きさの問題から切片作製が困難で陥凹形成初期から観察することができなかった。作製しえた最も早い胎生15.5日の切片では関節表面中央から一次骨化中心へ向かって陥凹が形成されていた。Mmp13が関節腔の形成に関与する可能性も検討したが、Mmp13ノックアウトマウスは関節形成が正常であることから可能性は低いと考えた(50)。そこでHIF-2 α の発現をタンパクレベルで観察すると*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*で有意に発現が上昇していた。HIF-2 α は軟骨でMmp13を誘導するcatabolic factorであることが知られており(29, 51)、組織によってはHIF-1 α が低下すると代償的にHIF-2 α の発現が上昇するとの報告もある(52)。一方でHIF-2 α が軟骨細胞でSOX9を誘導し、anabolicな機能を持つといった報告もある(53)。四肢発生においてはHIF-2 α をPrx1-Creプロモーター下にノックアウトしても軽微な成長障害しかおこらないことが報告されており、四肢の成長にはそれほど重要な作用を有しないとされている(54)。今回の表現型がHIF-2 α 単独の作用で説明できるものではないがMmp13などのcatabolic factorを誘導する一因となっている可能性が示唆される。また*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*の関節軟骨から採取したmRNA発現をみたりアルタイムRT-PCRではHif2aの発現上昇は確認できなかったが、これは胎生18.5日から採取した軟骨

であり、この時点ではmRNAの発現がすでに低下している可能性が考えられる。今後タンパクレベルでの発現解析をさらに行いHIF-2 α の関与、さらにはアポトーシスの機序も含めて検討したいと考えている。また靭帯の発生過程を含めたSox9陽性細胞に対するHIF-1 α の機能を検討するため、Sox9-Cre^{ERT2}マウスを入手し胎生期で段階的にHIF-1 α をノックアウトして解析を予定している。

関節軟骨恒常性維持に関するHIF-1 α の機能については変形性関節症に関連してこれまでにいくつか報告がある。ヒト変形性膝関節症ではHIF-1 α の発現が上昇するという報告が散見され、変性や炎症により関節内の酸素濃度は低下することに起因すると考えられている (55、56)。またIL-1 β やH₂O₂などのcatabolic stressをin vitroで与えることでHIF-1 α の発現が上昇してanti-catabolicな作用を発揮するという報告もある (57)。しかしながらin vivoでこれらを証明した報告はない。唯一in vivoの実験を行っている報告では、変形性関節症モデルマウスにHIF-1 α の分解促進剤 2-methoxyestradiol を関節注射すると変形性関節症が進行したが、HIF-1 α の分解阻害剤dimethyloxaloylglycineを注射しても変性予防はできなかった (58)。

本研究ではマウス変形性関節症においてHIF-1 α を軟骨特異的にノックアウトすることでMmpやアポトーシスの亢進により変形性関節症が進行することがわかった。また変性の進行に伴いHIF-1 α の発現が低下し、それと同時に関節軟骨の酸素濃度の上昇が示唆された。これらは新しい知見であり、HIF-1 α が関節軟骨を保護する作用を裏付ける結果である。先述の通りヒトでは変性に伴いHIF-1 α の発現が上昇するが、動物種による軟骨の厚みの違いやサンプルの固定方法の違いなどによる可能性も考えられる。さらには既存の報告を詳細に分析するとOAの進行度によって発現部位が変化するものやPGK1やGLUT1などHIF-1 α の下流遺伝子を見

ている論文もあり、軟骨保護作用を促すために一時的に発現が上昇し、さらに変性が進行すると発現が低下している可能性も考えられる。

我々の研究室ではこれまでにHIF-2 α が変形性関節症においてMmp13などの catabolic factorを誘導することを報告してきたが、アイソフォーム同士で相反する作用を示すことは非常に興味深い結果である。HIF-1 α とHIF-2 α がSod2やNoxを介して相互制御されている報告もあり (59)、軟骨細胞でも同様にHIF-1 α とHIF-2 α が直接あるいは間接的に互いの発現を制御している場合には、anti-catabolicな作用を有するHIF-1 α が減少することでcatabolicなHIF-2 α が増加し変性の進行を早めることが考えられる。本研究の結果もin vivo とin vitroでこれを裏付けるものとなっている。

また、HIF-1 α とHIF-2 α は酸素濃度による安定性が異なり、HIF-1 α は0-2% O₂で安定するのに対し、HIF-2 α は2-5% O₂で安定といわれている (52)。これが軟骨細胞でも適応されるならば、今回の結果より、関節軟骨の変性に伴い、酸素濃度が上昇しHIF-1 α が分解され、代わりにHIF-2 α の発現が上昇し変形性関節症を進行させることが考えられる。これがヒト変形性関節症でも同様の機序でHIF-2 α の発現が上昇するならば、HIF-1 α の発現を関節軟骨で上昇させるような関節内酸素濃度調整やHIF-1 α を軟骨特異的に発現される方法を開発することで変形性関節症の予防につながる可能性が示唆される。そこで気になることが前述の通り、変性によって関節内酸素濃度は低下するのに対し関節軟骨での酸素濃度が上昇していることである。一見矛盾しているように感じるが、関節表面のバリア機構が破綻することで関節内酸素濃度が低くても関節軟骨自体の酸素濃度が上昇する可能性も考えられ、今後、低酸素プローブを用いてスケールを作製し、実際の酸素濃度を

定量することでさらに検証する予定である。

これらの結果より関節軟骨の形成・維持においてHIF-1 α の発現が低下することでHIF-2 α 、Mmp13やMmp9が上昇し、アポトーシスが亢進することがわかり、HIF-1 α は軟骨細胞において保護的に作用することが示唆された。しかし、HIF-1 α がこれらの遺伝子を制御するメカニズムの解明には至らなかった。これまでHIF-1 α がTimp3を介してMmpを制御している報告はあるが(53)、転写レベルでの制御についての報告は渉猟しえた範囲ではなかった。Mmp13のプロモーター領域にHREが存在し、HIF-2 α が結合することが分かっているため(29)、HIF-1 α も同様に結合するか検討したが、残念ながら特定のHREに結合し、Mmp13を抑制するような結果は得られなかった。またHIF-1 α が直接HIF-2 α を制御していることも考え実験を行ったが、有意な結果は得られなかった。今後、HIF-1 α とHIF-2 α 双方をノックダウンしてHIF-1 α がHIF-2 α を直接抑制しているかの検証も行う必要がある。またアポトーシスに関してもHIF-1 α はBNIP3を介して促進的に作用する場合やcIAP2を介して抑制的に作用する場合など双方の機序を持ち合わせているが(60)、関節軟骨においては抑制的に作用していると考えられた。しかしながら、Bcl-2、Bcl-xLなどのanti-apoptoticな遺伝子の変化は確認できず、HIF-1 α をノックダウンすることでBNIP3などのpro-apoptoticな遺伝子が反対に減少する結果も得られた。これらの結果より軟骨におけるHIF-1 α のアポトーシス制御機構を解明することはできなかった。今後は網羅的にHIF-1 α の転写標的をChIP-seqで探索し、Mmpやアポトーシス関連遺伝子を同定する予定である。

以上より、HIF-1 α は関節軟骨の形成・維持においてanti-catabolicな作用を有し、HIF-1 α の発現が減少することでHIF-2 α の発現が上昇し、catabolic factorを誘導する

一因となっていた。今後は関節形成におけるHIF-1 α の作用と恒常性維持に関する作用が共通のメカニズムによって制御されているかをさらに解明していきたいと考えている。

結論

本研究により関節軟骨の形成と恒常性維持においてHIF-1 α はHif2a, Mmp13、Mmp9などのcatabolic factorとアポトーシスを抑制することで保護的に作用することが示唆された（図34）。またマウス変形性関節症モデルにおいて変性に伴い関節軟骨の酸素濃度が上昇し、これと相まってHIF-1 α 発現が低下することがわかった。よって関節軟骨でのHIF-1 α の発現を酸素濃度環境の変化や薬剤で上昇させることが安全にできれば変形性関節症の予防・治療につながる可能性が示された。

謝辞

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

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

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

また、本研究の遂行にあたり、研究の基礎から終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り、有益な御助言を賜った東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 鄭雄一教授ならびに東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 大庭伸介准教授に厚く感謝申し上げます。

最後に実験をするために家を守り、自分を支えてくれた妻・福美、長男・晃成、次男・大地、三男・陸に感謝の念を示します。

引用文献

1. Silver IA. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 271:261–72, 1975
2. Richman AI, Su EY, Ho G Jr. Reciprocal relationship of synovial fluid volume and oxygen tension. *Arthritis Rheum.* 24(5):701-5, 1981
3. Lund-Olesen K. Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum.* 13(6):769-76, 1970
4. Zhou S, Cui Z, Urban JP. Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis Rheum.* 50(12):3915-24, 2004
5. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270: 1230-1237, 1995
6. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(12):5510-4, 1995
7. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *J Clin Invest.* 123(9):3664-71, 2013
8. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399:271–275, 1999
9. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel–Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolylhydroxylation. *Science* 292:468–472, 2001
10. Schulz K, Milke L, Rübsamen D, Menrad H, Schmid T, Brüne B. HIF-1 α protein is

upregulated in HIF-2 α depleted cells via enhanced translation. FEBS Lett.

4;586(11):1652-7, 2014

11. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1 Interaction between H-ras and hypoxia. J Biol Chem. 276(12), 9519-9525, 2001
12. Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y. Hypoxia-inducible factor-1 α induces cell cycle arrest of endothelial cells. Genes Cells 7(2):143–149, 2001
13. Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. J Biol Chem. 276(11):7919–7926, 2001
14. Rankin EB, Wu C, Khatri R, Wilson TL, Andersen R, Araldi E, Rankin AL, Yuan J, Kuo CJ, Schipani E, Giaccia AJ. The HIF signaling pathway in osteoblasts directly modulates erythropoiesis through the production of EPO. Cell 149(1):63-74, 2012
15. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(9):4304-8, 1993
16. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol. 16(9):4604-13, 1996
17. Semenza GL. Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis. Hematol Oncol Clin North Am. 8(5):863-84, 1994
18. Bruce JY, Eickhoff J, Pili R, Logan T, Carducci M, Arnott J, Treston A, Wilding G, Liu G. A phase II study of 2-methoxyestradiol nanocrystal colloidal dispersion alone

- and in combination with sunitinib malate in patients with metastatic renal cell carcinoma progressing on sunitinib malate. *Invest New Drugs*. 30(2):794-802, 2012
19. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol*. 76:39-56, 2014
 20. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*. 17(11):3005-15, 1998
 21. Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*. 15(21):2865-76, 2001
 22. Provot S, Zinyk D, Gunes Y, Kathri R, Le Q, Kronenberg HM, Johnson RS, Longaker MT, Giaccia AJ, Schipani E. Hif-1alpha regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development. *J Cell Biol*. 177(3):451-64, 2007
 23. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. C/EBP β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet*. 21(5):1111-23, 2012
 24. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. C/EBP β Promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57. *PLoS One*. 4(2):e4543, 2009
 25. Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Takeshita K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of

- human type X collagen gene. *Arthritis Rheum.* 60(1):166-78, 2009
26. Yamada T, Kawano H, Koshizuka Y, Fukuda T, Yoshimura K, Kamekura S, Saito T, Ikeda T, Kawasaki Y, Azuma Y, Ikegawa S, Hoshi K, Chung UI, Nakamura K, Kato S, Kawaguchi H. Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nat Med.* 12(6):665-70, 2006
27. Hosaka Y, Saito T, Sugita S, Hikata T, Kobayashi H, Fukai A, Taniguchi Y, Hirata M, Akiyama H, Chung UI, Kawaguchi H. Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(5):1875-80, 2013
28. H. M. Kronenberg. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423: 332-336, 2003
29. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med.* 16(6):678-86, 2010
30. 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.* 13(7):632-41, 2005
31. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res.* 60(15):4010-5, 2000
32. Ovchinnikov DA, Deng JM, Ogunrinu G, Behringer RR. Col2a1-directed expression of Cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice. *Genesis.*

- 26(2):145-6, 2000
33. Logan M, Martin JF, Nagy A, Lobe C, Olson EN, Tabin CJ. Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prx1 enhancer. *Genesis*. 33(2):77-80, 2002
 34. Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, Zhang Z, Martin JF, Behringer RR, Nakamura T, de Crombrughe B. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(41):14665-70, 2005
 35. Kim Y, Murao H, Yamamoto K, Deng JM, Behringer RR, Nakamura T, Akiyama H. Generation of transgenic mice for conditional overexpression of Sox9. *J Bone Miner Metab*. 29(1):123-9, 2011
 36. Chen M, Lichtler AC, Sheu TJ, Xie C, Zhang X, O'Keefe RJ, Chen D. Generation of a transgenic mouse model with chondrocyte-specific and tamoxifen-inducible expression of Cre recombinase. *Genesis*. 5(1):44-50, 2007
 37. Kitamura T. New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening. *Int.J.Hematol*. 67: 351-359. 1998
 38. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 14(1):13-29, 2006
 39. Hilton MJ, Tu X, Long F. Tamoxifen-inducible gene deletion reveals a distinct cell type associated with trabecular bone, and direct regulation of PTHrP expression and chondrocyte morphology by Ihh in growth region cartilage. *Dev.Biol*. 308: 93-105, 2007
 40. Piao W, Tsuda S, Tanaka Y, Maeda S, Liu F, Takahashi S, Kushida Y, Komatsu T,

- Ueno T, Terai T, Nakazawa T, Uchiyama M, Morokuma K, Nagano T, Hanaoka K. Development of azo-based fluorescent probes to detect different levels of hypoxia. *Angew Chem Int Ed Engl.* 52(49):13028-32, 2013
41. Stanton H, Golub SB, Rogerson FM, Last K, Little CB, Fosang AJ. Investigating ADAMTS-mediated aggrecanolytic activity in mouse cartilage. *Nat Protoc.* 6(3):388-404, 2011
 42. Rabinowitz AH, Vokes SA. Integration of the transcriptional networks regulating limb morphogenesis. *Dev Biol.* 368(2):165-80, 2012
 43. Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Rimoin DL, Robertson S, Savarirayan R, Silences D, Spranger J, Unger S, Zabel B, Superti-Furga A. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A.* 155A(5):943-68, 2011
 44. Chung UI, Kawaguchi H, Takato T, Nakamura K. Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. *J Orthop Sci.* 9(4):410-4, 2004
 45. Guo X, Day TF, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev.* 18(19):2404-17, 2004
 46. Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280(5368):1455-7, 1998
 47. Storm EE, Kingsley DM. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol.* 209(1):11-27, 1999
 48. Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A. 111(33):12097-102, 2014
49. Ono N, Ono W, Nagasawa T, Kronenberg HM. A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones. *Nat Cell Biol.* 16(12):1157-67, 2014
 50. 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.* 60(12):3723-33, 2009
 51. Yang S, Kim J, Ryu JH, Oh H, Chun CH, Kim BJ, Min BH, Chun JS. Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction, *Nat Med.* 16(6):687-93, 2010
 52. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.* 12(1):9-22, 2011
 53. Thoms BL, Dudek KA, Lafont JE, Murphy CL. Hypoxia promotes the production and inhibits the destruction of human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 65(5):1302-12, 2013
 54. Araldi E, Khatri R, Giaccia AJ, Simon MC, Schipani E. Lack of HIF-2 α in limb bud mesenchyme causes a modest and transient delay of endochondral bone development. *Nat Med.* 17(1):25-6, 2011
 55. Coimbra IB, Jimenez SA, Hawkins DF, Piera-Velazquez S, Stokes DG. Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 12(4):336-45, 2004
 56. Pfander D, Cramer T, Swoboda B. Hypoxia and HIF-1alpha in osteoarthritis. *Int Orthop.* 29(1):6-9, 2005

57. Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 7(4):R904-14, 2005
58. Gelse K, Pfander D, Obier S, Knaup KX, Wiesener M, Hennig FF, Swoboda B. Role of hypoxia-inducible factor 1 alpha in the integrity of articular cartilage in murine knee joints. *Arthritis Res Ther.* 10(5):R111. 2008
59. Yuan G, Peng YJ, Reddy VD, Makarenko VV, Nanduri J, Khan SA, Garcia JA, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Mutual antagonism between hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α regulates oxygen sensing and cardio-respiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(19):E1788-96. 2013
60. Greijer AE, van der Wall EJ. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Clin Pathol.* 57(10):1009-14, 2004

