

学位論文題名

# Accelerated Development of Aging-Associated and Instability-Induced Osteoarthritis in Osteopontin-Deficient Mice

(オステオポンチン欠損マウスにおける  
加齢や関節不安定性に伴う変形性関節症の進行)

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】変形性関節症 (osteoarthritis; OA)は、最も発生頻度の高い代表的な非炎症性関節疾患の一つであり、関節軟骨の変性、軟骨下骨の骨硬化、骨棘などが生じ、疼痛によって日常生活に不都合を来す疾患である。OAの発症に関与する主要因としては、年齢、または関節の不安定性や肥満から来る過度の力学的ストレスなどが挙げられる。また、OAはこれらの要因などにより直接軟骨基質障害と軟骨細胞に代謝変化が引き起こされ、分解系酵素などの働きも加わって関節軟骨破壊が起こる関節障害である。しかし、その明確なメカニズムについては未だ特定できておらず、疾患の進行を抑止し、その自然経過を変えうる有効な治療法は確立されていない。

関節軟骨の細胞外マトリックスの合成や分解は、軟骨細胞とその周囲の細胞外マトリックスの相互に関係するメカニズムにより制御されていることが知られている。その細胞外マトリックスの一種である Osteopontin (OPN)は、骨細胞外マトリックスから単離された分泌型酸性リン酸化糖蛋白質で、破骨細胞、骨芽細胞などのさまざまな、細胞から分泌され、細胞膜上のインテグリンなどと結合し、細胞接着、遊走、増殖などに関与することが知られている。OPNは、関節軟骨の石灰化層に発現しており、OAの進行に伴い、関節軟骨組織において発現上昇がみられることは報告されているが、OAの進行に伴うOPNの役割については不明である。

そこで、我々は、OPNは、OA進行に制御において、重要な役割を果たしているだろうという仮説をたてた。本研究の目的は、OA変化に伴うOPNの発現様式の変化を示し、OPN欠損マウスを用いてOAの発症、進行におけるOPNの機能を明らかにすることである。

【材料と方法】野生型 (WT; C57BL/6) 及び OPN<sup>-/-</sup>マウスを使用した。

*In vivo* 評価: 8週齢のWT及びOPN<sup>-/-</sup>マウスにおいて、膝関節の力学的不安定性を誘発するモデル (instability-induced OAモデル; 右膝に内側側副靭帯切除と内側半月板部分切除、左膝にはsham opeとして関節包を切開) を作成し、術後8wでHematoxylin and eosin (H-E)染色やSafranin O染色による組織学的検討を行なった。また、15ヶ月齢マウスにおいて関節の加齢に伴う変化 (aging-associated OAモデル) を組織学的かつ軟X線画像にて評価した。OAの組織学的評価方法としては、Chamberらが報告した①cartilage erosionの評価、②chondrocyte number、③cartilage thickness、Mankinらが報告した④SafraninO染色の項目を採用した。

*In vitro* 評価: 4週齢WT及びOPN<sup>-/-</sup>マウス大腿骨頭軟骨を採取し、10% fetal bovine serum存在下に2mM glutamine、10mM HEPES、50μg/ml ascorbateを入れ、48時間pre-cultureした後、3回洗浄し、serum-free DMEMにて72時間、組織片培養した後、グリコサミノグリカ

ン (sGAG) 放出量を 1,9-Dimethylmethylene Blue Assay 法を用いて測定した。さらに、OPN に関わる候補遺伝子を cDNA GEArray を用いて検索し、real-time RT-PCR にてその遺伝子発現の再現性を確認した。最後に、その遺伝子と sGAG 放出量との直接の関係を確認するために、その遺伝子の inhibitor における sGAG 放出への影響を調べた。

【結果】 *In vivo* 評価： instability-induced OA モデルにおいて、sham op. では、両群共に、軟骨層は保たれており、いずれの項目においても組織学的有意差は認めなかった。OA 側においては、WT マウスにおいて H-E 染色では、軟骨層の菲薄化や safranin-O での染色性の低下を認めた。OPN<sup>-/-</sup> マウスでは、さらなる関節軟骨層の菲薄化を認めた。両群を各項目で定量化したところ、cartilage erosion、chondrocyte number、cartilage thickness の項目において、OPN<sup>-/-</sup> マウスの方が有意に OA の進行を認めた。また、免疫組織化学的評価において、正常軟骨では OPN の発現は関節軟骨石灰化層にのみ認めるが、OA の進行に伴い関節面表層においても強く認めた。aging-associated OA モデルでは、WT マウスにて、H-E 染色では、軟骨表層の fibrillation、SafraninO 染色での染色性の低下を認めた。OPN<sup>-/-</sup> マウスでは、SafraninO 染色でさらなる染色性の低下を認め OA 進行を認めた。両群を各項目で定量評価したところ、chondrocyte number、safranin O 染色の項目で、OPN<sup>-/-</sup> マウスの方が有意に OA の進行を認めた。さらに、軟 X 線画像上、両者共に明らかな骨棘の形成などは認めなかったが、OPN<sup>-/-</sup> マウスの方が有意に軟骨下骨の骨硬化を認めた。

