

## 学位論文題名

軟骨特異的遺伝子破壊マウスを用いた変形性関節症における  
スフィンゴ糖脂質の機能解析

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】変形性関節症 (Osteoarthritis; 以下 OA) は、関節軟骨の変性などにより関節の疼痛が生じ、日常生活動作を著しく制限する疾患であり、世界的に見ても高齢者における有病率が非常に高く、大きな社会的問題となっている。発症に関与する主要因としては、加齢、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、これらの要因により、直接的な軟骨基質障害や軟骨代謝の変化が引き起こされ、炎症性サイトカインや分解系酵素の働きも加わり関節軟骨破壊が引き起こされる。しかし、そのメカニズムに関する詳細は未だ十分に解明されておらず、疾患の進行を抑制し、その自然経過を変えうる真の意味で有効な治療法は確立されていないのが現状である。

近年、糖鎖生物学的アプローチによる重要な生命現象 (老化、癌化等) の解析が行われている。スフィンゴ糖脂質 (Glycosphingolipids; 以下 GSLs) は脊椎動物の全身の細胞膜上に広く存在し、膜を介するシグナル伝達の調節や、細胞-細胞間・細胞-細胞外マトリックス間相互作用の媒介など多様な役割を担っている。大部分の GSLs 合成の第一段階を担う酵素をコードしている *Ugcg* 遺伝子を全身性にノックアウト (KO) したマウスは、ほぼ全ての GSLs が欠損し、胎生致死となるため、GSLs は個体発生・分化において必須な分子であると言われている。ヒト変性軟骨では GSLs が減少しており、OA の病態における GSLs の重要性が示唆される。軟骨細胞膜上の GSLs の変化が OA における軟骨代謝異常に関与している可能性も報告されているが、これらについての具体的な研究報告は未だない。

そこで我々は、軟骨細胞における GSLs は、軟骨代謝の維持および OA の病態に関与しているという仮説を立てた。これを検証すべく、軟骨細胞特異的に *Ugcg* 遺伝子を KO させ、GSLs を欠損した conditional KO マウスを作製し、その表現型を評価することにより、軟骨における GSLs の機能を解析した。また、OA モデルを作製し、OA 発症における GSLs の関与について検証した。

本研究の目的は、軟骨代謝および OA の病態における GSLs の機能的役割を解明することである。

【材料と方法】我々は、Cre/loxP system を用いて、軟骨の主要なマーカーである II 型コラーゲンのプロモーター存在下に *Ugcg* 遺伝子を欠損させ、軟骨細胞特異的に GSLs を欠損したマウス (以下 Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>) を作製した。正常に出生するかどうか、また生後は外見をよく観察し、発育の程度を生後日数と体重による成長曲線で評価した。アルシアンブルーとアリザリンレッドの二重染色を用いて、全身骨格標本作製し、骨化形態を評価した。若齢マウスの関節軟骨組織における成長軟骨板の厚さ・軟骨層の厚さ・細胞数、II 型・X 型コラーゲン (Col2, Col10) の発現パターンを評価した。In vivo、in vitro において、以下のようなモデルを用いて、wild-type littermates (WT) と Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup> の両群間に変化がないかどうか検証し、軟骨変性過程における GSLs の影響を評価した。

In vivo 評価: 8 週齢の WT 及び Col2-*Ugcg*<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 operation 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、12 ヶ月、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) を組織学的に評価した。Mankin score にて OA の組織学的評価をした。

*In vitro* 評価：4 週齢 WT 及び Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>マウス大腿骨頭軟骨を採取し、10% fetal bovine serum 存在下に 2 mM glutamine、10 mM HEPES、50 μg/ml ascorbate を入れ、48 時間 pre-culture した後、3 回洗浄し、serum-free DMEM にて IL-1α 10ng/ml を入れて 72 時間、組織片培養した後、プロテオグリカンの放出量を 1,-9,-Dimethylmethylene Blue Assay 法を用いて測定した。また、生後 5 日齢の WT 及び Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>マウスの軟骨細胞を単離し、serum-free DMEM にて IL-1α10ng/ml を入れて 24 時間培養し、ELISA にて MMP-13 の産生量を、Griess reagent system にて NO の産生量を測定した。同様の培養で、WT の軟骨細胞を IL-1α で 24 時間刺激した際の、*Ugcg* mRNA の発現と GSLs の総量を測定し、IL-1α 刺激に対する正常軟骨細胞における GSLs 代謝の反応を調べた。