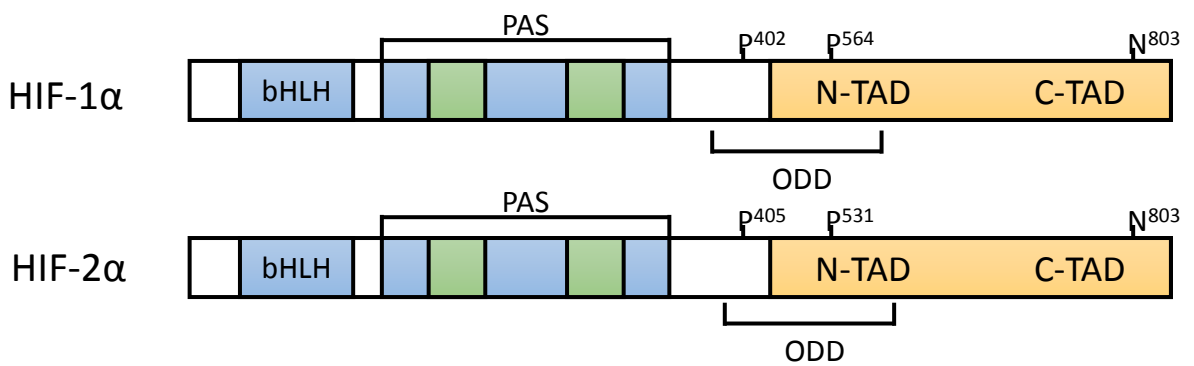


図1 HIF family の構造

HIF-1 α とHIF-2 α は類似した構造を持つ。N末端側にbasic helix-loop-helix 領域とPer-ARNT-Sim homology (PAS)領域を持ち、C末端側に転写活性ドメインN-terminal trans-activation domain (N-TAD)とC-terminal trans-activation domain (C-TAD)を有している。

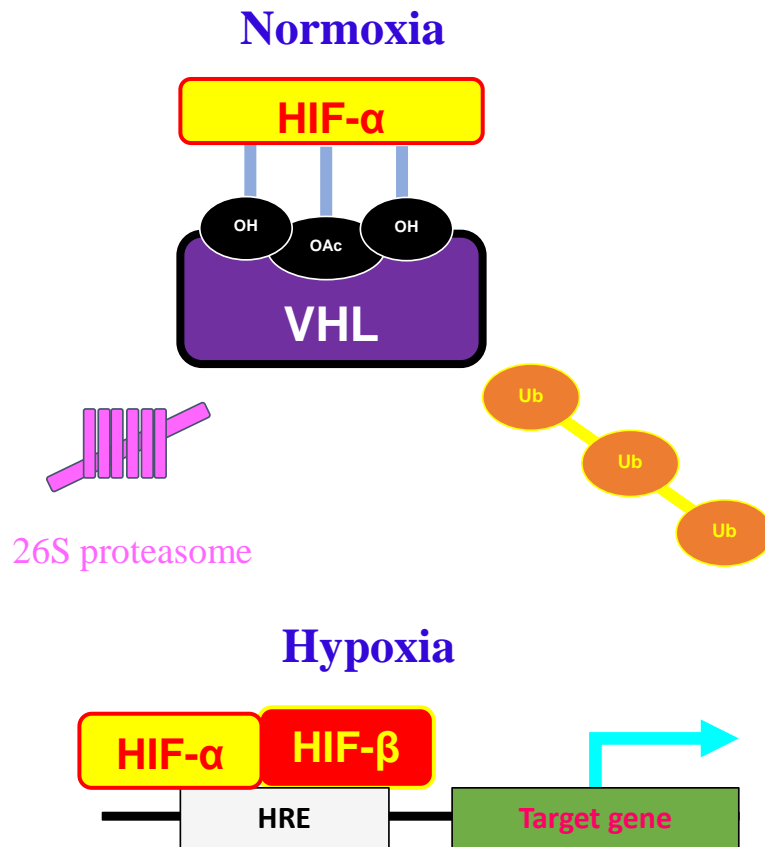


図2 酸素環境によるHIFの代謝

通常酸素状態ではHIF- α はVHLと複合体を形成し、ユビキチン化された後、分解される。低酸素状態ではHIF- β と二量体を形成し、HREと結合し転写を促進する。

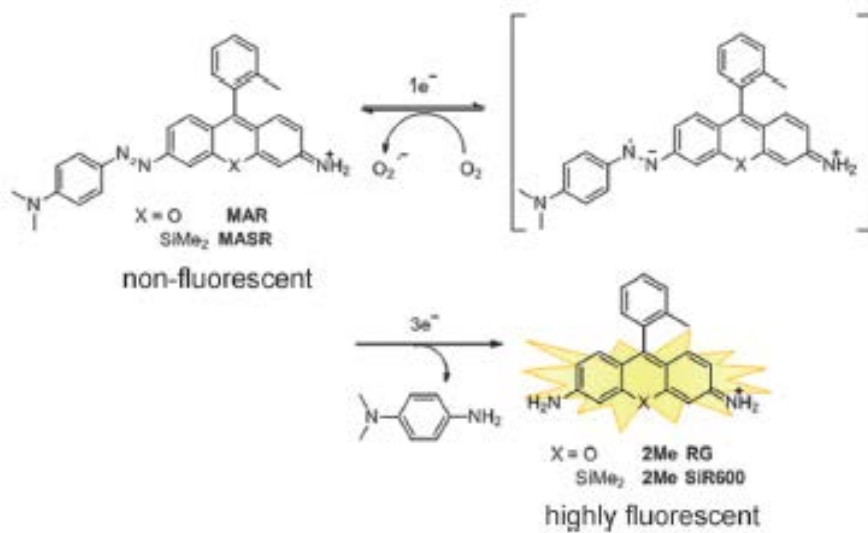


図3 低酸素プローブ

低酸素環境でAzo基 (N=N) が還元され、蛍光タンパク rhodamineが発光する

OA model

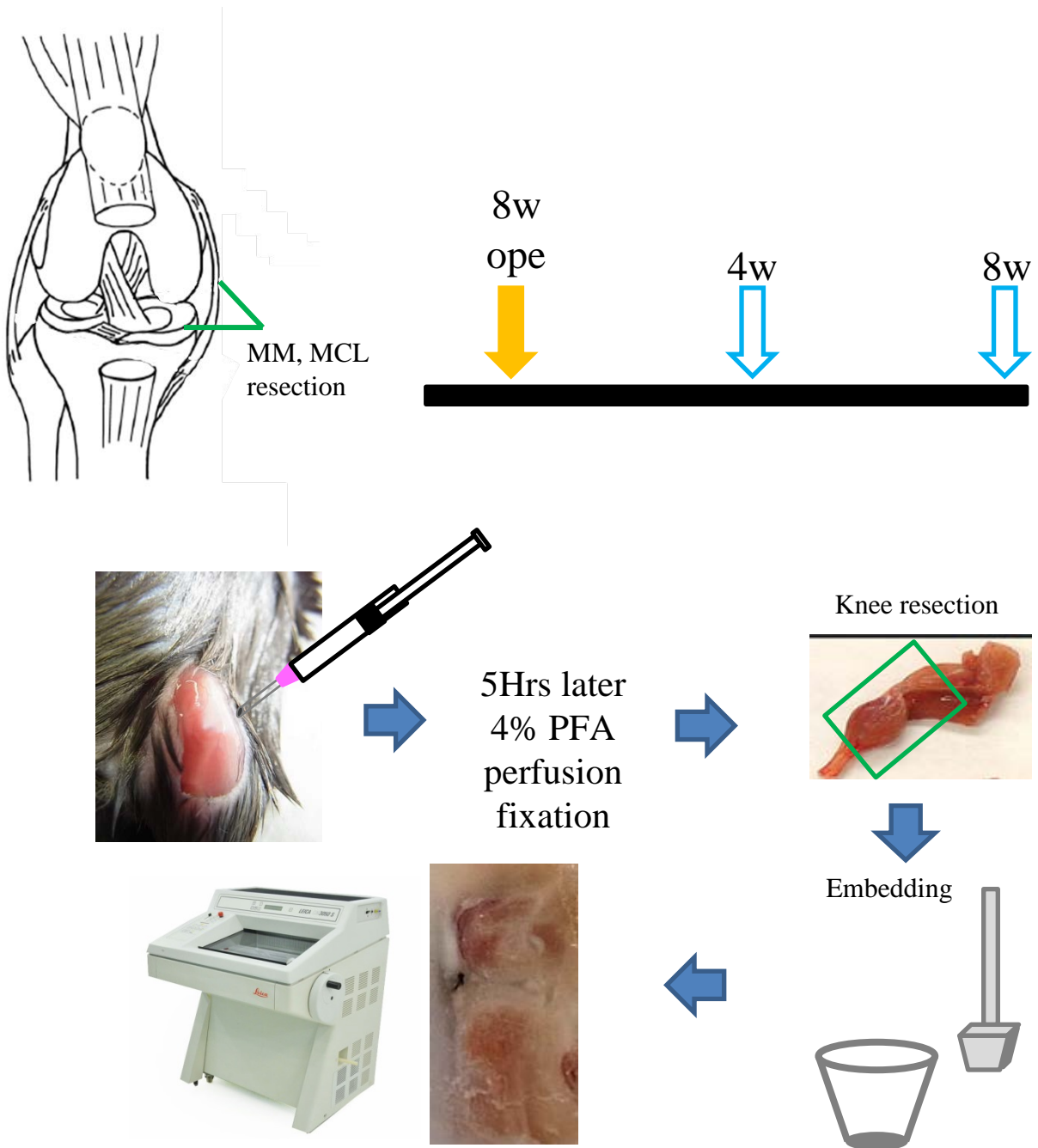
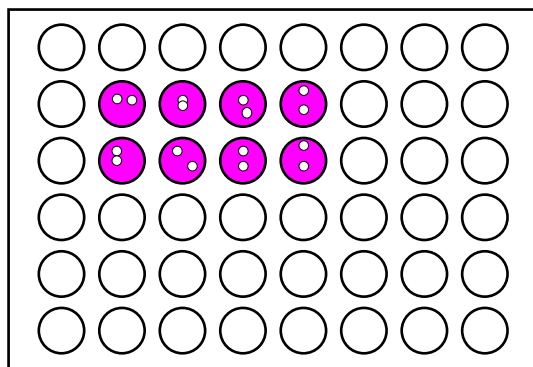


図4 変形性関節症モデルを用いた低酸素プローブ実験

8週齢C57/B6Jマウスの右膝関節から内側半月板と内側側副靭帯を切除し、マウス変形性関節症モデルを作製した。術後、0週、4週、8週でマウス膝関節に1mM低酸素プローブを10 μ l注射し、5時間後に犠牲死させる。灌流固定後、包埋し川本法で凍結切片を作製した。

3週齢 マウス
大腿骨頭採取



48 well plate
400 μ l medium
2 femoral heads/well
IL-1 β 10 ng/ml

**72 Hrs
Culture**

**DiMethylMethylene Blue assay
(DMMB)**

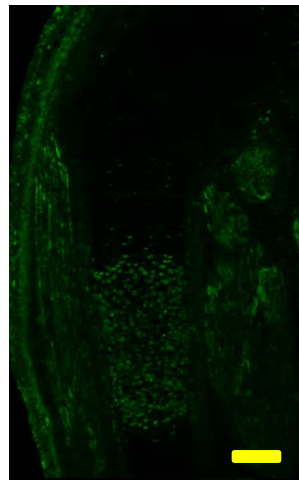
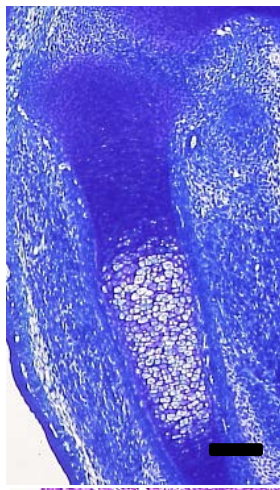
上清に含まれるGAGを定量

(*Nat Protoc.* 2011 Mar;6(3):388-404.より引用)

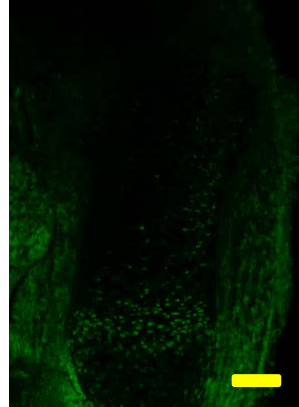
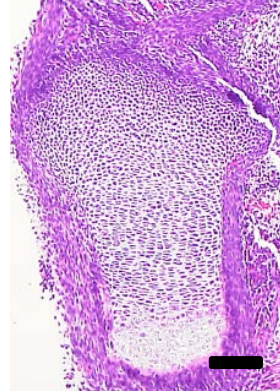
図5 基質分解能を評価するためのDMMB assay

3週齢C57/B6Jマウスの大腿骨頭を採取し、2個の大腿骨頭をDMEM 400 μ lで72hr ex vivoで培養した。IL1 β 10ng/ μ lとなるよう添加して基質分解を促し、培養液中のGlucose aminoglycan (GAG) 含有量をDiMethylMethylene Blue Assay(DMMB)で半定量的に評価した。

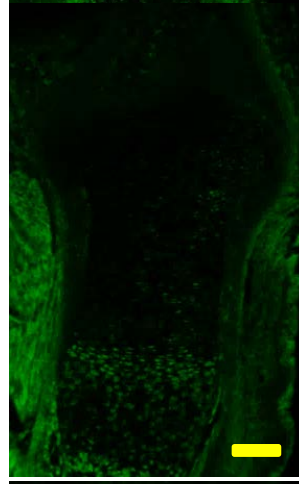
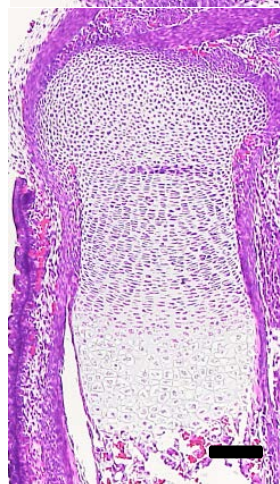
E14.5



E15.5



E16.5



E17.5

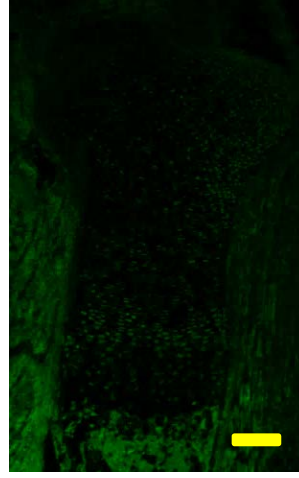
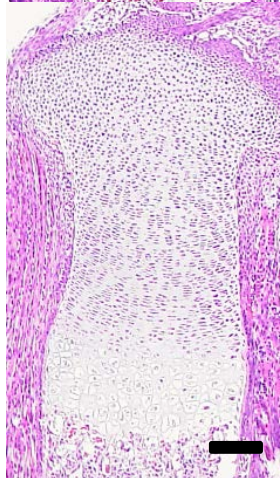
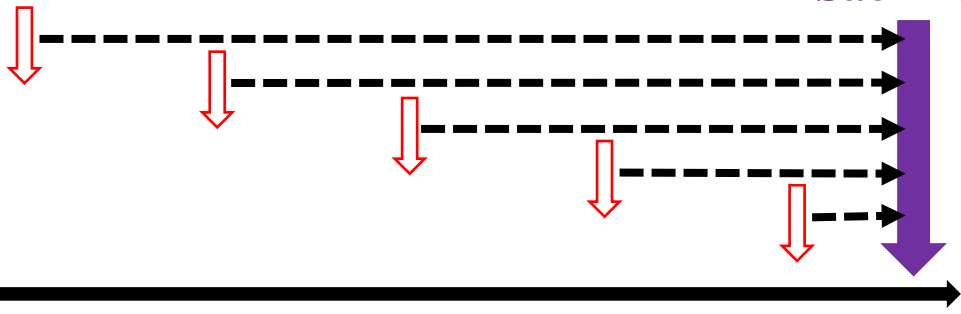


