

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名：岡田慶太

本研究は転写因子 HIF-1 $\alpha$  の関節軟骨の形成・維持に関する役割を明らかにするためにノックアウトマウスを用いて発生段階における HIF-1 $\alpha$  の機能を解析し、マウス変形性関節症モデルを用いて関節軟骨維持における HIF-1 $\alpha$  の機能を解析して下記の結果を得ている。

1. マウス胎仔成長板軟骨の免疫組織化学染色で HIF-1 $\alpha$  は前肥大細胞層に多く発現し、関節軟骨中央部を中心に多く発現していた。また *Col2a1-Cre<sup>ERT2</sup>;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* マウスを用いて胎生期より HIF-1 $\alpha$  を軟骨特異的にノックアウトしたところ、成長板軟骨中央部から壊死像が見られた。これらの結果より HIF-1 $\alpha$  が前肥大細胞層に多く発現し、関節軟骨に重要な役割を担っていることが示された。
2. 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コンディショナルノックアウトマウスを作製して骨格形成を比較した。*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、*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 *Coll10a1-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された。
3. *Sox9-Cre;Hif1a<sup>fl/fl</sup>* マウス膝関節は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。陥凹部周辺には *Mmp13* と *Hif2a* の発現が上昇し、アポトーシスが亢進していることが示された。
4. マウス変形性膝関節症モデルに低酸素プローブを用いて関節軟骨の酸素濃度変化を調べたところ、変性の進行により関節軟骨の酸素濃度が上昇し、それに伴って HIF-1 $\alpha$  の発現は低下することが示された。
5. *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 リコンビナーゼを発現させ、軟骨特異的に HIF-1 $\alpha$  をノックアウトした。このマウスに変形性関節症モデルを作製したところ、ノックアウトマウスで変形性関節症が進行し、*Mmp13*、*Mmp9* や HIF-2 $\alpha$  などの catabolic factor の発現が上昇するとともにアポトーシスが亢進していた。以上より HIF-1 $\alpha$  が関節軟骨維持に保護的に作用することが示された。
6. HIF-1 $\alpha$  を安定化させた状態で大腿骨頭を培養したところ基質分解は抑制され、HIF-1 $\alpha$  を抑制した状態では基質分解が促進された。また初代関節軟骨培養細胞や ATDC5 細胞株で HIF-1 $\alpha$  を抑制したところ *Mmp13* や *Hif2a* の発現が上昇し、反対に HIF-1 $\alpha$  の発現を上昇したところこれらの発現が減少した。以上より、HIF-1 $\alpha$  の anti-catabolic

な作用が示された。

以上、本論文では関節軟骨の形成と維持において 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明らかになった。本研究で *in vitro* と *in vivo* で関節軟骨における HIF-1 $\alpha$  の anti-catabolic な作用を示した初めての報告であり、今後の変形性関節症治療に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。