

論文の内容の要旨

論文題目 軟骨細胞における Notch シグナルによる
軟骨内骨化と変形性関節症の制御
氏名 保坂 陽子

【要旨】

近年の日本では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。高齢者に介護が必要となる原因としては運動器疾患が多く、中でも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・治療法の開発は整形外科に課せられた急務と言える。しかしながら、軟骨の分化・再生のメカニズムについての知見は極めて乏しいのが現状である。

軟骨内骨化は膜性骨化とならび骨形成様式の一つとして知られるが、骨格形成のみならず、変形性関節症における軟骨の変性と病的骨化においてもその関与が指摘されている。軟骨内骨化の過程において軟骨細胞はさまざまなシグナルの制御を受けながら増殖、肥大分化を経てアポトーシスへと至る。この肥大分化において、軟骨細胞はまず増殖を停止し、X型コラーゲンなどの肥大軟骨細胞固有の基質を産生する。その一方で matrix metalloproteinase13 (MMP13) を中心とした基質分解酵素により基質を分解し、vascular endothelial growth factor A (VEGFA) などのサイトカインを分泌することにより血管侵入を促し、軟骨から骨への置換が起こる。このように起きている軟骨細胞分化の最終段階である基質の変性と血管侵入が、軟骨内骨化において多くの部分を占め重要な役割を果たしているが、その分子メカニズムは十分には解明されていない。

Notch シグナル伝達経路は種々の細胞の発生・分化・増殖など細胞の運命決定に重要な役割を果たしているシグナル伝達経路で、胚形成のみならず、神経、造血などの様々な分化過程に関与する、ヒトを含め脊椎動物から節足動物まで多くの後生動物でよく保存されたシグナル伝達経路である。Notch シグナルは細胞間で生じるシグナル伝達経路で、細胞膜表面に存在するリガンドが隣接する細胞の膜表面に存在する受容体と結合することでシグナル伝達が始まる。リガンドが結合した受容体は2段階の切

断を受け、切り出された細胞内ドメインが核内に移行し、転写因子である Rbpj と結合して転写が開始される。Notch シグナル関連分子は成長板軟骨において強く発現していることが報告されており、最近の研究で軟骨細胞の分化過程は核内転写因子 Rbpj 依存的なシグナル伝達経路で調節されていることが報告された。また、Notch シグナル関連分子は永久軟骨である成人の関節軟骨においても発現していることが分かっており、これらの報告は Notch シグナルが成人の関節軟骨の恒常性維持においても重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

本研究においては軟骨内骨化および変形性関節症における Notch シグナルの関与について検討した。まず軟骨細胞における Notch シグナル関連分子の発現解析を *in vitro*、*in vivo* で行った。次に、軟骨前駆細胞特異的・軟骨細胞特異的に Rbpj 遺伝子を欠損させた各種コンディショナルノックアウトマウスを作成し、表現型および組織学的解析から骨格形成および変形性関節症における Notch シグナルの関与を検討した。また Notch シグナルの軟骨内骨化調節メカニズムの機能解析を行い、最後に変形性関節症治療ターゲットとしての Notch シグナルの可能性を検討するため、Notch シグナル阻害剤 DAPT を用いた培養細胞系にての検討、および野生型変形性膝関節症モデルマウスへの関節内投与による治療効果の検討を行った。

まずマウス未分化軟骨細胞株 ATDC5 の肥大分化誘導培養系とマウスの初代軟骨細胞において、Notch シグナル関連分子の mRNA 発現レベルを検討したところ、4 つの Notch isoform の中で Noct1、Notch2 が強く発現していた。下流分子では Hes1 が最も強く発現し、他の標的分子の発現はほとんど見られなかった。ATDC5 の肥大分化誘導培養系では、Hes1 は分化が進むに従い、軟骨内骨化の後期分化マーカーである Mmp13 と Vegfa に一致して発現が上昇していた。

マウス胎児成長板軟骨および変形性関節症モデルマウスの膝関節軟骨では、肥大軟骨細胞および変性関節軟骨細胞において Notch1、2 の細胞内ドメインの核内移行がみられた。ヒトの変形性膝関節症軟骨サンプルにおいても、変性軟骨にて Notch1、2 の細胞内ドメインの核内移行がみられており、このことから、Notch シグナルは軟骨内骨化および変形性関節症の両方において活性化されていることが示唆された。

