

論文の内容の要旨

論文題目 軟骨細胞における NF- κ B ファミリーメンバー RelA の
機能解析に関する研究

氏名 小林 寛

【要旨】

近年の日本では少子高齢化が急速に進んでおり、高齢者の要支援・要介護者の増加、およびそれに伴う医療コストの増大が社会問題となっている。要支援・要介護状態に陥る原因として変形性関節症に代表される軟骨変性を基盤とした関節変性疾患は上位に位置しており、関節変性疾患に対する新規の予防・治療法開発は整形外科に課せられた急務と言える。軟骨再生による治療法の実現には、軟骨細胞の発生・分化に関与するシグナルネットワーク群を解明し、それを応用する手法が有用であると考えられる。

脊椎動物の四肢の発生においては軟骨内骨化が重要な役割を果たしている。軟骨内骨化の過程においては未分化間葉系細胞が凝集し、その後軟骨前駆細胞、軟骨細胞へと分化する。軟骨細胞は増殖しながら中心部に向かって成熟し、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。

NF- κ Bシグナルは、免疫反応、炎症、細胞増殖、細胞分化、アポトーシスなど生体内の様々な現象に関わっている。NF- κ Bシグナルの古典的経路は、ストレスや炎症性サイトカインなどの外的な刺激により I κ B α のセリン残基をリン酸化する酵素複合体である I κ B キナーゼ (IKK) が活性化されると I κ B α はタンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームにより分解を受ける。これにより細胞質内で I κ B α により保持されていた NF- κ B 複合体 (RelA-p50) は単離し、核内に移行する。その後、NF- κ B は DNA 上の κ B モチーフ (GGGACTTTCC) と呼ばれる配列に結合し、さまざまな目的遺伝子の転写活性化を行う。この古典的 NF- κ B シグナルの主要転写因子である RelA は、軟骨発生のマスターレギュレーターである Sox9 の転写を活性化している一方で、軟骨の後期分化や軟骨の変性に関わる HIF-2 α や、軟骨基質分解酵素である ADAMTS5 を RelA が直接転写誘導することを我々は過去に報告してきた。

以上のことから、RelA は、anabolic な作用と catabolic な作用を通じて、骨格形成や変形性膝関節症などの軟骨変性に関わっていると考えられ、本研究においては軟骨細胞分化の

背景に存在するシグナルネットワーク群について RelA を中心として解析することを目的とした。

まず軟骨細胞における RelA の発現を確かめ、四肢発生過程で段階的に RelA 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作成し、骨格系に関する表現型、組織学的特徴を解析し、生理的条件下における RelA の役割を検討した。

RelA のマウス成長板における発現を免疫組織染色で確認すると、RelA は、静止細胞層、増殖層、肥大層いずれにおいても発現がみられた。骨格形成における RelA の機能をみるために、四肢間葉系細胞特異的にノックアウトする *Prx1-Cre*、軟骨細胞特異的にノックアウトする *Col2a1-Cre*、肥大軟骨細胞特異的にノックアウトする *Col10a1-Cre* マウスと *RelA^{fl/fl}* マウスをかけ合わせ、骨格形成の解析を行った。

四肢間葉系細胞特異的に RelA をノックアウトした *Prx1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスと軟骨細胞特異的に RelA をノックアウトした *Col2a1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスは、コントロールの *RelA^{fl/fl}* マウスに比べ同程度の四肢の短縮がみられた。一方で、肥大軟骨特異的にノックアウトする *Col10a1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスでは、成長障害は見られなかった。

以上の3つのコンディショナルノックアウトマウスの解析結果から、RelA は骨格形成において初期分化に重要な働きを持つことがわかった。そこで、*Col2a1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスを用いて軟骨初期分化について調べた。

マウス成長板において、サフラニン O 染色および Col2a1 の免疫染色で軟骨基質産生能をみると、*Col2a1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスと *RelA^{fl/fl}* マウスで染色性に差はなかった。軟骨初期分化マーカーである Col2a1、アグリカン、Sox 9 mRNA 発現量は、2つの遺伝子型間で差はなかった。