図6 野生型マウス成長板軟骨におけるHIF-1 α の発現

増殖細胞層や肥大細胞層にも発現は見られたが、前肥大細胞層に最も強く発現していた
Scale bar=100 μ m

Tamoxifen
(100 μ g/g)

Sacrifice



E12.5

E13.5

E14.5

E15.5

E16.5

Hif1a^{fl/fl}



*Col2a1-Cre^{ERT2};
Hif1a^{fl/fl}*

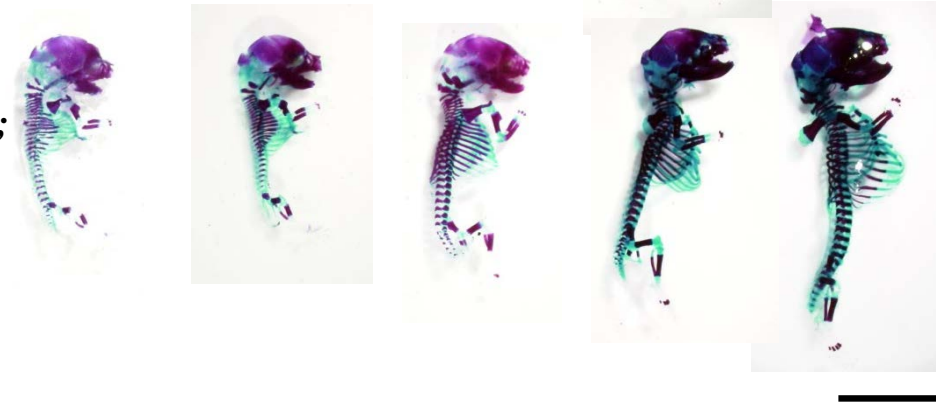


図7 *Col2a1-Cre^{ERT2};
Hif1a^{fl/fl}*マウスを用いて軟骨発生
の各段階でHIF-1 α をノックアウト

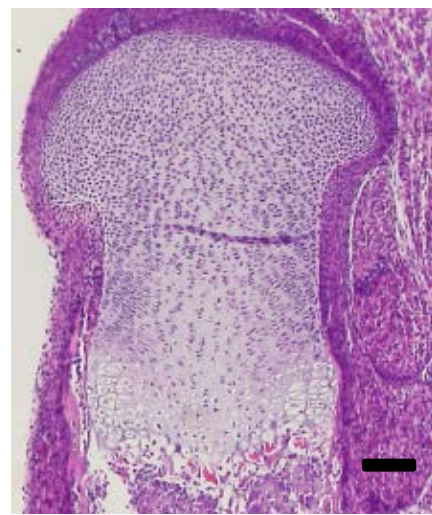
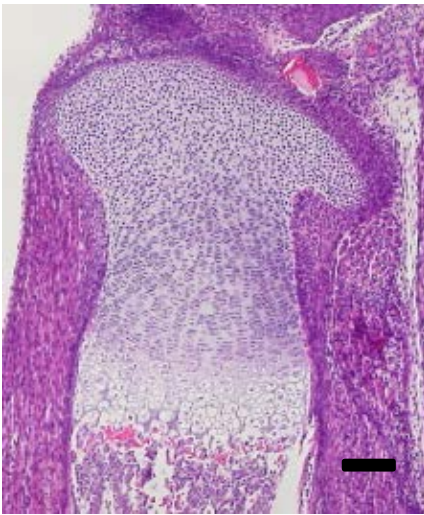
胎生15.5日以前にHIF-1 α を軟骨特異的にノックアウトすると四肢および体幹の成長障害をきたした。

Scale bar = 1cm

TM
E12.5



TM
E15.5



Hif1 α ^{fl/fl}

*Col2a1-Cre^{ERT2};
Hif1 α ^{fl/fl}*

図8 軟骨発生の各段階でHIF-1 α をノックアウトした胎生18.5日の成長板軟骨

胎生12.5日と胎生15.5日にCol2a1-Cre^{ERT2};Hif1 α ^{fl/fl}マウスにタモキシフェンを注射したHIF-1 α を軟骨特異的にノックアウトすると四肢および体幹の成長障害をきたし、前肥大層周囲から細胞死が起きていた。

Scale bar =100 μ m

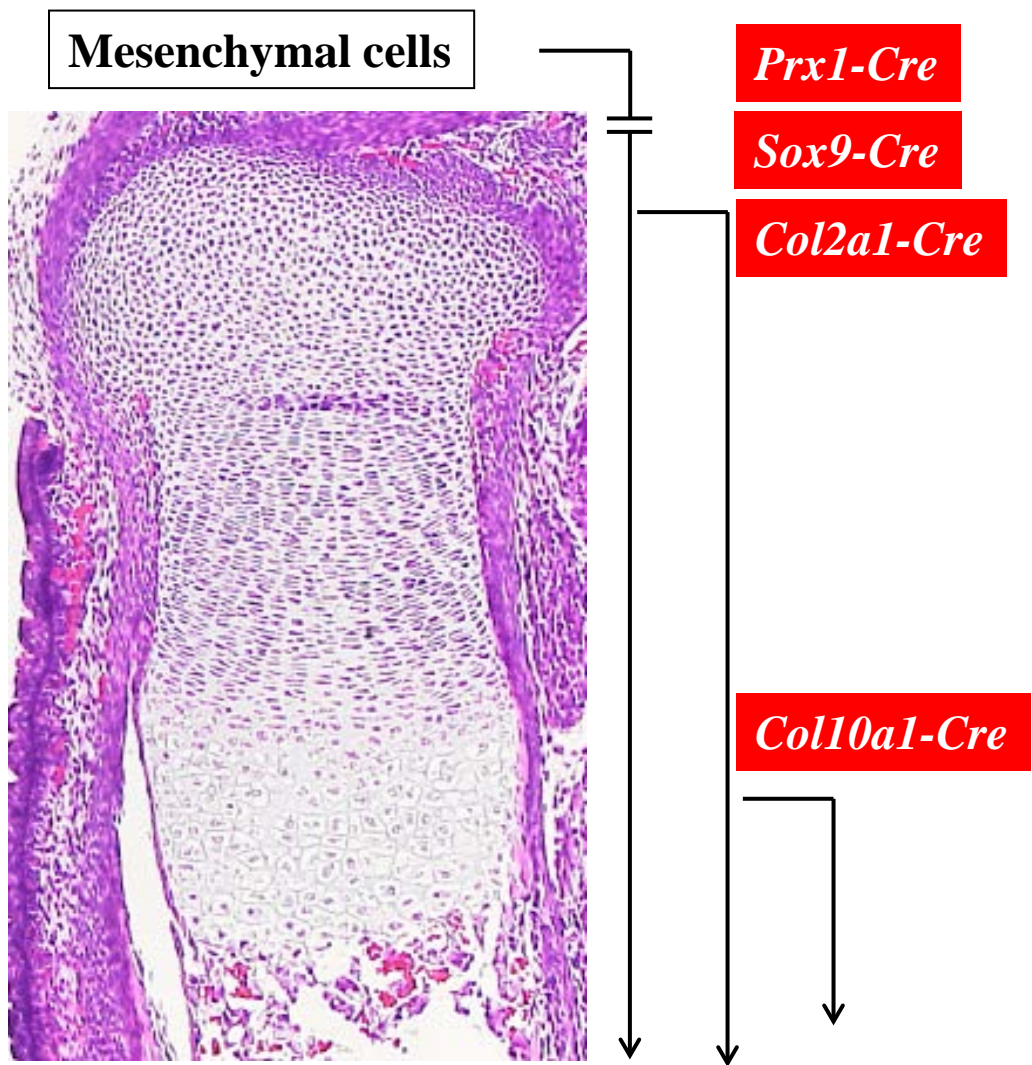
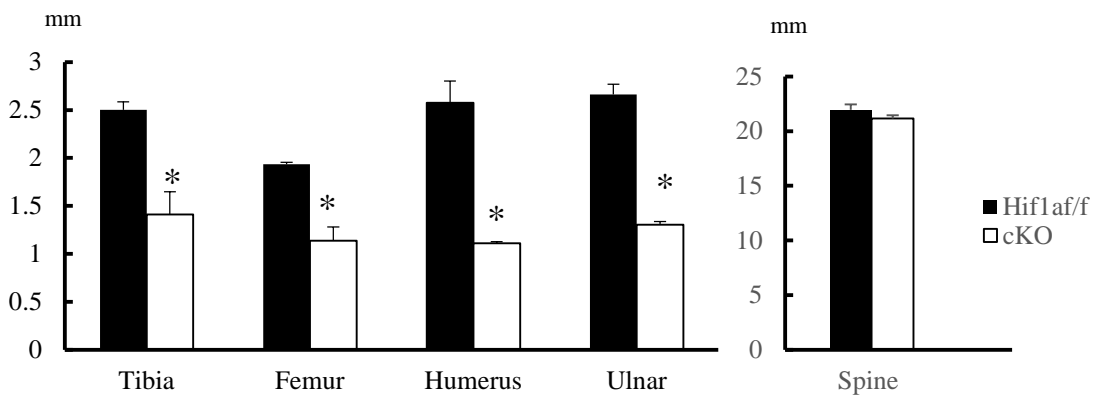


図9 四肢発生および軟骨内骨化の各段階でHIF-1 α を欠失
図のようなCreマウスを用いることで四肢間葉系細胞、軟骨前駆細胞、軟骨細、
そして肥大軟骨細胞特異的にHIF-1 α をノックアウトした。

Hif1a^{fl/fl}

Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}



*p<0.01

図10 *Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*胎生17.5日の骨格二重標本
体幹長に差はないが*Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*では四肢の著明な短縮が見られた。
Scale bar = 1mm

Hif1a^{fl/fl}

Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}

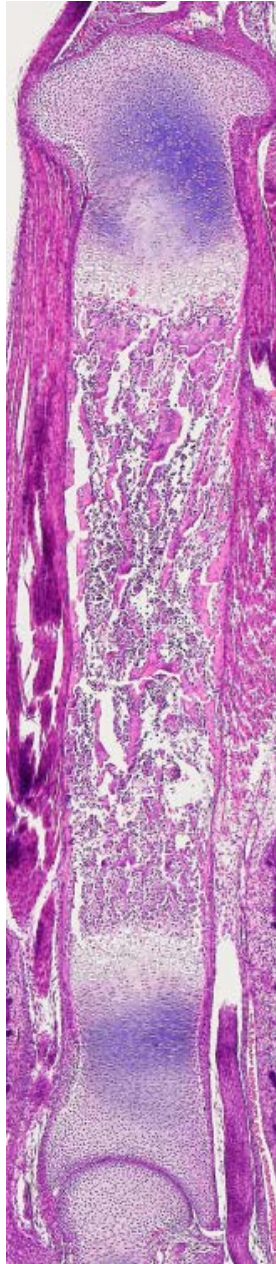


図11 *Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}* 胎生17.5日の脛骨 H-E染色
*Prx1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*では成長障害と共に大腿骨と脛骨が癒合しており、関節形成障害も見られた。
Scale bar =100 μ m

Hif1^{af/f}

Sox9-Cre;Hif1^{af/fl}

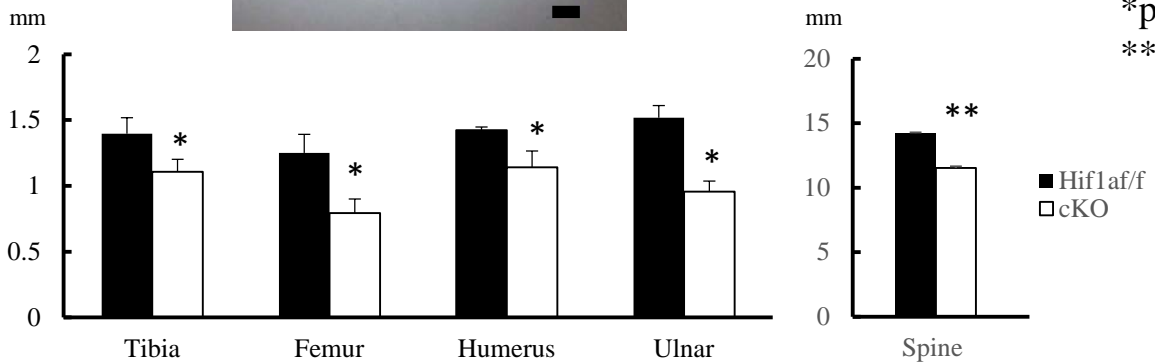
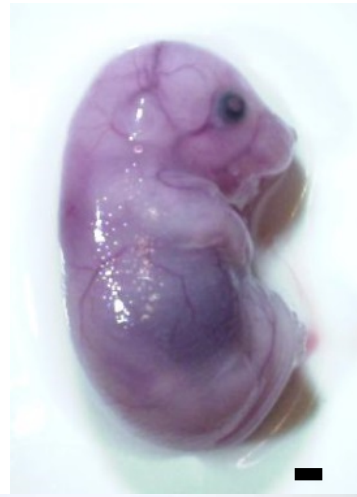


図12 *Sox9-Cre;Hif1^{af/fl}* 胎生17.5日の骨格二重標本

*Sox9-Cre;Hif1^{af/fl}*は明らかな四肢及び体幹の短縮が見られ、胸郭低形成も伴っていた。

Scale bar = 1mm

Hif1a^{fl/fl}

Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}

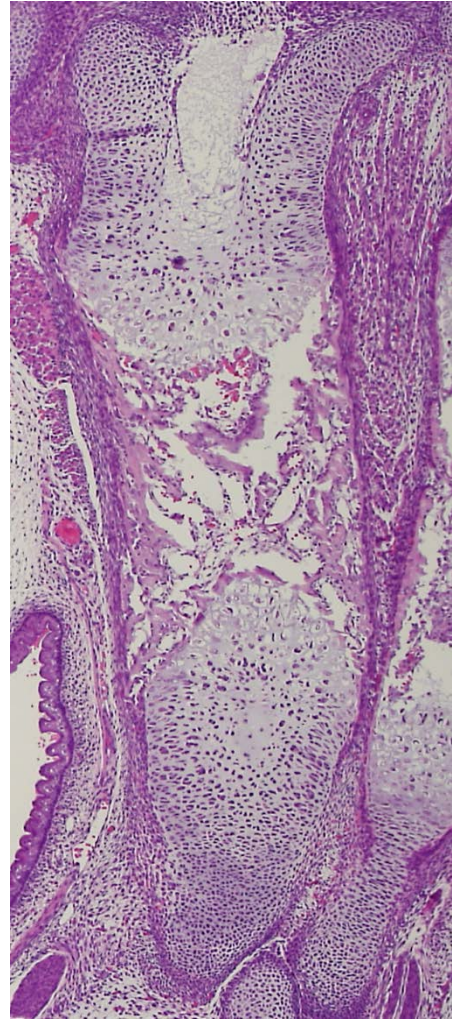
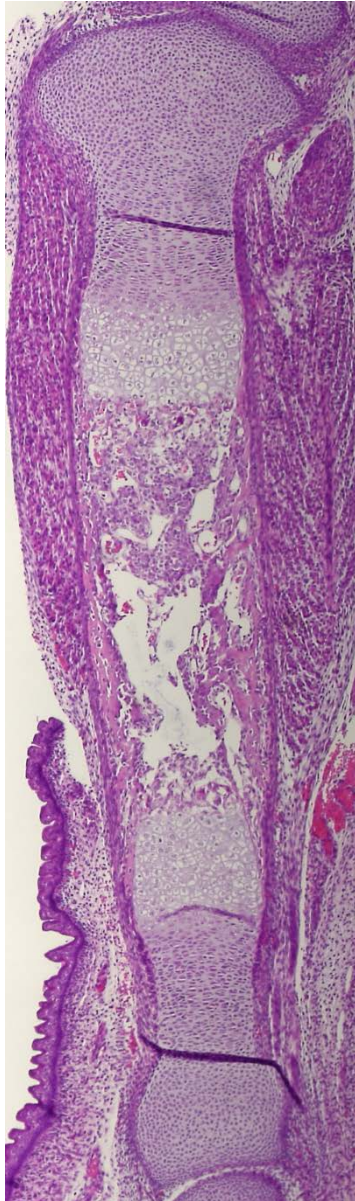


