



Title	関節軟骨の発生・分化に関わる遺伝子発現制御機構の解明
Author(s)	萩野, 弘将
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91853
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (萩野 弘将)	
論文題名	関節軟骨の発生・分化に関わる遺伝子発現制御機構の解明
論文内容の要旨	
<p>【緒言】</p> <p>変形性関節症 (OA) は関節表層の軟骨基質が変性し、骨棘形成を特徴とする関節軟骨の骨化や関節部の骨および軟骨組織の破壊を特徴とする関節疾患であり、重症化すると膝の痛み、下肢の筋力低下あるいは歩行困難などの著しいQOL低下を招く。</p> <p>超高齢社会の進行に伴い、OAの患者数は増加の一途を辿っており、国内において自覚症状を示す患者数で約1000万人、潜在的な患者数では約3000万人いると推定されている。そのため、医学的にも医療経済的にも医療費の高騰など大きな社会問題を引き起こしており、OAの根本的治療法の開発は喫緊の研究課題となっている。疫学調査から、OAの発症因子としては加齢、後天的な関節負荷、外傷、遺伝子素因など遺伝的要因と環境要因の相互作用で発症する複雑な多因子遺伝病であることが指摘されている。</p> <p>関節軟骨は、自己修復能力が乏しく、増殖能も極めて低いため、一旦損傷した関節軟骨を治癒させることは困難とされている。そのため、現在の変形性関節症の薬剤治療法としては、ヒアルロン酸の局所注射や消炎鎮痛剤などの対症療法に限られている。しかしながら、未だOAの分子標的も不明確であり、変形性関節症に対する有効な薬剤あるいは再生療法の開発は実現化されていない。</p> <p>関節表層組織は、物理的衝撃の吸収や摩擦の軽減といった役割を果たす。特に、関節表層組織に特異的に発現する遺伝子 <i>Gdf5</i> や <i>Prg4</i> が関節の形成や機能維持に重要な役割を果たすことが明らかにされている。そこで、本研究では、これらの遺伝子発現制御機構の解明を通して、関節軟骨細胞の生理学的特性の理解と、その遺伝子発現制御機構の解明を目指した。</p> <p>【目的】</p> <p>関節軟骨に特異的なプロテオグリカンである <i>Prg4</i> は、関節軟骨細胞の主要な細胞マトリックスであり、関節軟骨の潤滑性や滑膜細胞の増殖抑制などの機能維持に重要な役割を果たしている。実際に、<i>Prg4</i> ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ、力学的負荷による軟骨変性が引き起こされやすいことが報告されている (Ruan et al. 2013)。そこで本研究では、<i>Prg4</i> の制御メカニズムの解明が変形性関節症の治療戦略に繋がると考え、その発現制御機構を解明し、さらに <i>Prg4</i> の発現を増加させるシグナル分子および転写因子の探索を目指すこととした。</p> <p>【方法】</p> <p><i>Prg4</i> 発現を制御する転写因子の探索を行うため、関節軟骨表層細胞 (SFZ細胞) を単離し、骨組織を構成する軟骨細胞、骨芽細胞および間葉系幹細胞株 C3H10T10/2細胞を対象として、RNA-seq解析やマイクロアレイ解析により各々の細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、SFZ細胞で特異的に発現量の高い転写因子の探索を行った。SFZ細胞で特異的に発現量の高い転写因子を、レトロウィルスを用いてSFZ細胞に過剰発現し、あるいはノックダウン実験を行い、<i>Prg4</i> の mRNA 発現量を RT-qPCR法にて解析した。</p> <p>この転写因子の <i>Prg4</i> 遺伝子に対する関与は、<i>Prg4</i> 遺伝子プロモーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により検討した。</p> <p>次に当該転写因子の <i>in vivo</i> での関節機能について検討するため、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を応用して遺伝子改変マウス、<i>Prg4</i>-HiBiTノックイン (KI) マウスを作製し、<i>Prg4</i> の関節軟骨細胞および生体での発現動態をリアルタイムにモニタリングできるシステム開発を行った。HiBiTタグは、発光物質の酵素ドメイン LgBiT と高い親和性で結合して NanoLuc を構成し、基質と反応することで非常に強い発光を生じる新規レポーターシステムであり、<i>Prg4</i>-HiBiT-KI マウスを用いることにより、<i>Prg4</i> の発現を制御する転写因子を効率的に解析できる。当該転写因子のノックアウトマウスと <i>Prg4</i>-HiBiT-KI マウスを交配し、関節組織での <i>Prg4</i> 発現を検索した。</p>	

続いて、OAの発症や進行に対する当該転写因子の関与を検討するため、関節組織特異的ノックアウトマウスを作製し、脛骨半月板靭帯を切除し内側半月板の動きを不安定化させた外傷後OAモデルマウス（DMMモデル）にて、検討を行った。OAの病態は、DMM術後8週後の膝関節の病理組織解析およびOARSIのスコアリング評価値によって骨破壊の程度を指標とした。

【結果】

SFZ細胞に対して当該転写因子を過剰発現させると*Prg4*の発現量が著明に増加した。一方、shRNAを用いて当該転写因子をノックダウンすると*Prg4*のmRNA発現は低下した。またChIPアッセイおよびルシフェラーゼアッセイの結果から、この転写因子は、*Prg4*遺伝子プロモーターに直接結合し、その転写活性を促進することも見出した。

さらに胎生18日齢の当該転写因子のノックアウトマウスの膝関節組織を用いて、in situ hybridizationにて*Prg4*の発現を検討した結果、大腿骨および半月板での*Prg4*発現が野生型に比べ著しく低下していた。また*Prg4*-HiBIT-KIシステムを用いて、SFZ細胞における*Prg4*の発現を検索した結果、当該転写因子を欠失するマウス由来の細胞で*Prg4*発現が著明に低下した。

続いて、当該転写因子の関節軟骨特異的コンディショナルKOマウスでは、DMM処理により、軟骨表層部位の変性と破壊の程度がコントロールマウス群に比べて、顕著に高いOARSI scoreを示した。

【考察】

本研究の結果、*Prg4*の発現および関節軟骨の恒常性の維持に重要な転写因子の同定に成功した。今後、この転写因子のさらに詳細な制御機構を解明し、OAに対する有効な治療薬の開発に貢献したい。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (萩 野 弘 将)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 西 村 理 行 副 査 教授 野 田 健 司 副 査 准教授 松 永 和 秀 副 査 講師 宇佐美 悠
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、変形性関節症に対する新規治療法の開発への貢献を目指して、関節軟骨の発生および分化に重要な転写因子を同定し、その作用メカニズムと変形性関節症における役割の解明を行った。</p> <p>マウス関節軟骨細胞を特異的に分離・培養するシステムを確立し、マウス関節軟骨細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、特異的に高発現する転写因子を網羅的に検索した。その結果、関節軟骨に高発現する転写因子を同定した。関節軟骨細胞に関節軟骨特異的転写因子を過剰発現あるいはノックダウンすると、関節軟骨特異的遺伝子 <i>Prg4</i> の発現が、顕著に増加あるいは減少することを示した。関節軟骨特異的転写因子のノックアウトマウスを解析すると、<i>Prg4</i> の発現が消失することが明らかとなった。さらに、当該転写因子遺伝子のノックアウトマウスでは、変形性関節症を誘発する処理による関節破壊の程度が進行していることを見出した。</p> <p>以上の知見は、関節軟骨の発生・分化に重要な遺伝子の発現の制御機構の理解と、変形性関節症の発症メカニズムの解明に指針を提示するものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものである。</p>	