



Title	変形性関節症におけるヒアルロン酸分解酵素Tmem2 の役割
Author(s)	室谷, 智哉
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96006
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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 (室谷 智哉)	
論文題名	変形性関節症におけるヒアルロン酸分解酵素Tmem2の役割
【緒言】 変形性関節症（以下 OA）とは要支援、要介護の原因として代表的な運動器疾患であり、その患者数は高齢人口の増加とともに増え続けている。病因については加齢や物理的ストレス、炎症などの関与が示唆されているが、分子機構については十分に明らかになっていない。ヒアルロン酸（以下 HA）は、軟骨などの関節領域に高濃度で存在する生理活性物質である。HA 代謝制御機構の破綻が、OA の発症・進行に関与しているとされていることから、本研究では HA 代謝に注目した。HA は生体で最大の高分子ポリマーである。特徴として他の多糖鎖と比べてもターンオーバーが非常に速いという点が挙げられる。HA 分解酵素として古くから、HYAL1 や HYAL2 が知られているが、これらは細胞内において HA の分解に関わる酵素である。近年、細胞膜上に存在する新規 HA 分解酵素群の存在が明らかになってきている。この発見により、これまで合成系を中心に考察されてきた HA の機能に分解系を組み込むことによる新たな知見が期待されている。HA 分解酵素である Tmem2 が HA 代謝機構の中心的な役割を担っていることが徐々に明らかになりつつあるが、Tmem2 の生物学的機能や OA との関わりについては明らかになっていない。そこで、本研究では関節組織の恒常性維持における Tmem2 の役割、HA 代謝制御機構や OA の発症・進行との関わりを検討するとともに Tmem2 を標的分子とした OA に対する治療の可能性を考察することを目的とした。 【材料および方法】 1. <u>実験動物</u> Tmem2-FLAG ノックインマウスを使用した。また、col2a1-Cre^{ERT2};Tmem2^{flox/flox} マウスにタモキシフェンを 5 日間連続腹腔内投与し、軟骨特異的 Tmem2 コンディショナルノックアウトマウス（以下 Tmem2-CKO マウス）を作製した。 また、Col2a1Cre^{ERT2};R26-Tmem2 マウスを作製し、Cre 依存的に Tmem2 の過剰発現が誘導される Tmem2 過剰発現マウスを作製した。 2. <u>免疫組織化学染色</u> 関節軟骨から矢状断凍結切片を作製した。一次抗体はウサギポリクローナルアンチ-FLAG、HA 検出のために bHABP を使用した。二次抗体は抗ウサギ IgG 抗体、ストレプトアビジン Alexa Fluor™ 555、DAPI を用いて染色を行った。 3. <u>正常関節から軟骨細胞のシングルセルRNA-seqデータ解析</u> Sebastianらが報告したパブリックデータを再解析した。 4. <u>非OA群とOAモデル群における膝関節軟骨細胞のシングルセルRNA-seqデータ解析</u> Sebastianらが報告した非OA群と内側半月板靱帯切断術（以下DMM手術）7日後の膝関節から抽出したOAモデル群軟骨細胞のシングルセルRNA-seqパブリックデータを使用した。Tmem2、Acan、Mmp13、およびCol2a1などの軟骨細胞マーカーを発現するクラスターを抽出し、クラスターごとのTmem2の発現を解析し、非OA群と比較した。 5. <u>Tmem2欠失OAモデルマウスの組織学的評価および重症度評価</u> Tmem2-CKOマウスにDMM手術を行い、外科的OAモデルマウスを作成しDMM手術4週後、8週後、12週後の関節組織における関節軟骨の変性、OA進行度の評価を行った 6. <u>Tmem2欠失OAモデルにおけるアポトーシスの検出</u> Tmem2-CKOマウス関節軟骨から矢状断の凍結切片を作製し、TUNEL染色法を用いて検出を行った。	

7. Tmem2 の過剰発現による OA モデルマウスの組織学的評価および重症度評価

Tmem2 過剰発現マウスに DMM 手術を行い、外科的 OA モデルマウスを作成し、関節組織における関節軟骨の変性、OA 進行度の評価を行った。

【結果】

1. 膝関節における Tmem2 の局在の解析

関節軟骨非石灰化軟骨層に Tmem2 は発現していた。成長板では静止軟骨層から肥大軟骨層にかけて広範な発現を認めた。HA を豊富に含む滑液を生成する滑膜では、細胞周囲で Tmem2 の発現を認めた。

