

審査の結果の要旨

氏名 保坂 陽子

本研究は細胞の運命決定に重要な役割を果たしている Notch シグナルの軟骨細胞における役割を検討するため、*in vitro*・*in vivo* の両面からシグナルの軟骨内骨化および変形性膝関節症への関与について検討し、下記の結果を得ている。

1. マウス軟骨細胞株 ATDC5 および初代マウス軟骨細胞を用いて発現パターンの検討を行ったところ、Notch1、Notch2 および下流分子の Hes1 が強く発現しており、Hes1 は後期分化マーカーである Mmp13、Vegfa などの発現パターンと同様に、分化が進むにつれて発現が増えていた。また、マウス胎児成長板切片および変形性膝関節症モデル切片にて発現を調べたところ、分化および変性が進むにつれて Notch 受容体の細胞内ドメインの核内移行がみられ、Notch シグナルが活性化されていた。
2. Notch シグナルの骨格形成への関与を検討するため、核内転写因子 Rbpj を軟骨前駆細胞特異的に欠損させた *Sox-Cre;Rbpj<sup>fl/fl</sup>* マウスを作成したところ、ノックアウトマウスは生直後に死亡したが、一部の長管骨で有意差がつく程度の軽度の四肢短縮形の *dwarf* を呈していた。組織学的には成長板軟骨において肥大軟骨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<sup>fl/fl</sup>* 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。
3. *Col2a1-Cre* マウスおよび *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>* マウスを用いて軟骨特異的に Rbpj をノックアウトしたマウスにおいて変形性膝関節症モデルを作出し、Notch シグナルの変形性関節症への関与を検討したところ、ノックアウトマウスにおいて変形性関節症の進行が抑制される傾向があり、免疫組織化学染色においては Mmp13 および Vegfa の発現の低下がみられた。
4. 培養細胞系での検討において、Notch1-ICD の強制発現により Mmp13、Vegfa および下流分子 Hes1 の発現が上がったが、Mmp13 と Vegfa のプロモーター解析により、Notch1-ICD よりもその下流分子である Hes1 が両者のプロモーター活性を強く上げることが示された。さらに Notch1-ICD の強制発現により得られた Mmp13 と Vegfa の発現上昇作用は、Hes1 をノックダウンすることにより抑制されることから、Hes1 が直接 Mmp13 および Vegfa の発現調節を行っている可能性が示された。
5. マウス変形性膝関節症モデルにおいて Notch シグナルのリガンドの経時的な発現検討を

行ったところ、canonical なリガンドである Jag1 が軟骨変性に伴って発現が上昇しており、変形性関節症へのリガンドの関与の可能性が示唆された。

6. Notch シグナル阻害剤 DAPT をマウス初代軟骨細胞に投与すると、Mmp13 および Vegfa の発現が抑制され、細胞染色において石灰化も抑制された。さらに、DAPT を変形性膝関節症モデルを作出した野生型マウスに関節内投与すると、細胞レベルでの実験と同様に Mmp13 や Vegfa の発現が抑制され、変形性関節症を抑制することが示された。

以上、本論文は軟骨細胞における Notch シグナルの役割を *in vitro*・*in vivo* の両面から検討し、Notch シグナルが下流分子の Hes1 を介して Mmp13 および Vegfa の発現を誘導することで軟骨内骨化および変形性関節症に関与していることを示した。本研究は関節変性疾患の病態の解明および新規の予防・治療法の開発に繋がる可能性があり、学位の授与に値するものと考えられる。