骨格形成における Notch シグナルの機能を解析するため、Rbpj を軟骨前駆細胞特異的にノックアウトしたマウス (*Sox-Cre;Rbpj^{fl/fl}* マウス) を作成し検討を行った。*Sox-Cre;Rbpj^{fl/fl}* マウスは生直後に死亡したが、*Rbpj^{fl/fl}* マウスと比較して一部の長管骨

で有意差がつく程度の軽度の四肢短縮型 dwarf を呈していた。組織学的には肥大層の延長を伴う骨化の遅延がみられ、Mmp13 および Vegfa の発現低下がみられた。Sox-Cre;Rbpj^{fl/fl} マウスから採取した初代軟骨細胞にて pellet culture を行ったところ、免疫組織化学染色の結果と同様に Mmp13 および Vegfa の発現が低下していた。

次に変形性関節症における Notch シグナルの関与を検討するため、軟骨特異的 Rbpj ノックアウトマウス (Col2a1-Cre;Rbpj^{fl/fl} マウス) およびタモキシフェン誘導性軟骨特異的 Rbpj ノックアウトマウス (Col2a1-Cre^{ERT};Rbpj^{fl/fl} マウス) を作成し、これらのマウスに変形性膝関節症モデルを作出し組織学的な検討を行ったところ、ノックアウトマウスにおいて変形性関節症が抑制される傾向があり、Mmp13 および Vegfa の発現も抑制されていた。

Notch シグナルの軟骨内骨化調節作用のメカニズムを調べるため、ATDC5 細胞および初代関節軟骨細胞に Rbpj、Notch1-ICD を過剰発現させたところ、Notch1-ICD の過剰発現によって Mmp13、Vegfa、Hes1 の発現が著しく増加し、肥大分化、石灰化が促進されることが分かった。Rbpj の過剰発現によっては後期分化マーカーの変化はなかったが、Rbpj はノックアウトすることにより軟骨内骨化の障害が起きるため、vivo の結果と合わせると、Rbpj は軟骨内骨化の制御において必要な co-factor であると考えられた。

また、MMP13 と VEGFA のプロモーターアッセイを行ったところ、Rbpj によってはプロモーター活性に変化はなく、Notch1-ICD により少しプロモーター活性は上がったが、下流分子である Hes1 が MMP13、VEGF の転写活性を強く上げることがわかった。ATDC5 細胞に Notch1-ICD を強制発現させ、さらに siRNA を用いて Hes1 のノックダウンを行うと、Notch1-ICD の強制発現で得られた Mmp13 と Vegfa の発現上昇作用が抑制された。これらの結果から、Hes1 が直接 Mmp13 と Vegfa の発現調節をしている可能性が考えられた。

シグナルの上流分子に着目し、canonical なリガンドである Dll1、Dll3、Dll4、Jag1、Jag2 の発現を初代軟骨細胞で調べると Jag1 が最も強く発現していた。マウス変形性膝関節症モデルの切片にて経時的なリガンドの発現をみたところ、Jag1 が OA の進行に伴って発現が増えていた。

Col2a1-Cre;Rbpj^{fl/fl} マウスおよび Col2a1-Cre^{ERT};Rbpj^{fl/fl} マウスを用いたマウス変形性膝関節症モデルでの検討で、Notch シグナルを抑制することにより変形性関節症が抑制される傾向がみられたため、シグナル阻害薬 DAPT を用いた治療の可能性について

検討した。初代関節軟骨細胞に DAPT を加えて培養すると、後期分化・石灰化が抑制され、Notch1 強制発現系と反対に Mmp13 および Vegfa、下流分子である Hes1 の発現が低下した。治療効果検討として野生型マウスに変形性膝関節症モデルを作出し DAPT の関節内投与を行ったところ、DAPT 投与群で変形性関節症が有意に抑制された。

以上の結果から、軟骨細胞においては Notch シグナルの活性化により下流分子 Hes1 が誘導され、さらに Hes1 が Mmp13 や Vegfa を誘導することにより軟骨内骨化および変形性関節症を制御していると考えられる。