

論文内容の要旨

論文題目 変形性関節症動物モデルの確立とその分子生物学的解析

指導教官 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 亀倉暁

近年生物学研究において劇的な発展を遂げたマウスゲノミクスを変形性関節症 (OA) の研究へ応用するため、本研究ではマウス変形性関節症(OA)実験モデルを確立した。微小外科の技術を用いて関節不安定性をマウス膝関節に手術的に作製し、切離・切除する靭帯と半月板の組み合わせを変えることで、不安定性が異なる4種類のモデルを確立し、*severe, moderate, mild, medial model* とした。これらのマウス OA モデルの関節軟骨では、術後早期には *superficial zone* の脱落、*safranin-O* 染色の染色性の低下が生じた。さらに術後経過とともに、軟骨基質の変性破壊が進行し、関節適合性の悪化がみられた。これらの *catabolic change* のみならず、術後早期には局所の関節軟骨細胞の増殖、後期には軟骨下骨硬化、骨棘形成などの *anabolic change* も観察された。以上の変化はヒト OA の病態・病理像に一致していた。各マウス OA モデルはそれぞれ関節不安定性が異なり、それに応じて OA の進行速度・重症度が異なっていた。*Severe model* は不安定性が高度で進行速度が速いため、OA 後期にみられる骨棘形成などの骨増殖性変化の検討に適している。*Moderate model* は術後早期の OA 変化が *severe model* よりも緩やかであるので、OA 早期の病変を観察することも可能であり、軟骨基質の破壊に先行して軟骨細胞が病的な肥大分化を生じる過程が観察できた。*Mild model* は進行速度が緩やかであり、OA 早期にみられる軟骨細胞の形態・形質の変化を検討するのに適していると考えられた。

Severe, moderate, mild model の3つの OA モデルでは、前十字靭帯の切離を行っているため、脛骨が前方に亜脱臼し脛骨後方の関節軟骨に OA 病変が観察された。*Medial model* は前述の3つの OA モデルとは異なり、ACL 切離を行っていないので脛骨の前方亜脱臼を生じず、軟骨破壊は脛骨内側後方部ではなく、生理的な荷重部である脛骨内側中央部に生じていた。ヒト OA が必ずしも関節の亜脱臼や不適合性を伴うわけではないこと、生理的な荷重部に OA 病変が生じやすいことから、*medial model* はヒト OA の病態により近いと考えられた。

本研究で確立した OA モデルを用いて、免疫染色と *in situ hybridization* での解析から、X 型コラーゲンと MMP (matrix metalloproteinase) -13 が OA 関節軟骨細

胞で共局在していることが明らかとなった。関節軟骨は永久軟骨であり、石灰化軟骨層(calcified cartilage)を除き、X型コラーゲンを発現する肥大軟骨細胞は通常局在していない。sham手術を行った膝関節軟骨の tidemark より表層では、X型コラーゲンの発現はみられなかった。一方、OA関節軟骨の tidemark より表層にある軟骨細胞では X型コラーゲンが強く発現していた。過去の文献の報告では、OAの関節軟骨細胞では X型コラーゲン発現が増強しており、また他の軟骨分化マーカーが異所性に発現していることも報告されている。一方、MMP-13は関節軟骨基質の主要な構成コラーゲンである II型コラーゲンを最も強力に分解する酵素であり、ヒト OA 関節軟骨で発現増強していることが報告されている。恒常的活性型ヒト MMP-13 を過剰発現するトランスジェニックマウスは生理的条件下で OA を発症することが示されており、MMP-13 は OA の軟骨基質破壊において重要な働きをしていることが示唆されている。

成長板では軟骨細胞は増殖・分化の厳密な制御の下に軟骨内骨化によって骨の長軸方向への成長を司っている。分化した肥大軟骨細胞は X型コラーゲンを発現するようになり、その肥大軟骨細胞がさらに最終分化段階に達して成長板最下端部において MMP-13 を発現するようになる。一方、OA 関節軟骨では、成長板でみられるような分化マーカーの発現パターンの制御がみられなかった。すなわち、OA 関節軟骨では tidemark より表層にある軟骨細胞が X型コラーゲンを発現し、また MMP-13 も共発現し軟骨基質分解に関与していた。このことからメカニカルストレスによって軟骨細胞の病的な肥大分化が誘導され、MMP-13 を発現して基質分解を促進し、OA を進行させている可能性が示された。