図13 *Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}* 胎生17.5日の脛骨 H-E染色

*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*の脛骨全長H-E染色では成長障害が見られた。骨端部に関節腔から連続する陥凹があり、トランペット型を呈していた。

Scale bar =1mm

Hif1a^{fl/fl}

Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}

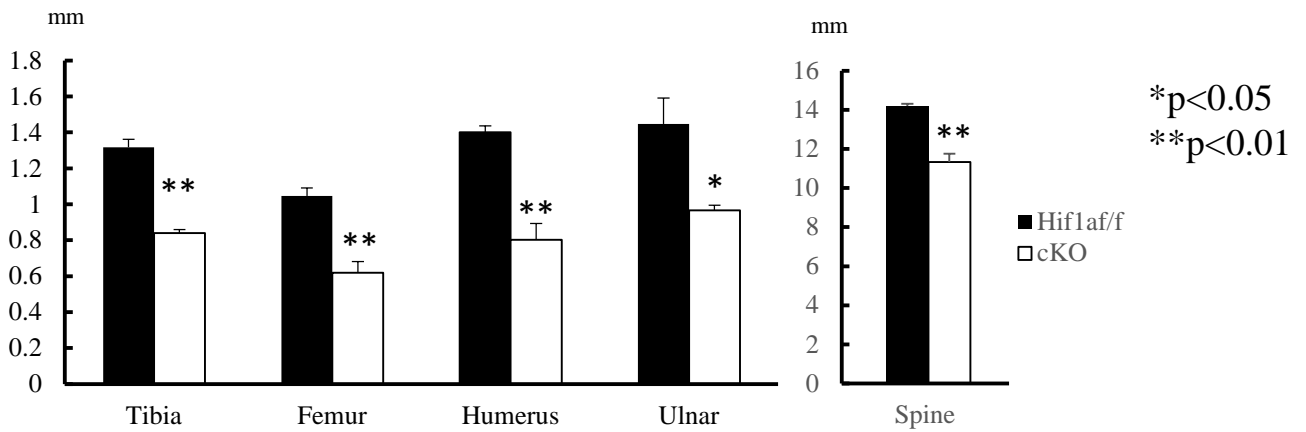
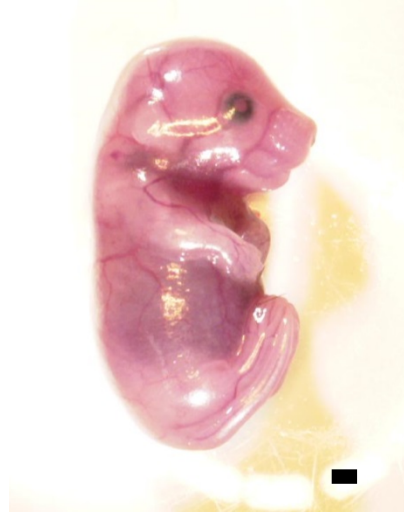
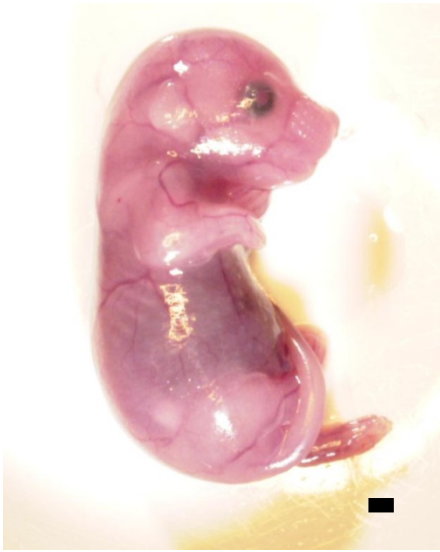


図14 *Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}* 胎生17.5日の骨格二重標本
*Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*では明らかな四肢及び体幹の短縮が見られ、胸郭低形成も伴っていた。
Scale bar = 1mm

Hif1a^{fl/fl} *Col2a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*

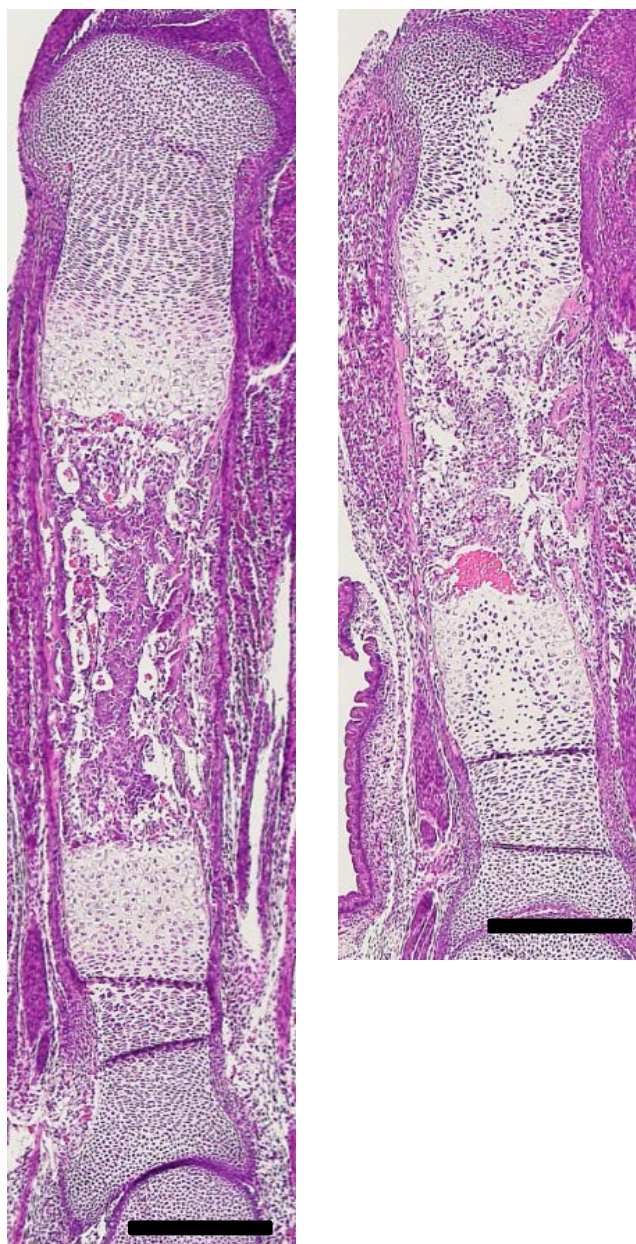


図15 *Col2a1;Hif1a^{fl/fl}* 胎生17.5日の脛骨 H-E染色
Col2a1;Hif1a^{fl/fl} では四肢の成長障害が見られたが*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}*と
比べて関節形成は進行していた。成長板軟骨中央部の破壊が著明で
あった。

Scale bar =1mm

Hif1a^{fl/fl}

Col10a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}

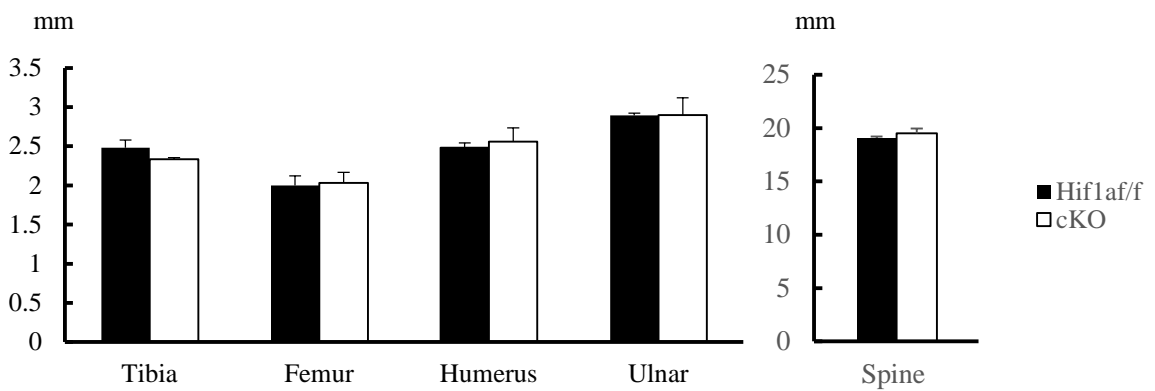


図16 *Col10a1;Hif1a^{fl/fl}* 胎生17.5日の骨格二重標本
*Col10a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*は成長障害を呈さなかった。
Scale bar = 1mm

Hif1a^{fl/fl}

Col10a1-Cre;
Hif1a^{fl/fl}

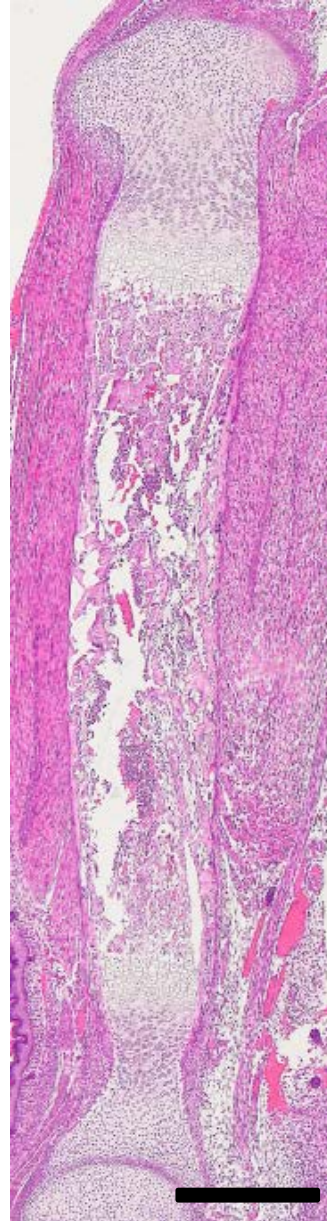
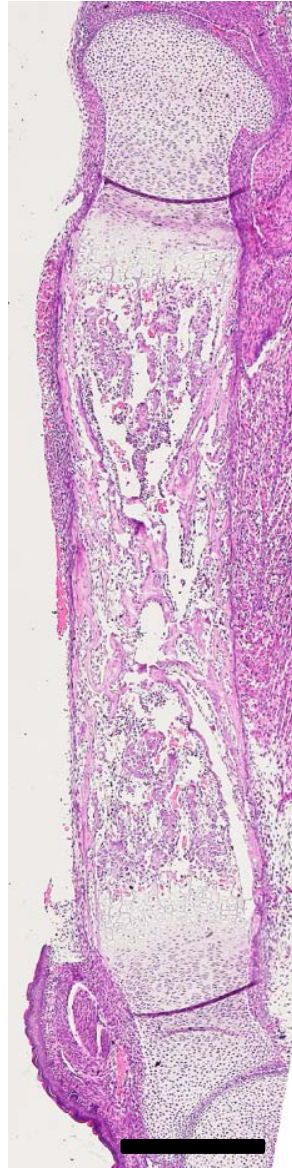


図17 *Col10a1;Hif1a^{fl/fl}* 胎生17.5日の脛骨 H-E染色
*Col10a1-Cre;Hif1a^{fl/fl}*は四肢の成長障害を呈さなかった。
Scale bar =1mm