【結果】Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>マウスは正常に生まれ、外見上は WT と区別がつかなかった。Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>マウスは WT マウスと同様に発育し、成長曲線において両群間に有意差は無かった。生直後の全身骨格標本における骨化形態や、若齢マウスの関節軟骨組織における成長軟骨板や軟骨層の形態、Col2 および Col10 の発現パターンは、WT マウスと Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>マウスの両群間に明らかな差異を認めなかった。

しかし、Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>マウスは、12、15 カ月齢になると、加齢に伴い MMP-13 の発現や軟骨細胞のアポトーシスの増加を来し、WT マウスに比べ有意に OA が進行した。また、instability-induced OA モデルにおいて、sham 側では、両群共に、軟骨層は保たれており OA 変化はなく、組織学的有意差は認めなかったが、OA 側においては、Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>マウスで有意に OA が進行した。

IL-1α 刺激による軟骨変性モデルにおいて、Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>マウス軟骨で有意にプロテオグリカン放出量が亢進し、組織学的には MMP-13 の発現や軟骨細胞のアポトーシスの増加を来し、軟骨変性が進行した。また、軟骨細胞培養では、IL-1α 刺激により、MMP-13 と NO の産生量が Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>マウスで有意に増加した。WT マウス由来の正常軟骨細胞では IL-1α 刺激により、*Ugcg* mRNA の発現や GSL 合成が増加した。

【考察】軟骨細胞において GSLs が欠損すると、若齢のマウスでは、軟骨形成・分化には影響しなかったが、加齢やメカニカルストレスによる OA の進行が増強した。これらより、GSLs は軟骨の発生や分化には必須ではないが、正常な軟骨代謝を維持する上で重要な機能を持ち、IL-1α による MMP-13 の発現や軟骨細胞アポトーシスを制御することにより OA の進行を抑制している可能性が示唆された。また、WT マウスの軟骨細胞では、IL-1α 刺激により *Ugcg* mRNA の発現や GSL 合成が増加したが、Col2-*Ugcg*<sup>-/-</sup>マウスの軟骨細胞ではこの反応が生じ得ない。この現象は、IL-1α 刺激に対して、軟骨の恒常性を維持すべく代償性に働いている反応であると考えられるが、これを証明すべくさらなる研究が必要と思われる。

【結論】本研究結果は、OA の進行に GSLs の機能が深く関与していることを示した。GSLs は軟骨の発生や分化には必須ではないが、正常な軟骨代謝を維持する上で重要な機能を持ち、さらには MMP-13 の発現や軟骨細胞アポトーシスを制御することにより OA の進行を抑制している可能性が示唆された。これらのメカニズムに関するさらなる詳細な研究が必要であるが、軟骨細胞における GSLs は適切なレベルに保たれることが重要であり、OA 治療戦略の新しい有用な標的分子となりうるものと思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次  
副 査 教 授 三 浪 明 男  
副 査 教 授 田 中 伸 哉  
副 査 教 授 笠 原 正 典

