

## 論文の内容の要旨

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

氏名 岡田 慶太

### 【要旨】

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無血管組織もあり、その中の代表的な組織の一つが関節軟骨である。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。関節内の酸素環境は通常 6-9%に保たれており、変性や炎症によってさらに低下する。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かった。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、生体内で詳細に検討された報告はない。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されている低酸素誘導因子 (Hypoxia inducible factor, HIF)、特に低酸素環境での生存に関与する HIF-1 $\alpha$  について研究を行った。

本研究はまず HIF-1 $\alpha$  の関節形成への関与を解析するために様々なコンディショナルノックアウトマウスを作出し、成長板軟骨を詳細に検討した。続いて関節軟骨の恒常性維持において HIF-1 $\alpha$  の機能解析するためにマウス変形性関節症モデルと *ex vivo, in vitro* の系を用いて検討した。さらに関節軟骨の酸素濃度変化を調べるために低酸素プローブを用いて検討した。

まず成長板軟骨における HIF-1 $\alpha$  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 日まで作製した。抗 HIF-1 $\alpha$  抗体を使用して免疫組織化学染色を行うと前肥大層に最も強く発現していることがわかった。

この結果を確認するため、*Col2a1-Cre<sup>ERT2</sup>;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* マウスを用いて軟骨発生の異なる段階で HIF-1 $\alpha$  を軟骨特異的にノックアウトして間接的に発現部位特定することとした。すると胎生 15.5 日以前に軟骨特異的に HIF-1 $\alpha$  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わかった。よって HIF-1 $\alpha$  は前肥大細胞層に多く発現し、軟骨形成に不可欠であることが確認された。

続いて四肢形成ならびに軟骨内骨化における HIF-1 $\alpha$  の機能解析を行うために様々なコンディショナルノックアウトマウスを作製して胎生 17.5 日で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。すると *Prx1-Cre;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* 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<sup>fl/fl</sup>*、*Col2a1-Cre;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* 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<sup>fl/fl</sup>* 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 $\alpha$  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。

そこで HIF-1 $\alpha$  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<sup>fl/fl</sup>* マウスの成長板軟骨を詳細に解析した。胎生 17.5 日の *Sox9-Cre;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* 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。また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。

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、免疫組織化学染色で Catabolic factor の *Mmp13* と *Hif2a* の発現が陥凹部を中心に上昇していた。アポトーシスについて調べるために TUNEL 染色を行うと陥凹部を中心に TUNEL 陽性細胞が多く存在し、Cleaved Caspase 3 の発現も同様に上昇していた。よって HIF-1 $\alpha$  欠失により軟骨細胞で Catabolic factor の発現上昇とアポトーシスの亢進が見られた。

mRNA レベルでの発現解析を行うため、胎生 18.5 日の *Sox9-Cre;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* と *Hif1a<sup>fl/fl</sup>* から大腿骨頭、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 を回収し、リアルタイム RT-PCR で発現解析を行ったところ、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。これはタンパクレベルで上昇している可能性があり、今後検討が必要と考えている。

次に HIF-1 $\alpha$  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。はじめに変形性関節症の進行に伴う HIF-1 $\alpha$  の発現パターンを観察すると変性の進行に伴い HIF-1 $\alpha$  の発現が減少していた。そこで HIF-1 $\alpha$  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を検討するために、東京大学薬学部で開発された低酸素プローブを使用した。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が作動するか検討した。In vitro で作動確認がとれたため、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現が減弱し、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 $\alpha$  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 $\alpha$  の発現が低下していた。

つづいて関節軟骨における HIF-1 $\alpha$  の機能を詳細に解析するため軟骨特異的に HIF1- $\alpha$  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 $\alpha$  をノックアウトすると出生直後に死亡するため、*Col2a1-Cre<sup>ERT2</sup>;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* 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 $\alpha$  をノックアウトした。8 週齢の時点では *Col2a1-Cre<sup>ERT2</sup>;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* マウスと *Hif1a<sup>fl/fl</sup>* マウスの骨格に差はなかった。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<sup>ERT2</sup>;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* マウスでは *Hif1a<sup>fl/fl</sup>* マウスと比べ軟骨の変性が進行し、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。そこで免疫組織化学染色を行なったところ、HIF-2 $\alpha$ 、*Mmp13* が上昇し、TUNEL 染色ではアポトーシスが亢進していた。以上の結果より、HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$  の欠失により変形性関節症は進行し、HIF-2 $\alpha$ 、*Mmp13* の発現が上昇とアポトーシスが亢進した。よって HIF-1 $\alpha$  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。

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

HIF1- $\alpha$  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 $\beta$  を添加した培地で 72 時間 ex vivo 培養した。培養液中のグリコサミノグリカン (GAG) の量を DMMB アッセイで比較すると、塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>) で HIF-1 $\alpha$  を安定化させた骨頭では GAG の溶出が IL1 $\beta$  の有無にかかわらず有意に低下していた。そこで HIF-1 $\alpha$  が低下した状態で GAG の溶出を見るために *Col2a1-Cre<sup>ERT2</sup>;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* マウスを用いて 2 週齢の段階から HIF-1 $\alpha$  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 の溶出は優位に上昇した。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 HIF-2 $\alpha$ 、Mmp13 の発現が上昇していた。

次に *in vitro* で HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$  を抑制した状態で IL1 $\beta$  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。続いて *Hif1a*<sup>fl/fl</sup> 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に感染させて HIF-1 $\alpha$  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。

最後に HIF-1 $\alpha$  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 $\alpha$  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 時間培養後、低酸素インキュベーター (1%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 37°C) に移して 24 時間培養し mRNA を回収すると HIF-1 $\alpha$  の抑制系とは逆に Mmp13、Mmp9、Hif2a の発現が低下していた。

以上の結果より関節軟骨の形成と恒常性維持において HIF-1 $\alpha$  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。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、これらと相まって HIF-1 $\alpha$  発現が低下するという新しい知見が得られた。よって HIF-1 $\alpha$  の発現を薬剤や関節内の酸素濃度環境を変化することでコントロールできれば、変形性関節症の予防・治療につながる可能性が示された。