2. シングルセルRNA-seqデータ解析を用いた膝関節軟骨細胞における Tmem2 発現パターンの解析

8 つのクラスターにクラスタリングした。軟骨細胞、骨芽細胞、増殖軟骨、滑膜細胞で Tmem2 の高い発現を認めた

3. OA モデルマウスにおける Tmem2、HA の発現の解析

非 OA 群と比較し、OA モデル群で Tmem2 の発現が増加しており、石灰化軟骨層に及ぶ広範な発現が確認された。さらに、定量 PCR においても、OA モデルで Tmem2 の発現が有意に増加していた。一方、OA モデル群で HA の発現は低下していた。

4. OA モデルマウスの膝関節軟骨細胞のシングルセル RNA-seq パブリックデータの再解析

8 つのクラスターにクラスタリングした。軟骨細胞、間葉系細胞、骨芽細胞で非 OA 群と比較し OA モデル群で Tmem2 の発現が増加していた。

5. Tmem2 の欠失が OA の発症や進行に及ぼす影響の検討

DMM(+)Tmem2-CKO マウスにおいて、非石灰化軟骨層と石灰化軟骨層との境界部で軟骨層は剥離しており、有意に OA が進行していた。OARSI スコアではグレード 5 に及ぶ OA の進行が確認された。DMM 手術 4 週後、8 週後、12 週後のすべてのタイムコースにおいて有意に高い OARSI スコアを示した。

6. Tmem2 欠失軟骨細胞におけるアポトーシスの解析

非 OA 群と比較し、DMM(+)Tmem2-CKO マウスで TUNEL 陽性細胞の発現が増加しており、アポトーシスが亢進していた。また、非石灰化軟骨層軟骨細胞で TUNEL 陽性細胞の割合が有意に増加した。

7. Tmem2 の過剰発現が OA の発症や進行に及ぼす影響の検討

Tmem2 過剰発現マウスで、非石灰化軟骨層と石灰化軟骨層の境界部で軟骨が脱落するグレード 5 まで OA が進行した

【考察および展望】

Tmem2 の欠失により、OA が有意に進行することが明らかとなった。HA 過剰な状況がプロテオグリカン複合体の構造に影響を与え、機械的負荷に対する脆弱性が増加した可能性が考えられる。Tmem2 欠失 OA モデルマウスの関節軟骨表層でアポトーシスが増加していた。これらのメカニズムについてはさらなる検証が必要である。が、これは関節軟骨基質の成分や構造が変化し、軟骨細胞の機械的負荷に対する脆弱性が増加したことにより引き起こされた可能性があるかと推察したが、詳細については今後の検討課題である。Tmem2 の過剰発現により、OA が有意に進行することが明らかとなった。HA が過剰に分解されることで、HA 過剰な時と同様に機械的負荷に対する脆弱性が増加したと示唆される。

本研究では OA 関節軟骨において、Tmem2 が破壊的に作用するのか、保護的に作用するのか明らかにはなっていない。Tmem2 の完全な欠失により、HA 代謝の恒常性が維持できなくなった結果、OA を引き起こした可能性が考えられるが、実際にヒト OA で HA の分子量が減少していること、保存療法として HA の関節内補充療法がおこなわれていることがあり、また、本実験でも Tmem2 の過剰発現により、OA が進行したことから、Tmem2 の減少による HA の増加は OA 発症に保護的に働くと考えの方が自然である。Tmem2 は細胞内ではなく細胞表面に発現していることから、他の HA 分解酵素と比べ、HA の合成、分解をターゲットとした有望な分子標的であると考え。 Tmem2 を抑制することで、OA の発症を予防することができ、今後の詳細な検証が期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (室 谷 智 哉)			
	(職) 氏 名		
論文審査担当者	主 査	教 授	山城 隆
	副 査	教 授	田熊 一敞
	副 査	准教授	波多 賢二
	副 査	講 師	阿部 真土
論文審査の結果の要旨 本研究は細胞外ヒアルロン酸(HA)分解酵素である Transmembrane protein 2 (Tmem2)がマウス膝関節軟骨表層で広範に発現しており、マウス変形性膝関節症の発症初期において、<i>Tmem2</i> の発現量が増加していることを明らかにした。さらに、<i>Tmem2</i> による HA の適切な分解、合成の双方が変形性膝関節症の発症過程において重要であることを証明した。今回の研究は <i>Tmem2</i> による HA 代謝に基づく変形性膝関節症の病態解明にとどまらず、<i>Tmem2</i> を標的とした新規治療薬開発への糸口となり得る。 以上のことより、本研究は変形性膝関節症発症における <i>Tmem2</i> の重要性を明らかにしたことから、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。			