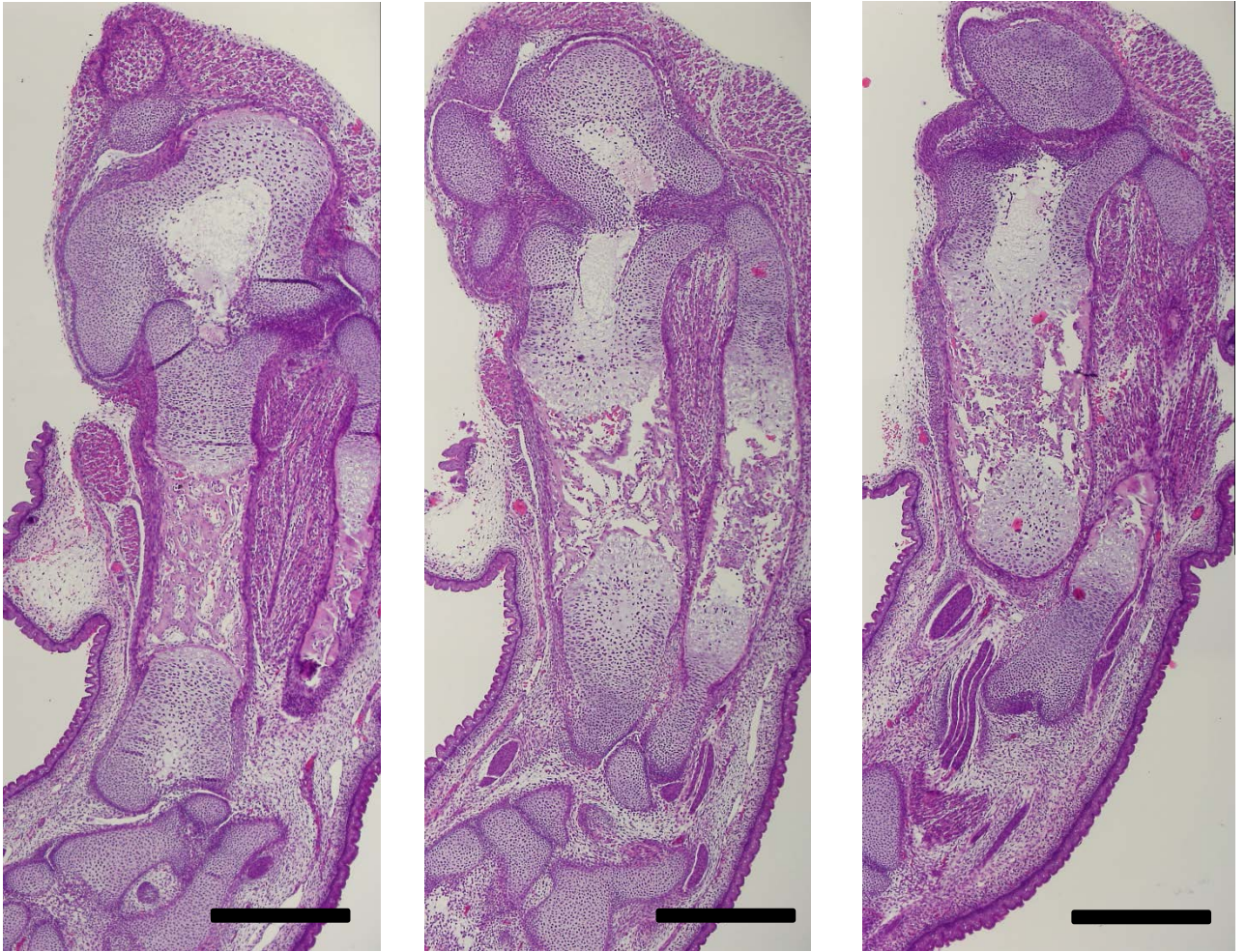


図18 *Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}* 胎生17.5日脛骨連続切片 H-E染色

関節面から連続する陥凹が形成され、骨端部がトランペット型を呈していた。関節内の靭帯形成や半月板形成が見られなかった。

Scale bar =1mm

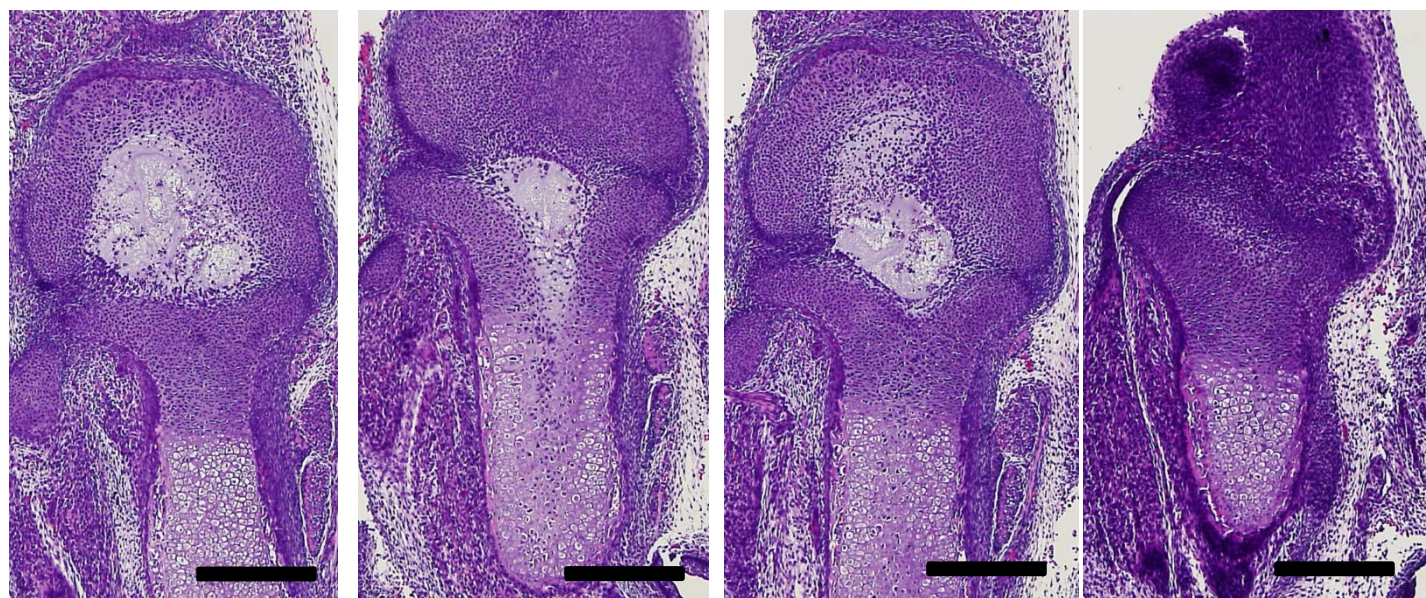
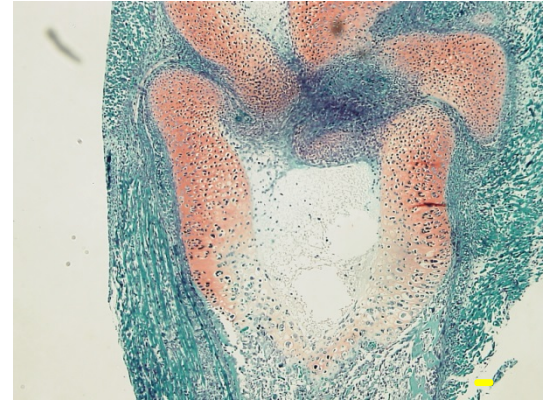
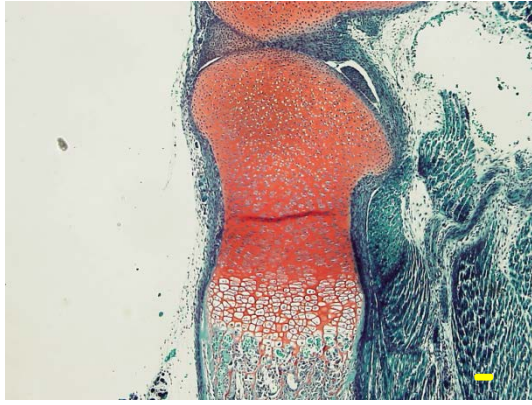


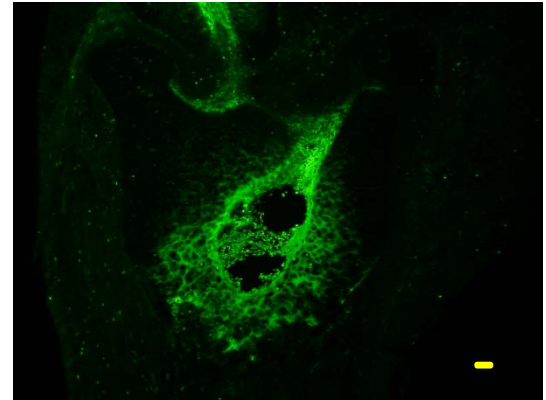
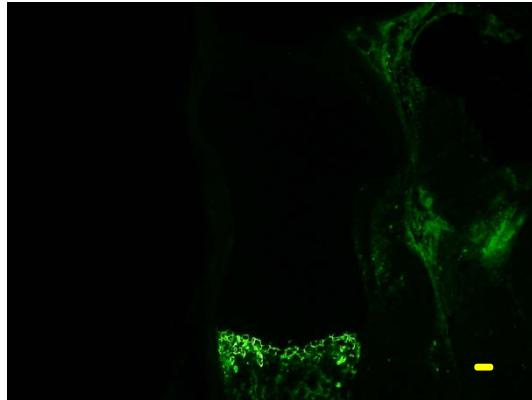
図19 *Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}* 胎生15.5日脛骨連続切片 Toluidine blue染色
胎生15.5日でも陥凹が形成され、骨端部がトランペット型を呈していた。

Scale bar =1mm

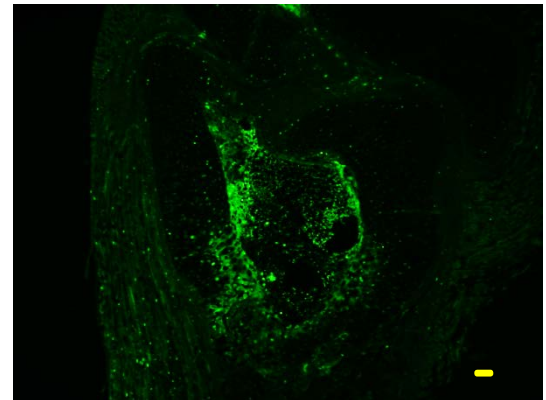
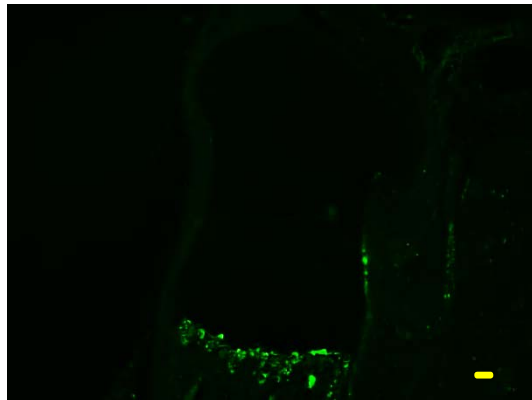
Safranin-O



Mmp13



Hif2a



Hif1a^{fl/fl}

*Sox9-Cre;
Hif1a^{fl/fl}*

図20 新生仔*Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl}* 免疫組織化学染色

Sox9-Cre;Hif1a^{fl/fl} のSafranin-O染色では、プロテオグリカンの減少がみられ、Mmp13およびHif2aの発現が陥凹部周囲で上昇していた。

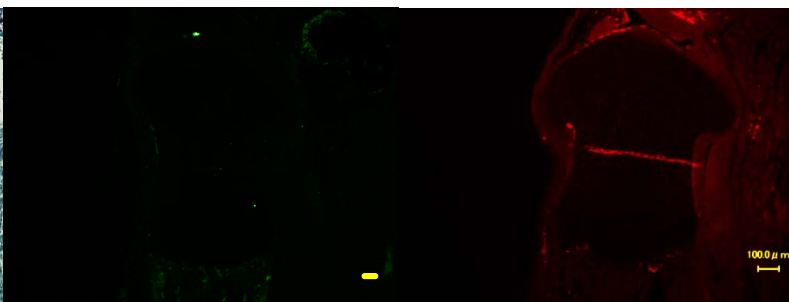
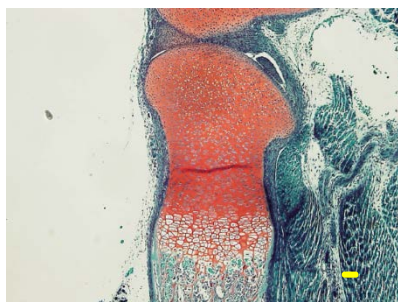
Scale bar =100μm

Safranin O

TUNEL

Cleaved caspase 3

Hif1 α ^{fl/fl}



*Sox9-Cre;
Hif1 α ^{fl/fl}*

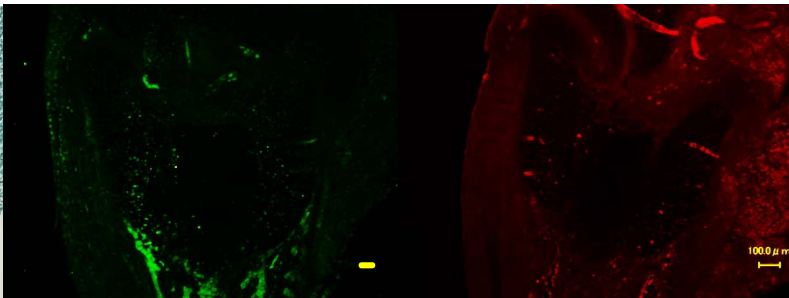
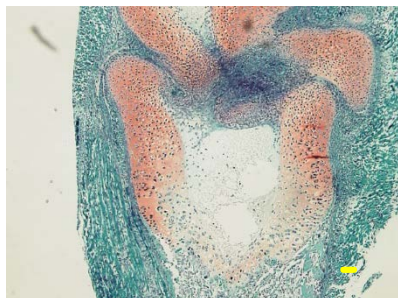


図21 新生仔*Sox9-Cre;Hif1 α ^{fl/fl}* アポトーシスの評価

*Sox9-Cre;Hif1 α ^{fl/fl}*ではTUNEL陽性細胞の著しい増加が見られ、Cleaved caspase 3の発現も上昇し、アポトーシスの亢進が見られた。

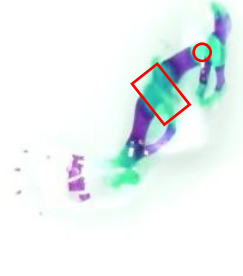
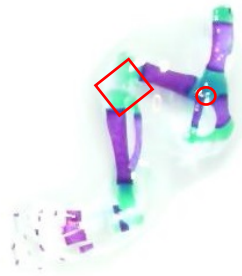
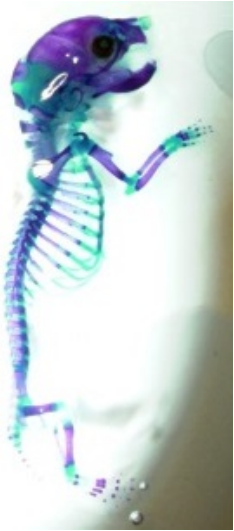
Scale bar =100 μ m

Hif1a^{fl/fl}

*Sox9-Cre;
Hif1a^{fl/fl}*

Hif1a^{fl/fl}

*Sox9-Cre;
Hif1a^{fl/fl}*



* p<0.05
**p<0.01

Real-time RT-PCR

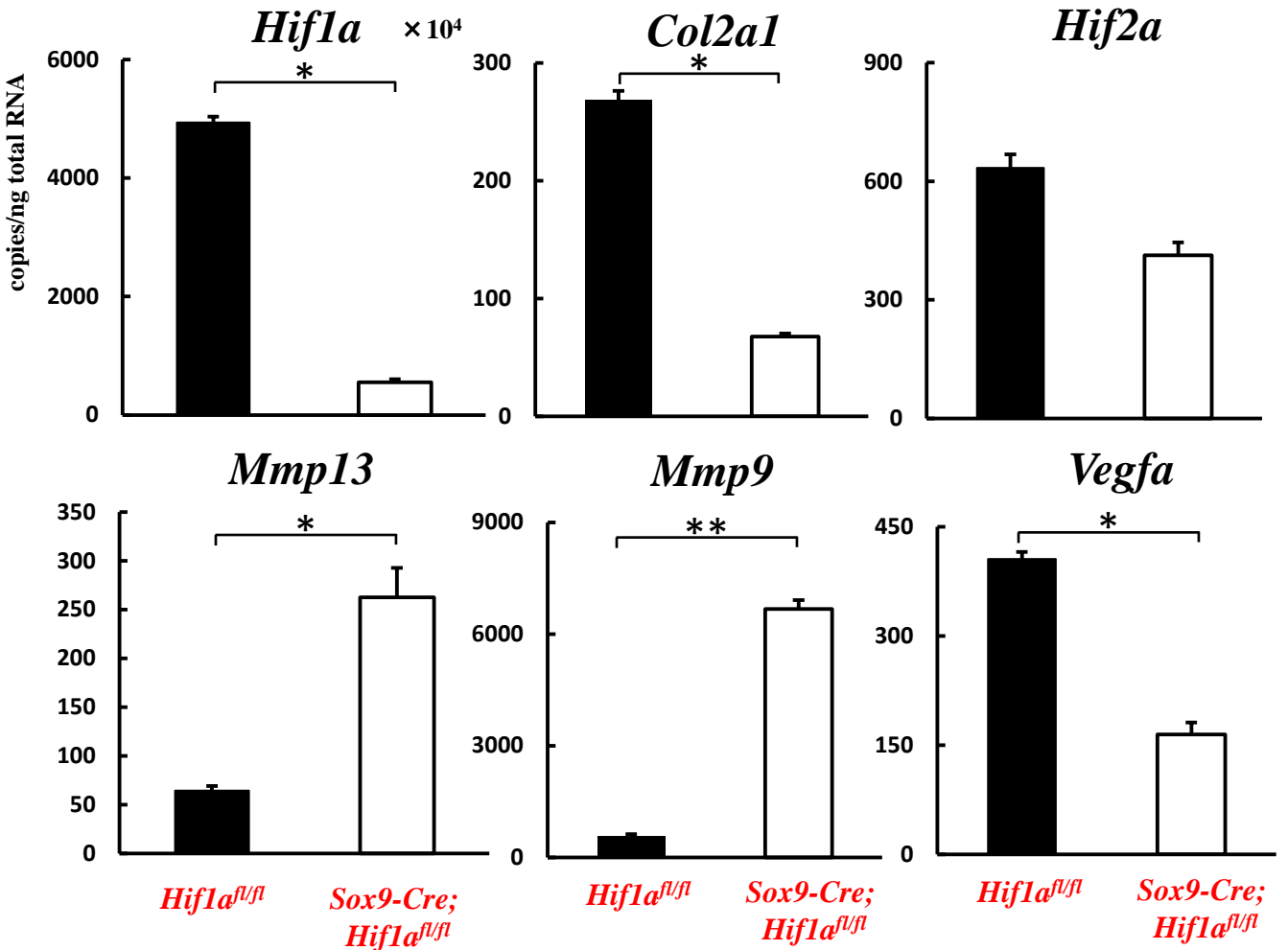


図22 *Sox9-Cre; Hif1a^{fl/fl}* 関節軟骨でのmRNA発現

Sox9-Cre; Hif1a^{fl/fl} 関節軟骨でのmRNA発現では免疫組織化学染色と同様に *Col2a1* の発現が低下し、*Mmp13*, *Mmp9* の発現上昇が見られた。*Hif2a* の発現は有意に上昇していなかった。*Hif1a* と下流の *Vegfa* の発現は低下していた。

