

学 位 論 文 題 名

Down-Regulation of Cathepsin K in Synovium Leads to Progression of Osteoarthritis in Rabbits

(家兎関節滑膜内 cathepsin K の発現抑制は関節症性変化の進行を促進する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】変形性関節症 (OA) は先進国においてもっとも多く発症する疾患のひとつである。従来から靱帯損傷などの原因で生じた関節不安定性や荷重分布不均衡が OA 進行のリスクとなることは知られている。それゆえ、主な OA 発症原因は、関節不安定性や荷重分布不均衡などの力学的ストレスが直接的に関節軟骨にかかり変性変化をきたしていると考えられていた。一方、近年の研究で関節内の力学的環境の変化に反応して増加する生物学的因子が OA 軟骨の変性進行の重要な役割を果たしているという報告が散見される。それらの生物学的因子にはサイトカイン、増殖因子、matrix metalloproteinase (MMP)、軟骨アポトーシス関連因子などがあげられる。さらに、従来は OA 発症のメカニズムに関する研究のターゲットは関節軟骨が中心であったが、最近は遺伝子治療のターゲットとしやすい滑膜が注目されるようになってきた。滑膜は軟骨表面以外の関節内を覆う 1~数層で構成される組織である。関節リウマチ (RA) においては滑膜線維芽細胞やマクロファージが MMP、炎症性サイトカインの産生および分泌を通して炎症のプロセスに重要な役割を担っている。また OA 患者から採取した滑膜の病理組織像が早期 RA 患者から採取した滑膜とよく似ているという報告も散見される。これらの結果から、RA と同様に OA においても滑膜から放出される chemical mediator が軟骨変性に寄与していると推測できる。しかし、関節内の力学的環境変化に反応した OA 滑膜の軟骨変性への関与およびそのメカニズムに関してはまだ解明されていない。

本研究では関節不安定性により生じた滑膜内の遺伝子発現変化が OA 発症・進行に影響を与えているという仮説を立てた。本研究の目的は、1) ウサギ OA モデルの OA 発症初期の滑膜組織に過剰発現している候補遺伝子を同定すること、2) 同モデルで siRNA gene silencing 法にて in vivo で候補遺伝子の機能解析を行うことである。

【材料と方法】動物 OA モデルには日本白色家兎 (メス 15 週齢, 2.6 -3.0kg) を使用した。手術は全身麻酔下で行い、両膝とも内側傍膝蓋アプローチにて関節包切開し、左膝 (ACLT 側) では ACL 切断を施行し、右膝 (sham 側) では ACL に触知するのみとした。術後はプラスチックケージ内で制限をあたえず飼育し、術後 1, 2, 4 週で安楽死させて軟骨と滑膜を採取した。術後 1 週の両膝の滑膜からそれぞれ mRNA を抽出し、サブプレッション・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション (SSH) 法で sham 側より ACLT 側で過剰発現している cDNA ライブラリを作製した。次に、ディファレンシャル・スクリーニング法を用いて特に発現の差のある候補遺伝子を抽出した。さらに、real-time RT-PCR にて発現量を測定し候補遺伝子を決定した。次に候補遺伝子の siRNA を作製し、周術期である day -3, -1, 3, 7 (ACL 切断施行日を day 0

とする)にウサギ OA モデルの関節滑膜にエレクトロポレーション法で導入した。その際、siRNA 群、control-siRNA 群、PBS 群の 3 群に分けて比較検討した。評価は術後 4 週の関節軟骨の病理組織像および modified Mankin score で行った。また siRNA を投与した際に滑膜内の OA 関連遺伝子の経時的発現変化の検討も行った。