Cell counting kit-8 を用いて軟骨細胞の増殖について解析を行うと、RelA ノックアウトによって時間経過における細胞の増殖率は低下していた。In vivo および in vitro において軟骨細胞による BrdU の取り込み率は両遺伝子型間で差がなかったのに対して、TUNEL 染色による解析の結果、*Col2a1-Cre; RelA^{fl/fl}* マウスでは、増殖層～前肥大層にかけて異所性のアポトーシスがみられたことから、時間経過における軟骨細胞の増殖率の低下は、RelA ノックアウトによる軟骨細胞のアポトーシスの亢進が原因であると考えられた。

以上のことから、RelA ノックアウトによる成長障害は、成長板における軟骨細胞の異所性のアポトーシスの亢進が原因であることが示唆された。

続いて、病的条件下における RelA の作用を見るために、実験的変形性関節症モデルおよび自然経過における変形性関節症の解析を行った。実験的変形性関節症モデルおよび自然経過における変形性関節症の解析のいずれにおいても、*Col2a1-CreERT; RelA^{fl/fl}* マウスでは、*RelA^{fl/fl}* マウスに比較して、軟骨細胞のアポトーシスの亢進を伴って変形性関節症の進行が見られた。

RelA コンディショナルノックアウトマウス由来軟骨細胞では、コントロールと比較して低濃度でも TNF α 投与によるアポトーシスの誘導が見られた。TNF α の下流では、caspase の活性化によるアポトーシス誘導と、NF- κ B シグナルを介したアポトーシス抑制の経路があることが知られている。マイクロアレイと遺伝子発現解析の結果から Traf2、c-IAP1、c-IAP2、Pik3r1、Prkar1a の 5 つの遺伝子が RelA の下流因子として候補に挙げられた。

Traf2、c-IAP1、c-IAP2 は、RelA による転写制御をうけ、これらが協調的にカズパーゼを阻害し抗アポトーシス作用を有していることが知られているため、Pik3r1、Prkar1a の解析を行った。

Pik3r1 は、PI3K の regulatory subunit を担っており、PI3K の触媒サブユニットである *Pi3kca* の活性を制御するが、*RelA^{fl/fl}* 由来軟骨細胞では、TNF α 投与によって、Akt のリン酸化が誘導されるのに対して、RelA ノックアウトマウス由来軟骨細胞では、その誘導は阻害されていた。PI3K-Akt シグナルは、TNF α の下流において活性化し、NF- κ B シグナルを活性化することが知られているが、RelA は *Pik3r1* の発現調節を介して、PI3K-Akt シグナルに対して positive feedback な経路を有し、細胞の生存を促している可能性が示唆された。

Pik3r1 のプロモーターは、転写開始点上流約 1,600bp が種間で保存されており、この領域についてプロモーター解析を行ったところ、*Pik3r1* は、RelA 濃度依存的に転写誘導されること、NF- κ B の結合領域である -546/539 と -227/219 を段階的に欠失または結合モチーフ内の変異により転写誘導が阻害されることがわかった。さらにクロマチン免疫沈降の結果、RelA は -227/219 の結合モチーフと直接結合していることがわかった。

Prkar1a は、PKA の調節サブユニットであり、非活性化状態では、触媒サブユニットに結合しその活性を抑制しており、PKA は、Bim をリン酸化して安定化させることでアポトーシスに関与しているが知られているが、本研究では、*Prkar1a* の発現変化に伴う Bim の発現は変わらなかったため、少なくともこの経路を介したアポトーシスへの関与は否定的であった。

変形性膝関節症モデルの関節軟骨における発現を免疫染色でみると、Traf2、c-Iap1、c-Iap2、

Pik3r1 いずれも *RelA^{fl/fl}* マウス関節軟骨での発現が見られるのに対して、*Col2a1-CreERT*; *RelA^{fl/fl}* マウスでは、その発現が抑制されていた。

以上の事実より、**NF-κB** シグナルは軟骨において抗アポトーシス作用によって骨格形成および変形性膝関節症へ関与していることが示された。