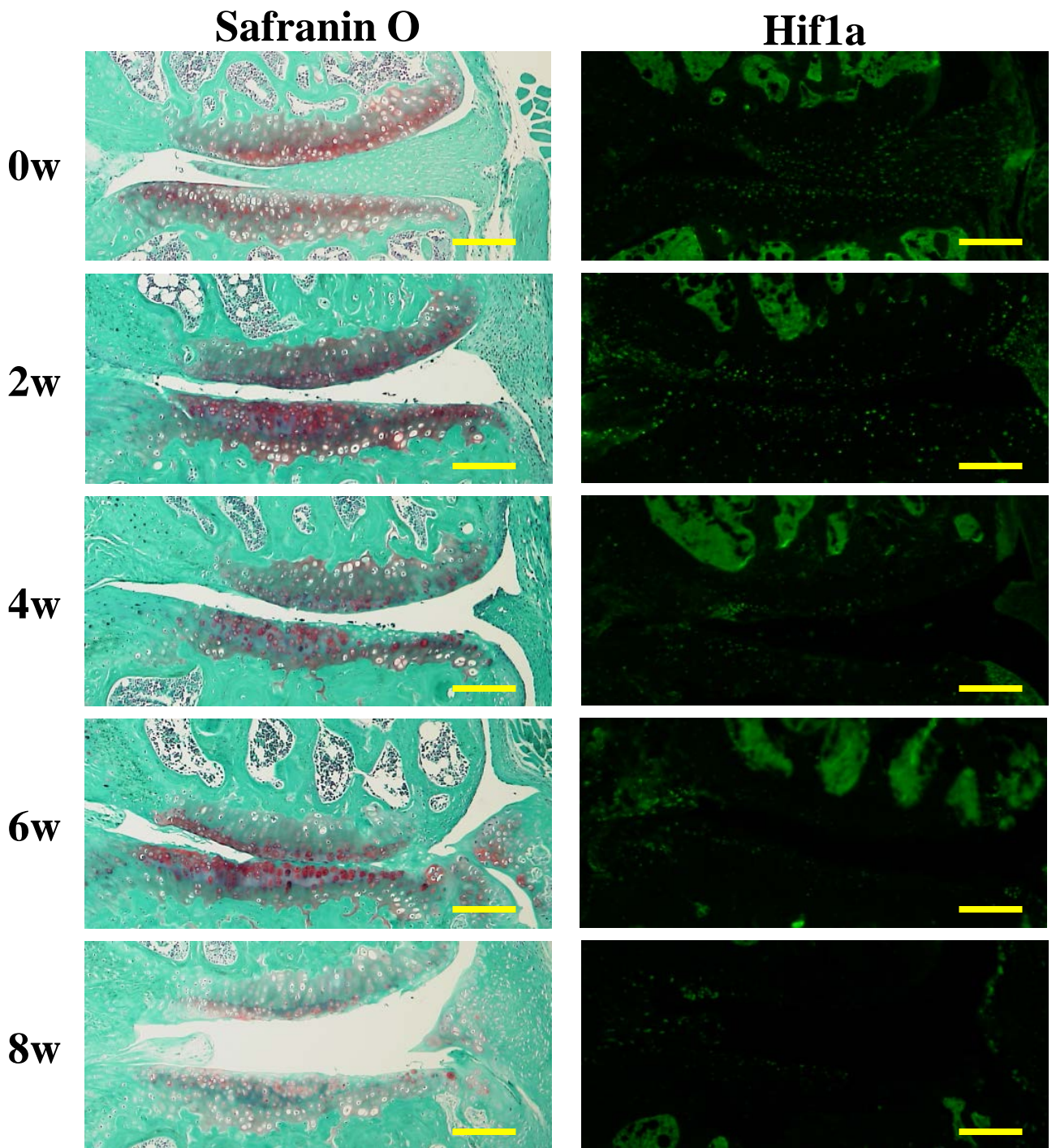


図23 変形性関節症におけるHIF-1 α の発現パターン

マウス変形性関節症モデルでHIF-1 α の発現を時系列で解析した。変形性関節症の進行とともにHIF-1 α の発現は低下していた。

Scale bar = 100 μ m

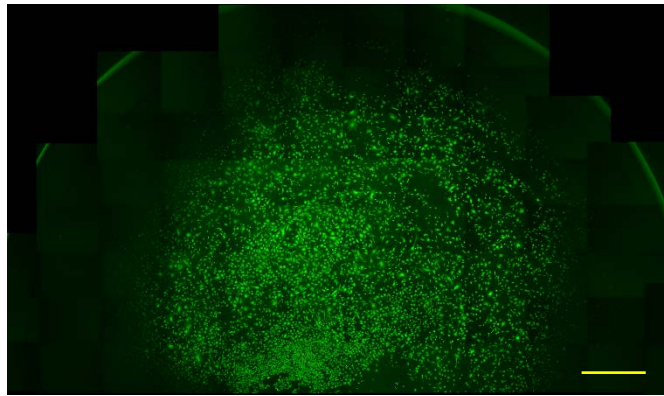
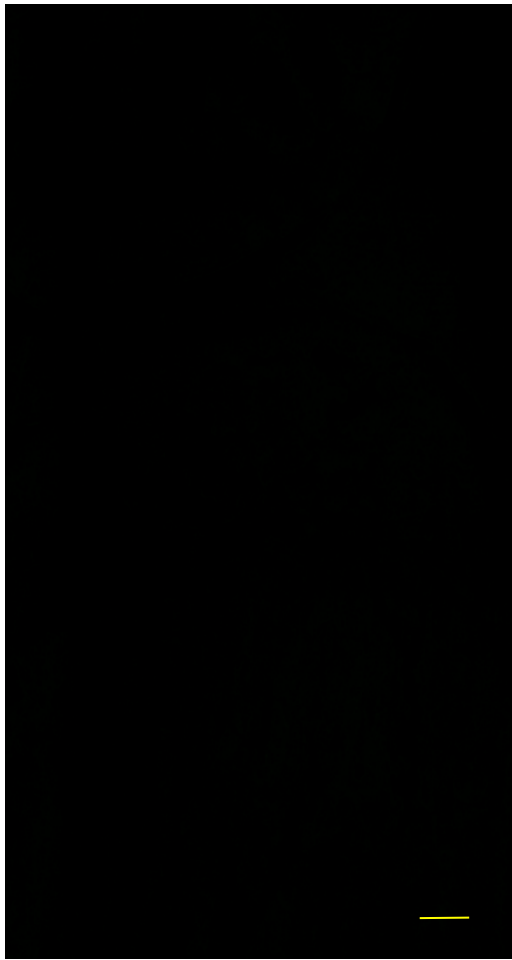


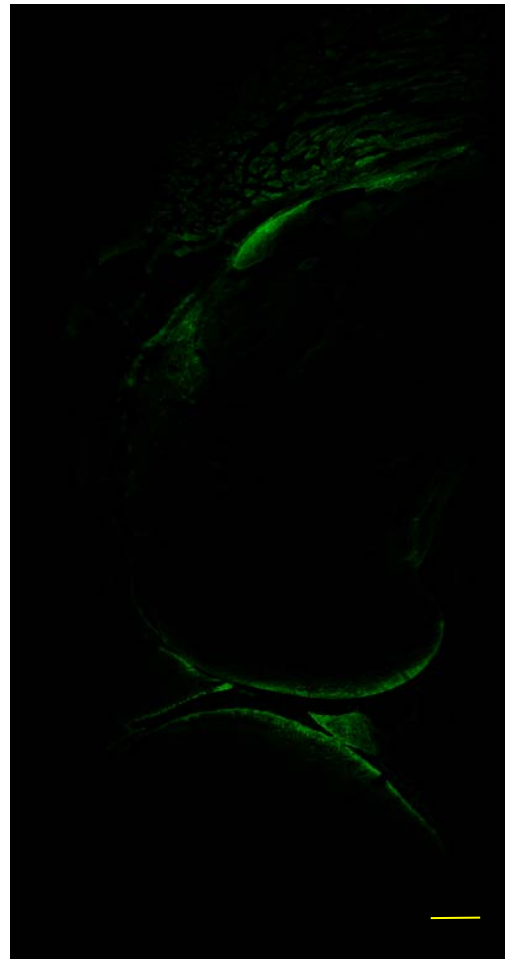
図24 低酸素プローブの作動確認

関節軟骨細胞で低酸素プローブの作動性を確認するため、ガラス底培養皿で初代培養関節軟骨を培養した。低酸素プローブを添加してからカバーガラスを被せ、中心部を低酸素状態にすると1時間後には中央の低酸素領域でロダミンの発光が確認された。

Scale bar =1mm



Probe (-)



Probe (+)

図25 *in vivo*での低酸素プローブの作動確認

*in vivo*で低酸素プローブの作動性を確認するため大腿動脈を結紮して低酸素状態を作製した。結紮後、低酸素プローブを10 μ l関節注射し、5時間後に観察するとロダミン発光が確認された。

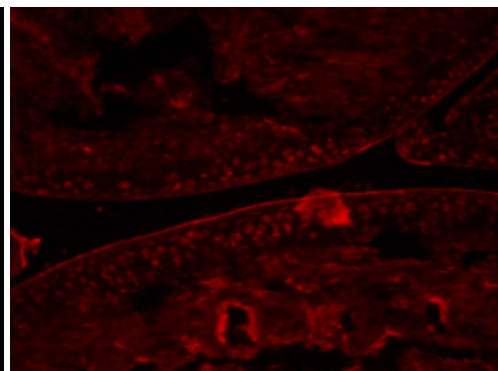
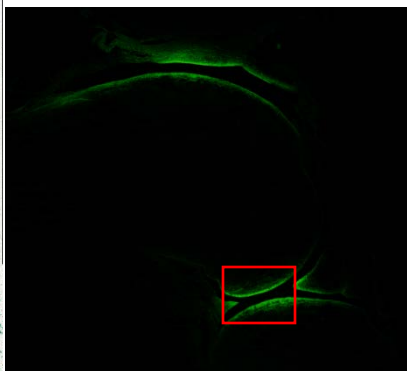
Scale bar =200 μ m

Safranin-O

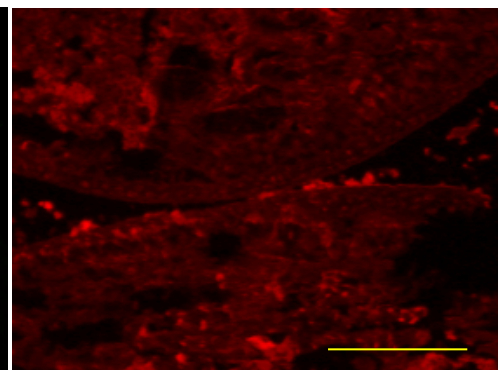
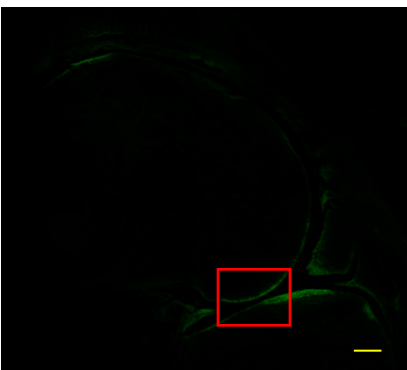
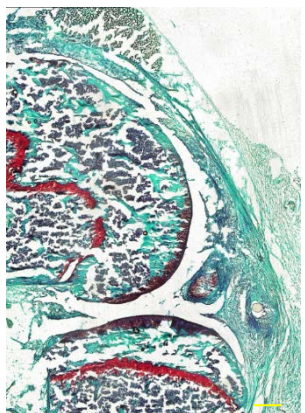
低酸素プローブ

Hif1a

0w



4w



8w

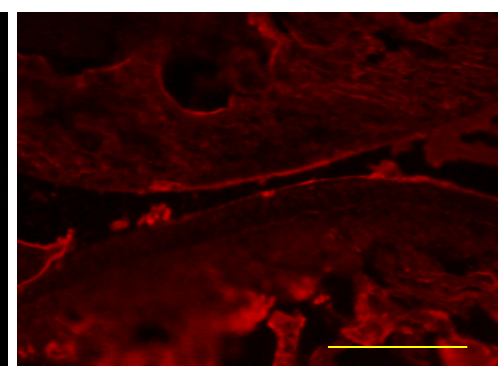
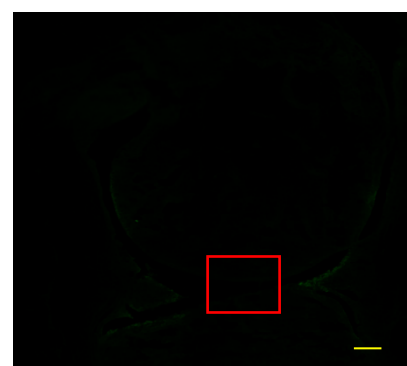
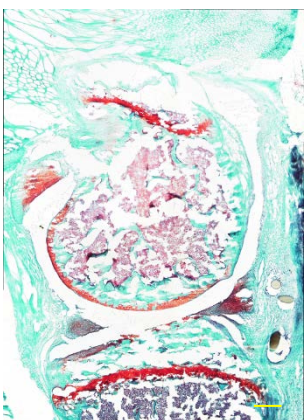


図26 変形性関節症モデルにおける関節軟骨の酸素濃度変化

変形性関節症モデルを作製し、0週、4週、8週で酸素濃度とHIF-1 α の発現を確認した。変性の進行とともに関節軟骨の酸素濃度は上昇し、HIF-1 α の発現は低下した。

Scale bar =200 μ m

Tamoxifen
(100 μ g/g)
5 days

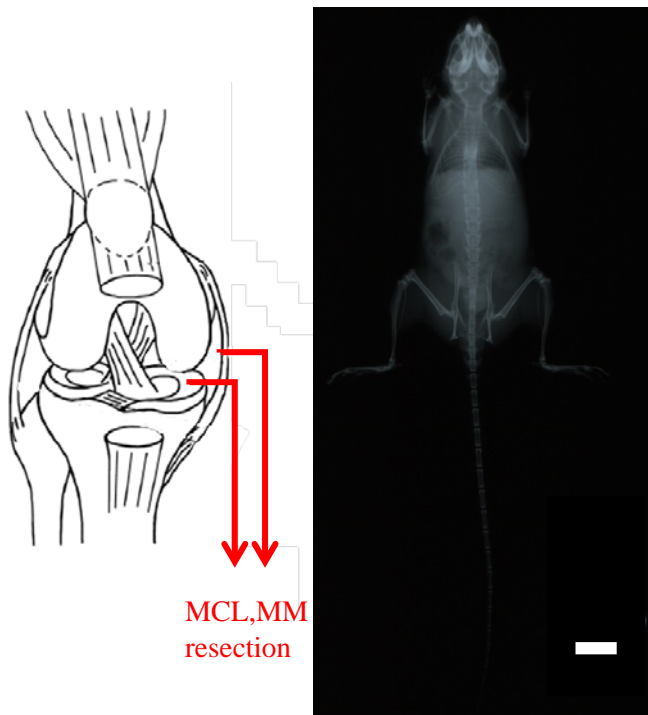
Ope
↓

Sacrifice
↓

7w

8w

16w

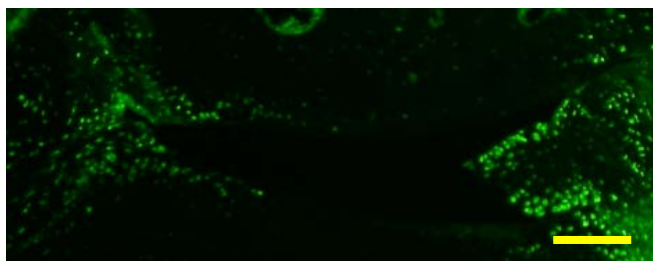


Hif1a^{fl/fl}

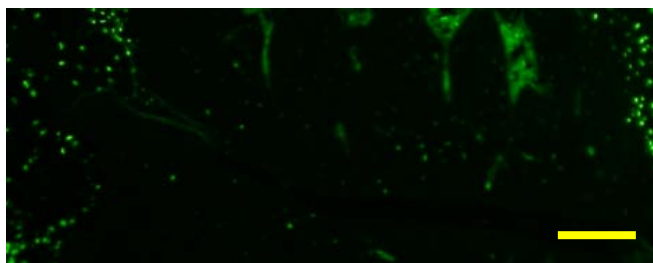


Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}

IHC: anti HIF-1 α antibody



Hif1a^{fl/fl}



Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}

図27 *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}* 変形性関節症モデル

*Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}*マウスに7週齢でタモキシフェンを5日間腹腔内投与し、8週齢で変形性関節症モデルを作製した。8週間後に膝関節をOARSI scoreと免疫組織化学染色で評価した。*Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}*は8週時点で成長に差はなく、HIF-1 α は高率にノックアウトされていた。