## 学位論文題名

### 軟骨特異的遺伝子破壊マウスを用いた変形性関節症における スフィンゴ糖脂質の機能解析

変形性関節症 (OA) は、関節の変性・破壊により疼痛や機能障害を来す疾患で、高齢者における有病率が非常に高く、社会的問題となっている。スフィンゴ糖脂質 (GSLs) は、全身の細胞膜上に広く存在し、膜を介するシグナル伝達の中継点として非常に多様かつ重要な機能を持っている。OA 患者の軟骨では GSLs が減少しており、疾患への関与が示唆されている。本研究の目的は、マウス OA モデルを用いて、OA の病態における GSLs の機能的役割を解明することである。GSLs を全身性に欠損すると胎生致死になるため、軟骨特異的に GSLs を欠損したコンディショナルノックアウトマウス (CKO) を用いて実験を行った。まず、軟骨発生・分化における GSLs の影響を検証した。若齢では野生型マウス (WT) と CKO の表現型に差異なく、GSLs の欠損は軟骨・骨格形成に影響しなかった。次に、OA の主要因である加齢と力学的ストレスによる OA 発症に関して GSLs の影響を検証した。加齢による OA モデル (Age-associated OA) では、15 か月齢まで観察し、自然発症する OA を組織学的に評価した。CKO は、加齢に伴い MMP-13 の発現や軟骨細胞のアポトーシスの増加を起し、WT に比べ有意に OA が進行した。力学的ストレスによる OA モデル (Instability-induced OA) では、手術的に膝を不安定化し OA を誘発したところ、CKO で有意に OA が進行した。OA の病態における主要なサイトカインであるインターロイキン-1 (IL-1) 刺激による軟骨変性モデルでは、CKO で MMP-13 の発現や一酸化窒素 (NO) の産生、軟骨細胞アポトーシスが亢進し、軟骨変性が進行した。これらの結果から、GSLs は軟骨の発生や分化には必須ではないが、正常な軟骨代謝を維持する上で重要な機能を持ち、MMP-13 の発現や軟骨細胞アポトーシスを制御することにより OA の進行を抑制している可能性が示唆された。また、WT では IL-1 刺激で GSLs 代謝が亢進した。KO マウスではこの反応が生じ得ず、OA が悪化したことを考えると、この反応は IL-1 刺激に対して、軟骨の恒常性を維持すべく代償性に

働いている生体防御反応ではないかと考えられた。メカニズムに関する詳細な検証を要するが、GSLs は、IL-1 のシグナリングを調節し、MMP-13 の発現や軟骨細胞アポトーシスを制御することにより、OA の進行を抑制する機能を有する可能性が示唆された。

審査にあたり、副査田中教授から MMP-13 以外のタンパク質の評価に関する質問があった。申請者は、OA に関連する複数の異化タンパク質を測定したが、MMP-13 が特に有意な変化が認めたと回答した。また、Instability-induced OA モデルでの MMP-13 の免疫染色の評価に関する質問に対して、MMP-13 の免疫染色を施行したが、軟骨層の破壊が著しく染色される軟骨領域が少ないための評価困難を理由に提示しなかったと回答した。次いで、副査笠原教授から多数ある GSLs のなかで、どの分子が特に重要であると予想しているかという質問があった。申請者は、軟骨における GSLs では GM3 が多くの割合を占めるため、GM3 合成酵素ノックアウトマウスを用いた解析も始めており、今後の結果によると回答した。また、レスキュー実験をやるならば、どのような手法でやるのかとの質問があった。申請者は、*in vivo* で遺伝子導入により GSLs を過剰発現させる方法を考えているが、時間を要すると回答した。副査三浪教授からは、OA のメカニズムに関する医学的・分子生物学的な見解に関して、過去から現在までの変遷を踏まえ、今後の OA 研究の発展に向けての提言があった。最後に主査畠山教授から、本研究の今後の発展性に関する質問があった。申請者は、IL-1 以外の炎症性サイトカインに対する反応性の検証や GSLs の MMP-13 やアポトーシスに対する制御メカニズムを明らかにすることが必要であり、将来的には、ヒト OA における GSLs の機能解析や GSLs の OA 治療薬的効果の検討を行うことを考えていると回答した。

この論文は OA の病態における GSLs の機能解析をした非常に有用な研究であり、発症の分子メカニズムに関するさらなる詳細な研究が必要であるが、GSLs は今後の OA 治療戦略における新しい有用な標的分子となりうるものと期待される。

審査員一同はこれらの成果を評価し、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）の学位を受ける資格を有すると判定した。