Runx2 は、骨・軟骨形成に必須な転写因子である。Runx2 ホモノックアウトマウスでは、前肥大化軟骨細胞の前段階で細胞の分化が止まっており、軟骨細胞の成熟障害がみられた。また、Runx2 を初期軟骨培養細胞に強制発現させると軟骨細胞肥大分化を促進し、ドミナントネガティブ型 (DN)- Runx2 の強制発現では肥大分化を抑制した。さらに、軟骨細胞特異的プロモーターにより Runx2 を過剰発現させた Runx2 トランスジェニックマウスでは、軟骨細胞は早期から異所性に成熟肥大化して軟骨内骨化を促進し、関節軟骨、気管軟骨、鼻軟骨、椎間板軟骨などの永久軟骨が軟骨内骨化を生じていた。逆に DN- Runx2 トランスジェニックマウスでは軟骨細胞の成熟と軟骨内骨化が抑制された。したがって、Runx2 は軟骨細胞の肥大分化に必要な因子であることが明らかになった。また、Runx2 トランスジェニックマウスでは関節は癒合し、軟骨細胞は異所性に肥大分化していた。一方、DN- Runx2 トランスジェニックマウスでは成長軟骨の殆どの細胞が永久軟骨細胞の形質を維持していた。すなわち、Runx2 は永久軟骨と成長軟骨の性格決定にも重要な因子であることが明らかとなった。また、永久軟骨細胞も最終分化の形質を獲得できることが *in vitro* に実験系で示された。以上

ことから、軟骨内骨化を生じる潜在的可能性があるにもかかわらず永久軟骨が肥大分化や基質の石灰化を生じないのは、Runx2 の発現が抑制されるようなメカニズムが永久軟骨において存在しているためであると考えられている。

生理的条件下における Runx2 の成長軟骨や永久軟骨での役割から、OA における病的な関節軟骨肥大分化にも Runx2 が関与している可能性が考えられた。そこで、Runx2 ヘテロノックアウトマウスと野生型マウスに OA モデル(**medial model**)を作製して、OA の進行過程を比較検討した。術後比較的早期において野生型マウスの関節軟骨でみられる X 型コラーゲンを発現する異所性の肥大軟骨細胞が、Runx2 ヘテロノックアウトマウスの関節軟骨ではほとんどみられなかった。また、野生型マウスの関節軟骨では、軟骨細胞の異所性の肥大分化の出現より少し遅れて、MMP-13 の発現が強く誘導されていたが、Runx2 ヘテロノックアウトマウスでは MMP-13 の発現は著明に減弱していた。このことから OA 関節軟骨における軟骨細胞の病的肥大分化と MMP-13 の発現誘導を Runx2 が促進している可能性が示された。Medial model 術後 12 週では、野生型マウスの関節軟骨では軟骨基質破壊が **tidemark** より深層の **calcified cartilage** まで達していた。一方、Runx2 ヘテロノックアウトマウスの関節軟骨では、OA による関節軟骨破壊が著明に抑制されていた。以上の結果から、メカニカルストレスによって誘導される関節軟骨細胞の病的な肥大分化および MMP-13 の発現増強が Runx2 **haploinsufficiency** によって抑制され、その結果 OA 関節軟骨破壊が抑制されたと考えられた。さらに、野生型マウスの脛骨内側では、内軟骨性骨化の過程により発達した骨棘形成がみられたが、Runx2 ヘテロノックアウトマウスでは未成熟な軟骨様組織の増生に止まっており、骨棘形成が著明に抑制されていた。Runx2 ヘテロノックアウトマウスでは OA による関節軟骨破壊が抑制されたため、その結果二次的な骨棘形成が抑制された可能性が考えられる。または、Runx2 **haploinsufficiency** が骨棘形成過程における軟骨内骨化を直接阻害した可能性も考えられた。Runx2 ヘテロノックアウトマウスは、頭蓋骨における結合組織内骨化の遅延と鎖骨の低形成がみられ、この表現型はヒトでみられる鎖骨頭蓋異形成症(**cleidocranial dysplasia; CCD**)と似ていることから、Runx2 の **haploinsufficiency** が CCD の原因であると考えられている。生理的条件下では、Runx2 ヘテロノックアウトマウスは正常に成長し、主要な臓器にも異常はなかった。以上のことから、Runx2 **haploinsufficiency** は CCD を生じるが、個体の発生・成長・骨格系に異常を与えずに、メカニカルストレスによる OA の発症を抑制することが示された。

本研究で得られた知見から、Runx2 は変形性関節症治療の重要な標的分子となる可能性があり、また再生医療分野における変性軟骨の治療・再生への応用が期待される。