【結果】本研究では、ACLT 群と sham 群の 2 群間で軟骨の組織学的変化がほとんどないが、滑膜で明らかな変化をみとめていた術後 1 週の段階をウサギ OA モデルの OA 初期とし、差異発現遺伝子の同定を術後 1 週の滑膜サンプルを用いて行うこととした。SSH 法にて得られた cDNA ライブラリの中から無作為に 346 個の cDNA クローンを選択し、ドットプロット・ハイブリダイゼーションによってディファレンシャル・スクリーニングを行った。このスクリーニングで sham 側に比べて ACLT 側に有意に発現量の高いと考えられる 32 個の cDNA クローンに絞り込んだ。その cDNA クローンの遺伝子配列のホモロジー解析を行い、11 個の差異発現遺伝子を同定した。次に real-time RT-PCR で行ったところ、sham 側に比べて ACLT 側で cathepsin K が過剰発現していたため cathepsin K を候補遺伝子に決定した。次に cathepsin K の機能解析を siRNA gene silencing 法で行ったところ、術後 4 週の病理組織で HE 染色、サフラニン O 染色ともに PBS 群、control-siRNA 群と比べて siRNA 群で明らかに軟骨変性に進行を認め、modified Mankin score でも siRNA 群: 12.2 ± 1.5 、control-siRNA 群: 8.0 ± 1.9 、PBS 群: 8.2 ± 1.3 と有意($p < 0.01$)に siRNA 群が高値であった。また OA 関連遺伝子の中で MMP-13 が術後 1 週において siRNA 群で有意に高発現していた。

【考察】Cathepsin K はシステイン・プロテアーゼのひとつであり、破骨細胞、破骨細胞の前駆細胞である単核細胞やマクロファージ、上皮細胞など様々なタイプの細胞で発現していることがわかっている。Cathepsin K は少なくとも OA の進行期や末期においては関節軟骨の変性に関与する重要な酵素と考えられてきた。またマウスやヒトの OA 進行期および末期においては、関節軟骨だけではなく滑膜にも cathepsin K が過剰発現していることが報告されている。しかし、本研究では OA 発症初期の段階では滑膜内で cathepsin K の発現を抑制することで MMP-13 の発現を促進させ、関節症性変化を進行させていた。これは、OA 発症初期では cathepsin K がその発症・進行において抑制的に働いているということを示唆するものである。最近の報告ではオートファジーによって制御されるコラーゲン代謝の恒常性維持に cathepsin K の生理的な役割があるとしている。また別の報告では cathepsin K の特異的な阻害剤は線維芽細胞内でコラーゲンのオートファジーを促進させていた。Cathepsin K には破骨細胞内での骨代謝におけるプロテアーゼとしての働きや滑膜性線維芽細胞での II 型コラーゲンの分解を担うだけではなく、結合組織線維芽細胞での I 型や III 型コラーゲンの食作用の抑制として機能しているとも示されている。このようにオートファジーが優先される状況下では、cathepsin K の発現を抑制すると OA が悪化することは十分考えられ、本研究の結果を支持するものである。

【結語】ウサギ ACL 切断 OA モデルを用いて、OA 発症初期の滑膜で cathepsin K が mRNA およびタンパクレベルで過剰発現していること示した。さらに同モデルを用いて、siRNA で滑膜内の cathepsin K の発現を抑制すると軟骨変性の著しい進行をみとめた。これらの結果から、cathepsin K は OA 発症初期においては軟骨変性の進行を遅らせている可能性が示唆された。

でその後に sham 側と同程度まで低下するのはどう考察しているのか、OA の自然発症モデルでは同様の検討は行わないのかについての質問があった。次いで副査上出利光教授から cathepsin L も発現上昇があるが、この遺伝子でも同様の研究を行った場合、どのような結果が予想されるかについての質問があった。最後に副査三浪明男教授からは、cathepsin K の役割が軟骨では悪い影響があり、滑膜では良い影響があるというようにひとつの遺伝子で異なる働きをする理由、創薬に対する可能性はあるのかについての質問があった。これらの質問に対し今回行った実験結果と過去の文献を引用し、適切に回答した。

この論文は、滑膜で発現する cathepsin K を knock down させることで軟骨の変性が進行するということを示し、cathepsin K が OA 初期においては軟骨に protective な機能を持っている可能性が示唆され、今後の新たな OA 治療の開発に重要な情報を提供すると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。