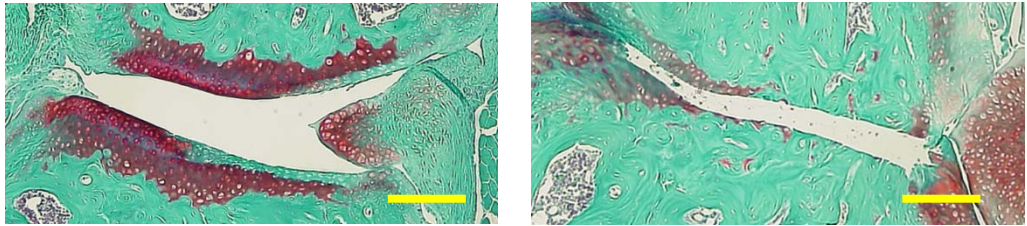
Xp: Scale bar =1cm

IHC: 100 μ m

X-ray



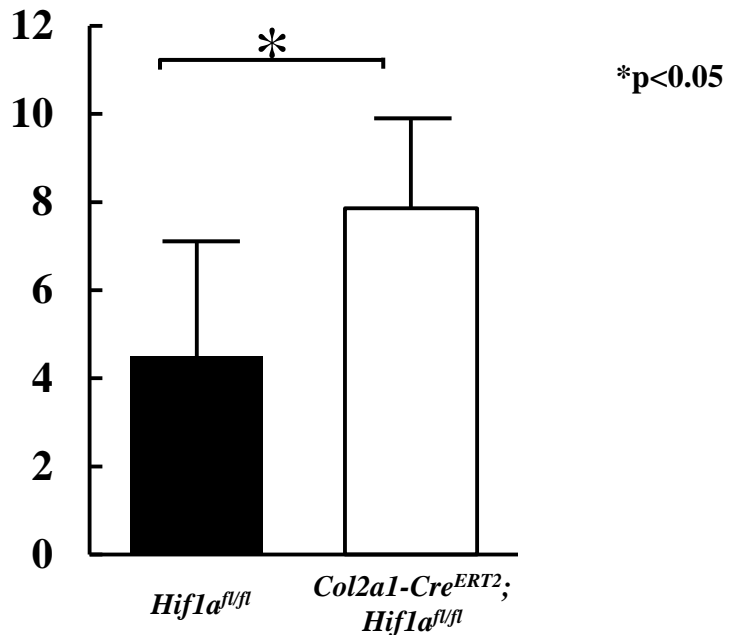
Safranin-O



Hif1a^{fl/fl}

Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}

OARSI score



Hif1a^{fl/fl} : Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}=8:8

図28 *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}* 変形性関節症モデル

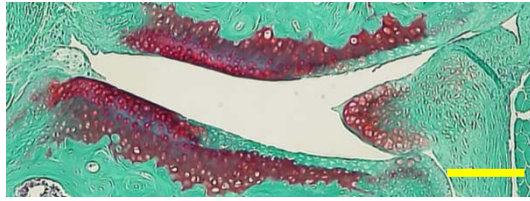
Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl} 変形性関節症モデルマウスでは*Hif1a^{fl/fl}* と比べ変形性関節症がX線でもOARSI scoreでも進行していた。

Xp : Scale bar =200μm

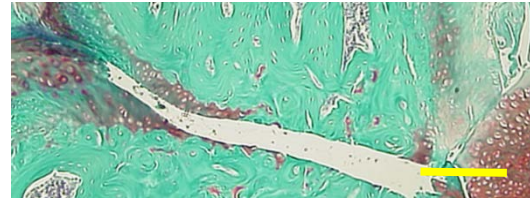
組織切片 : Scale bar =100μm

Medial joint

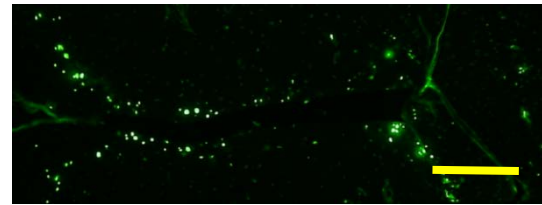
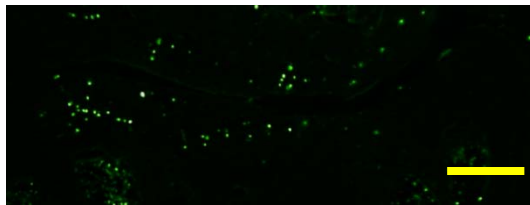
Safranin O



Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1 $\alpha^{fl/fl}$

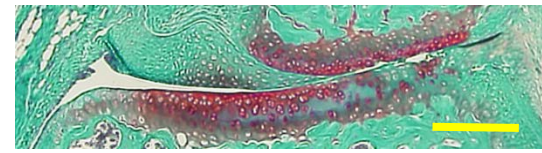
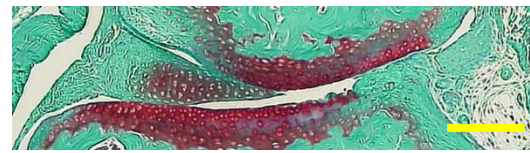


TUNEL

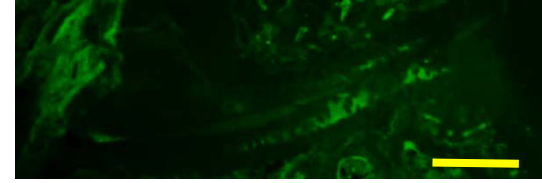
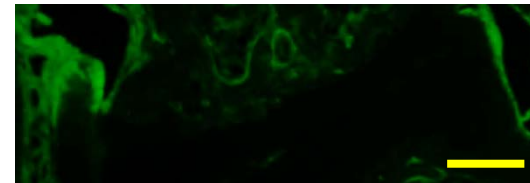


Lateral joint

Safranin O



Mmp13



Hif2a

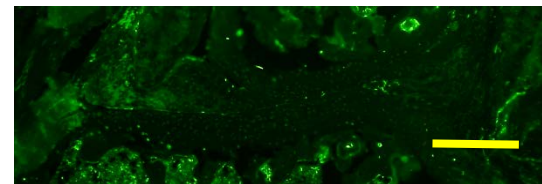
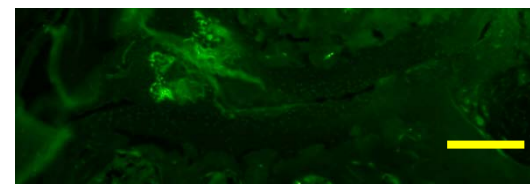


図29 *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1 $\alpha^{fl/fl}$* 変形性関節症モデルの解析

Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1 $\alpha^{fl/fl}$ 変形性関節症モデルマウスの免疫組織化学染色では *Hif1 $\alpha^{fl/fl}$* と比べMmp13とHif2aの発現が上昇し、アポトーシスの亢進が見られた。

Scale bar =200 μ m

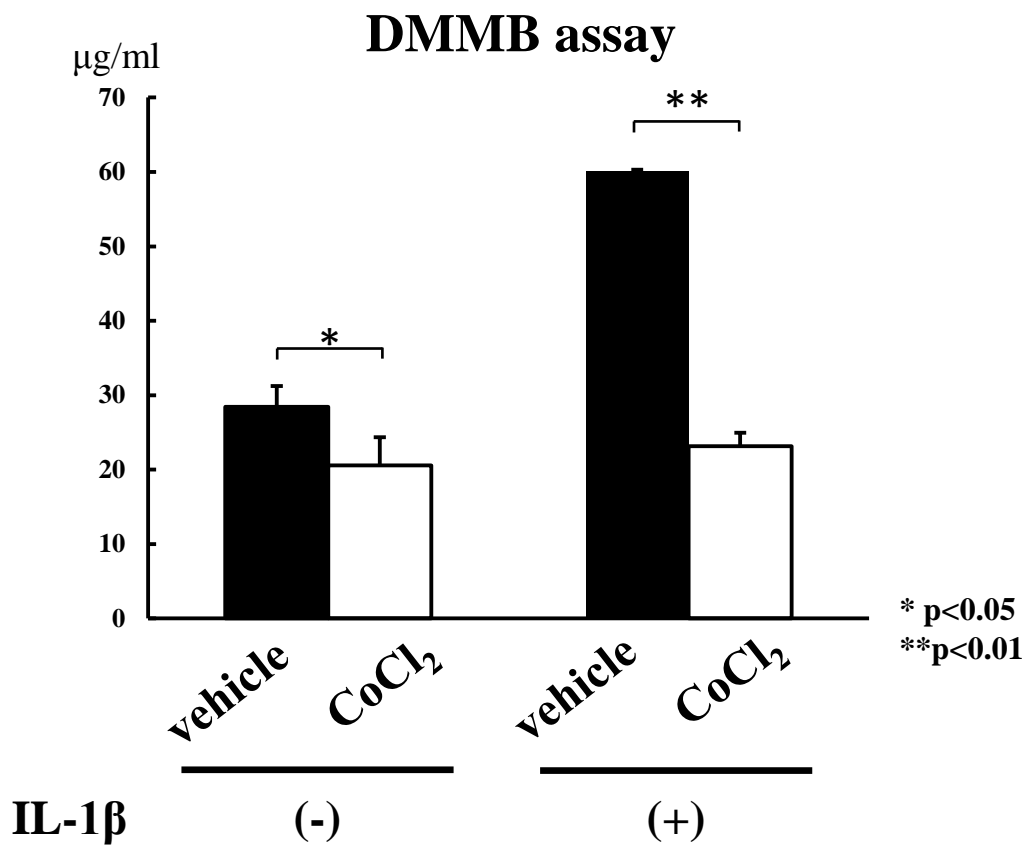


図30 大腿骨頭を用いたHIF-1 α の基質分解能評価
 HIF1- α を塩化コバルトで分解を抑制し、過剰発現の状態にすると基質分解は有意に抑制された。

Loss of HIF-1 α by Tamoxifen in *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1 α ^{fl/fl}*

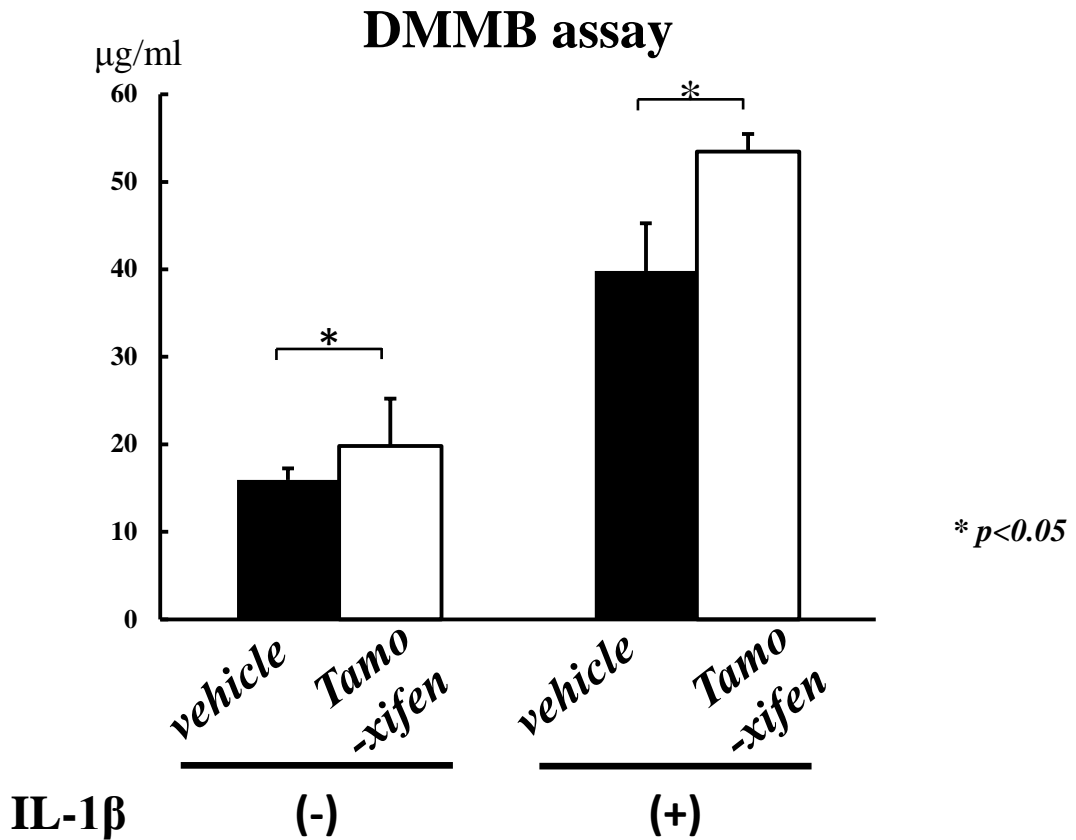
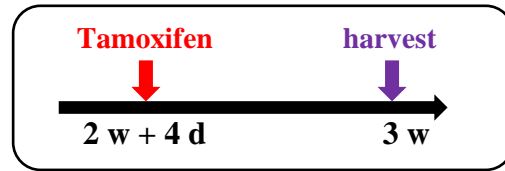
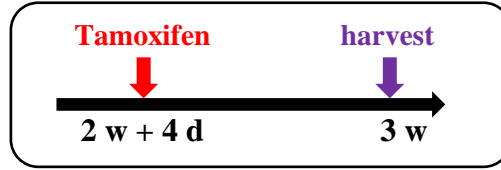


図31 大腿骨頭を用いたHIF-1 α の基質分解能評価

2週4日齢 $Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1\alpha^{fl/fl}$ にvehicleとタモキシフェンを腹腔内投与し、3週齢で大腿骨頭を採取し基質分解能を評価すると、タモキシフェン注射群では基質分解が有意に増加した。

Loss of HIF-1 α by Tamoxifen
in *Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}*



IL-1 β (+)

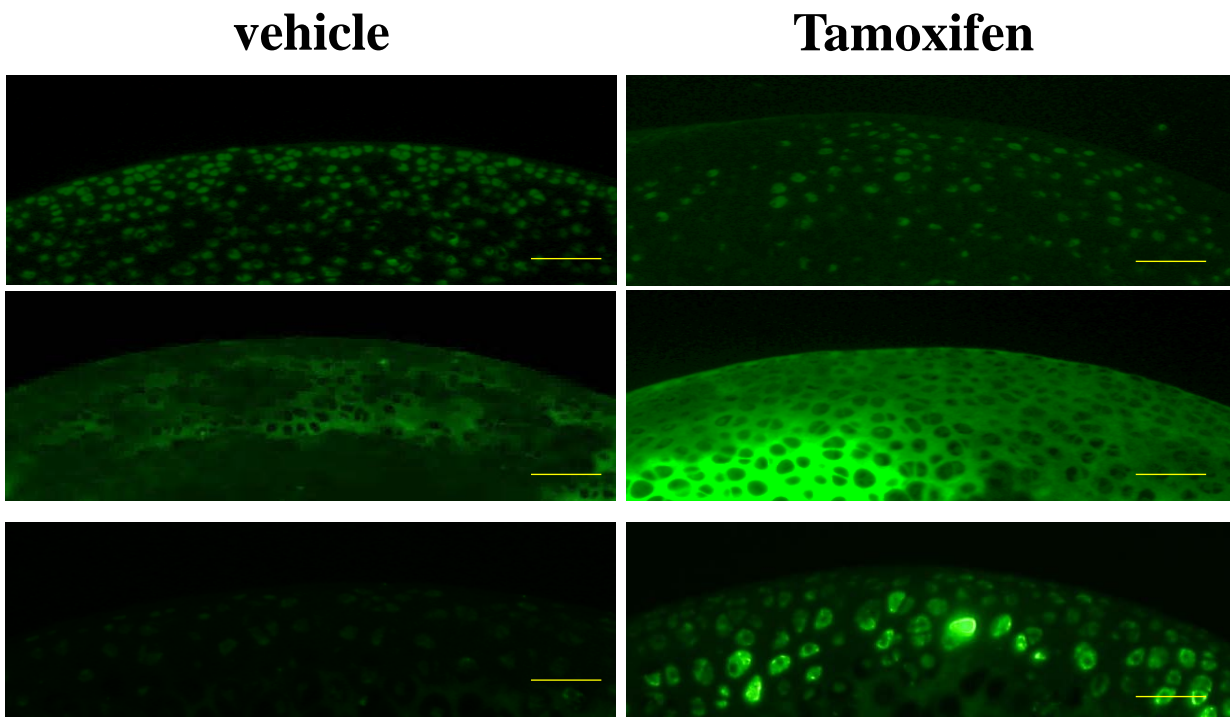


図32 大腿骨頭を用いたHIF-1 α の基質分解能評価

2週4日齢 $Col2a1-Cre^{ERT2};Hif1a^{fl/fl}$ にvehicleとタモキシフェンを腹腔内投与し、3週齢で大腿骨頭を採取し基質分解能を評価した大腿骨頭で免疫組織染色を行うとMmp13とHif2aの発現が上昇していた。