*In vitro* 評価： OPN 欠損マウス軟骨において有意に sGAG の放出が亢進し軟骨変性が進行していた。さらに、OPN に関わる候補遺伝子の検索を行なうために、細胞外マトリックス関連の cDNA Array を行なったところ、最も発現差が大きく、OPN<sup>-/-</sup> マウスにて発現が亢進していた遺伝子が MMP-13 であった。real time RT-PCR にて、同様に OPN<sup>-/-</sup> マウスにて有意に MMP-13 の発現が上昇したことを確認した。また、MMP-13 inhibitor において、有意に sGAG の放出を抑制することも確認した。

【考察】 本研究結果は、OA の進行に OPN の機能が深く関与していることを示した。OPN は正常な軟骨の恒常性を維持する重要な機能を持ち、さらには MMP-13 の発現を制御することにより OA の進行を抑制しており、OA の治療戦略において重要な分子となりうる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 山 本 有 平

学 位 論 文 題 名

## Accelerated Development of Aging-Associated and Instability-Induced Osteoarthritis in Osteopontin-Deficient Mice

(オステオポンチン欠損マウスにおける

加齢や関節不安定性に伴う変形性関節症の進行)

軟骨基質の合成や分解には、軟骨細胞と細胞外マトリックス蛋白との相互作用のメカニズムが重要であることは知られている。一方、細胞外基質の一種である Osteopontin (OPN)は、変形性関節症(OA)の進行に伴い、関節軟骨組織において発現上昇がみられることは報告されているが、OA の進行に伴う OPN の役割については不明であった。そこで、本研究では、OPN は OA 進行の制御において重要な役割を果たしているだろうという仮説をたて、OA 変化に伴う OPN の発現様式の変化を示し、OPN 欠損マウスを用いて OA の発症、進行における OPN の機能を *in vivo*、*in vitro* にて解析した。*In vivo* 評価では、15 ヶ月齢野生型(WT)及び OPN 欠損マウスにおいて関節の加齢に伴う変化(aging associated OA モデル)を組織学的かつ軟 X 線画像にて評価した。また、8 週齢のマウス膝関節の内側側副靭帯切離と半月板部分切除(instability induced OA モデル)を行い、術後 8w で組織学的検討を行った。*In vitro* 評価では、4 週齢 WT 及び OPN 欠損マウス大腿骨頭軟骨を採取し、serum-free DMEM にて組織片培養した後、グリコサミノグリカン(sGAG)放出量(%)を測定した。さらには、OPN に関わる候補遺伝子を cDNA GEArray を用いて検索し、real-time RT-PCR にてその遺伝子発現の再現性を確認した。その結果、*In vivo* 評価では、免疫組織化学的評価において、正常軟骨では OPN の発現は関節軟骨石灰化層にのみ認めるが、OA の進行に伴い関節面表層においても認めた。また、両モデル共に、OPN 欠損マウスにおいて有意に OA 変化が進行し、aging associated OA モデルでは軟骨下骨の骨硬化も有意に進行していた。*In vitro* 評価においても、OPN 欠損マウスにて、有意に軟骨変性の亢進を認めており、その際、MMP-13 の発現上昇を認めた。さらには、MMP-13 inhibitor の投与により、有意に sGAG の放出を抑制することを確認した。本研究結果は、OA の進行に OPN の機能が深く関与していることを示した。OPN は軟骨の恒常性を維持する重要な機能を持ち、さらには MMP-13 の発現を制御し OA の進行を抑制していると考えられた。

審査に当たり、副査山本有平教授から、OPN は元々どのような機能を持つのか、OPN を強制発現させた場合、軟骨変性は抑制されるのかについての質問があった。次いで主査安田和則教授から、今回の研究では *in vivo* 評価では、術後 8 週で評価しているが、8 週以

前のデータはあるのか、OAに伴いOPNの発現パターンの変化は何週目位から起こるのか、滑膜炎におけるOPNの役割の検討はおこなった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、力学的不安定性を誘発するOAモデルは、マウスでは現在までいくつ位、報告されているのか、今回の研究で用いたモデルは、他と比較しどのような位置づけのモデルなのか、*in vitro*の系で、sGAGの放出量が、MMP-13 inhibitorの投与により100%抑制されていない理由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、OPNはintegrinと結合することが知られているが、軟骨変性においては、どのようなintegrin familyが関与するのか、創薬研究を考えてOPN欠損マウスにOPNを投与してrescueさせる実験系を考えることはでき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、OAの進行にOPNの機能が深く関与していることを示した。OPNは軟骨の恒常性を維持する重要な機能を持ち、さらにはMMP-13の発現を制御し、OAの進行を抑制していることが示唆された。この論文は、*Arthritis & Rheumatism*で高く評価され、今後のOAの新たな予防、治療法の開発に貢献するものと期待される。

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。