Scale bar = 50 μ m

Real-time RT-PCR

Normoxia + IL-1 β 10 ng/mL

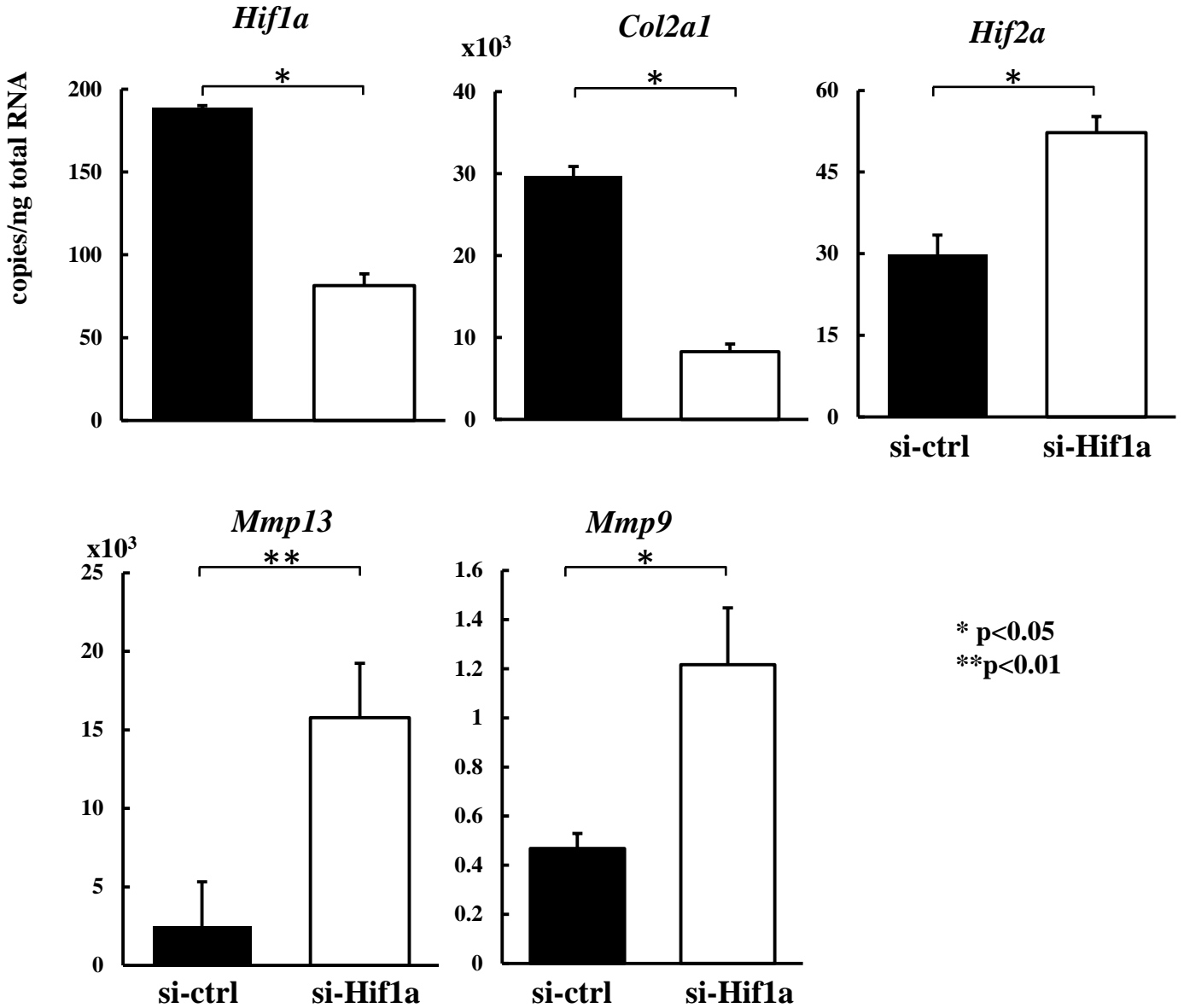


図33 初代関節軟骨細胞のHIF-1 α をsiRNAで抑制

IL1 β 刺激下の初代関節軟骨細胞におけるHIF-1 α をsiRNAで抑制すると軟骨基質であるCol2a1の発現は低下し、Hif2a, Mmp13, Mmp9の発現が上昇した。

Real-time RT-PCR

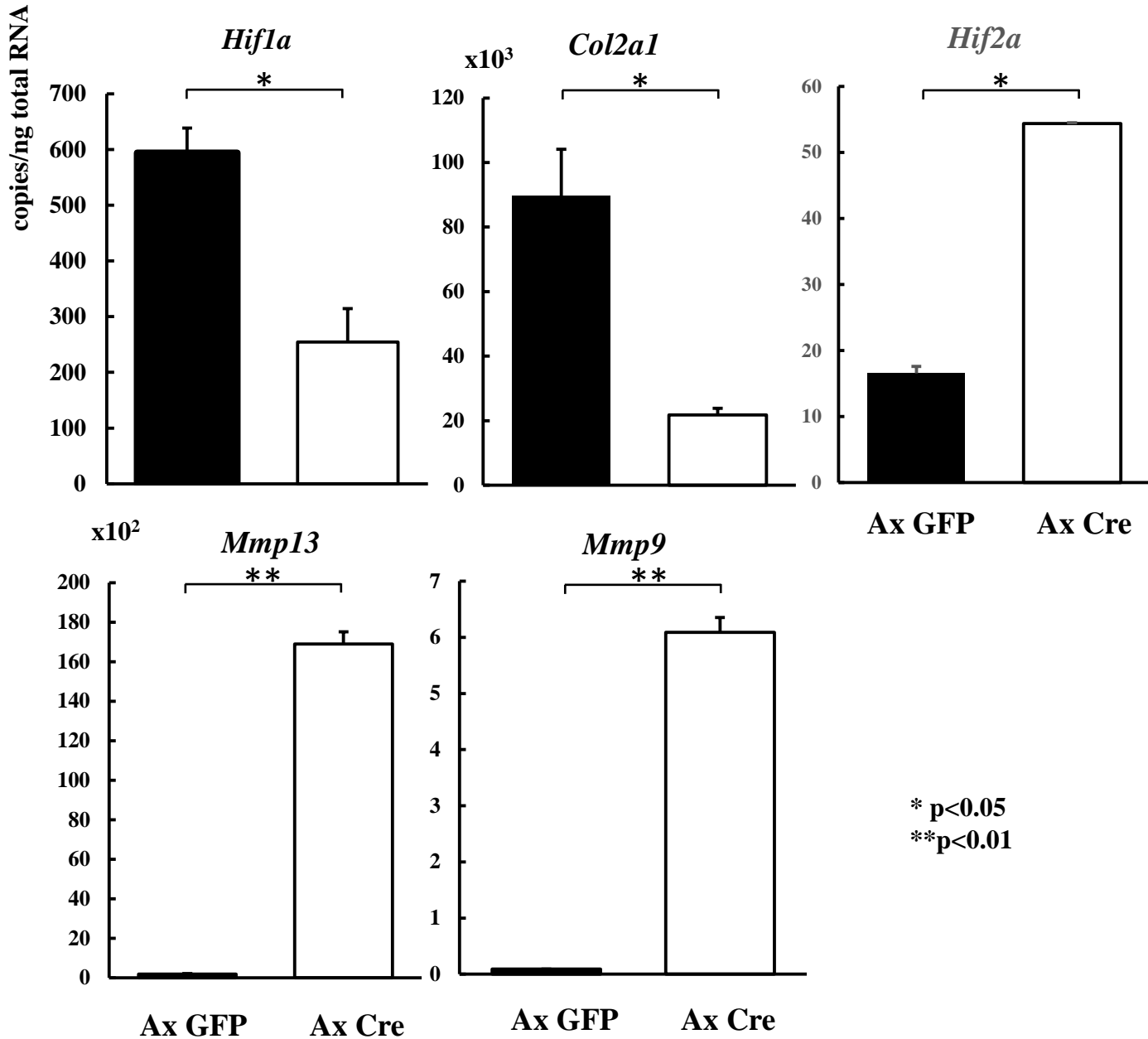


図34 アデノウィルスを用いて*Hif1a*^{fl/fl}マウス初代関節軟骨のHIF-1 α を抑制

siRNAを用いたHIF-1 α の結果と同様に、軟骨基質である*Col2a1*の発現は低下し、*Hif2a*, *Mmp13*, *Mmp9*の発現が上昇した。

Real-time RT-PCR

1% O₂ + IL-1 β 10 ng/mL

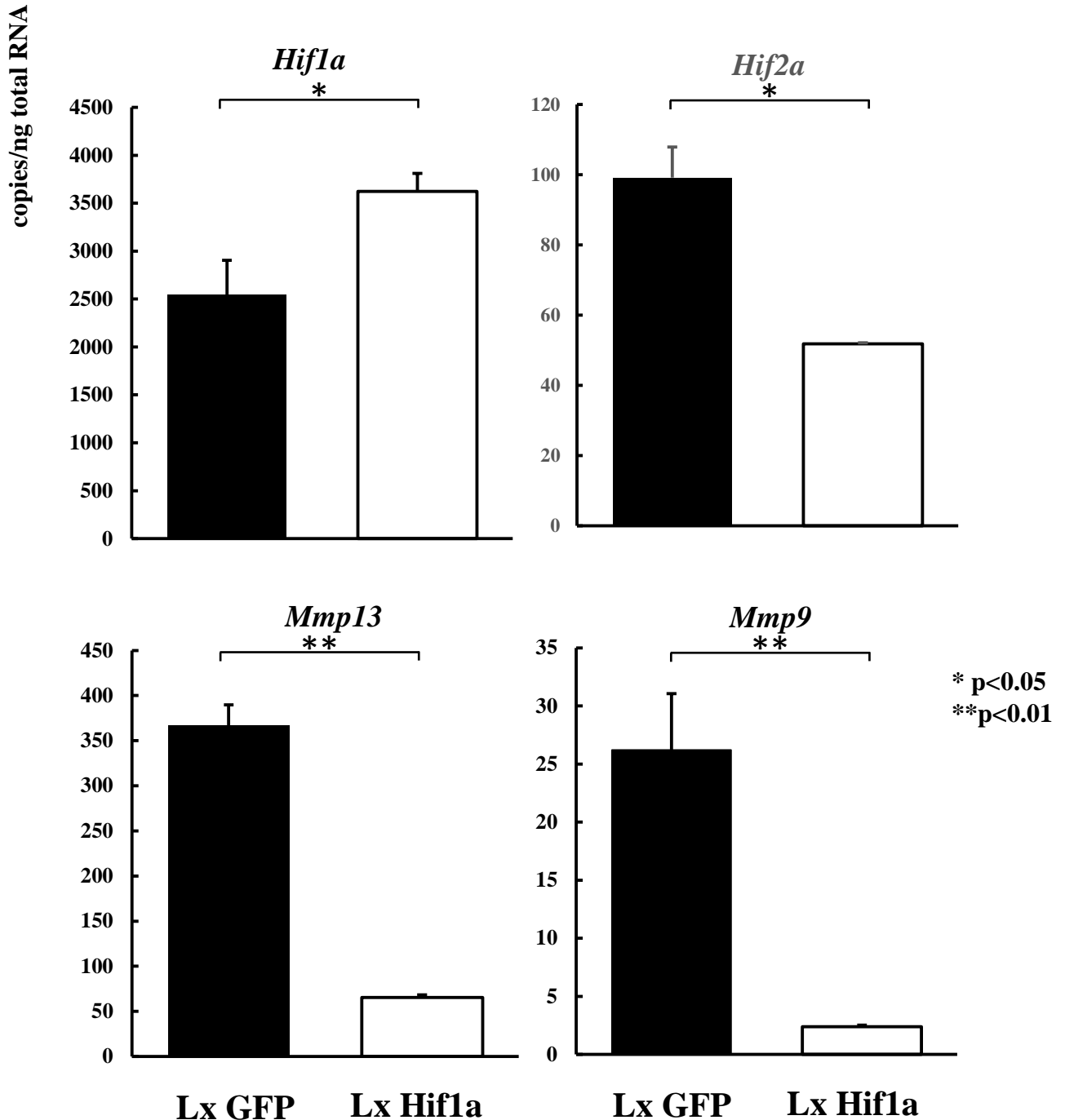


図35 ATDC5細胞株にレンチウイルスでHIF-1 α を強制発現
ATDC5細胞株にレンチウイルスを安定導入し、ドキシサイクリン誘導性にHIF-1 α を強制発現した。IL-1 β 刺激下に培養すると、Hif2a, Mmp13, Mmp9の発現は有意に低下した。

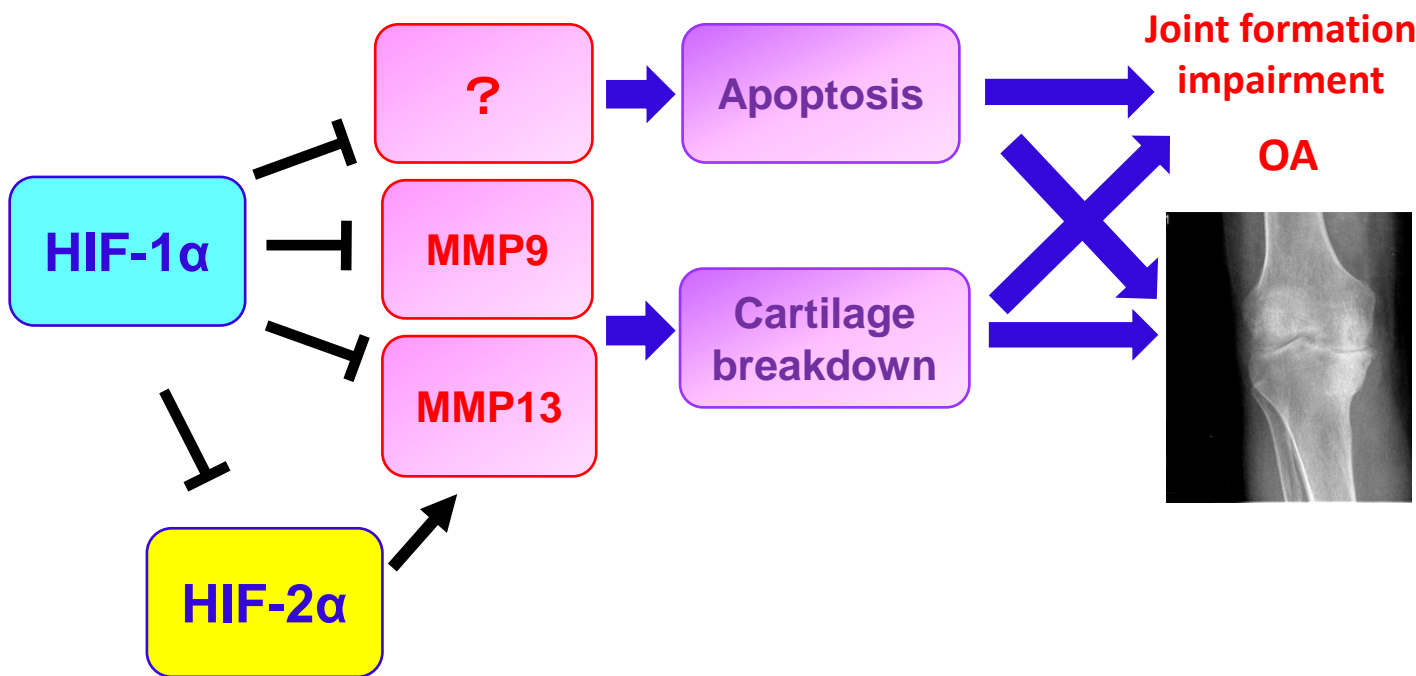


図36 まとめ

関節軟骨の形成と恒常性維持においてHIF-1αは一部Hif2aを介して Mmp13、Mmp9などのCatabolic factorとアポトーシスを抑制することで保護的に作用することがわかった。