

氏名（本籍）	中村 寛	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第 1215 号	
学位授与日付	令和 4 年 12 月 21 日	
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学位論文題目	Reduced dynamic loads due to hip dislocation induce acetabular cartilage degeneration by IL-6 and MMP3 via the STAT3/periostin/NF- κ B axis	
審査委員	（主査）教授	長岡 仁
	（副査）教授	坂口 裕和 教授 紙谷 義孝

論文内容の要旨

発育性股関節形成不全症（DDH）は、股関節における臼蓋と大腿骨頭の適合不全によって引き起こされる股関節の形態異常であり、変形性股関節症の重要なリスク因子の一つである。かつては、先天性股関節脱臼（CDH）といわれたが、股関節脱臼は出生後の育児習慣が原因で起こることが示され、現在は”先天性”ではなく”発育性”と定義されるようになった。軽度の DDH では、臼蓋辺縁に局所的に持続的な過度なストレスがかかって軟骨変性が起こる。一方、幼少期（歩行開始前）から完全に股関節が脱臼している場合（International Hip Dysplasia Institute classification grade 3 or 4）、臼蓋の軟骨には動的負荷がほとんどかからないにも関わらず経年的に軟骨変性が進行する。このような動的負荷減少による軟骨変性メカニズムについてはほとんど研究されていない。本研究の目的は、股関節脱臼によって動的負荷が減少した臼蓋の関節軟骨の早期変性を誘導する分子生物学的メカニズムを解明することである。

【対象と方法】

新生児ラットに 10 日の Swaddling を行ってラット DDH モデルを作成し、10 日齢と 4 週齢で組織学的解析を行った。3 週齢ラットの臼蓋関節軟骨を採取し、RNA シークエンシングによる発現遺伝子の網羅的解析を行い、軟骨変性に関連する因子としてペリオスチン（*Postn*）に着目した。続いて、リアルタイム PCR、*in situ* ハイブリダイゼーション、免疫染色により 10 日齢と 4 週齢の DDH ラットの臼蓋関節軟骨で *Postn* の発現上昇を確認し、*Postn* に関連する軟骨異化因子の発現について解析した。ラット初代軟骨細胞にリコンビナント *Postn* を投与し、ウェスタンブロット法によって軟骨異化因子の誘導に関わる細胞内シグナルについて解析した。動的負荷の減少が軟骨で *Postn* を誘導するメカニズムを解明するため、ラット初代軟骨細胞を Random positioning machine による仮想的な微小重力条件で培養し、ウェスタンブロット法によって細胞内シグナル変化を検証した。*Postn* に関連する軟骨異化因子であるインターロイキン 6（IL-6）もまた、*Postn* の発現誘導に関わる可能性が考えられたため、ラット初代軟骨細胞にリコンビナント IL-6 を投与してリアルタイム PCR で *Postn* の発現を確認し、関連する細胞内シグナルについてウェスタンブロット法で解析した。最後に、野生型マウス（Wild）とペリオスチンノックアウトマウス（*Postn*^{-/-}）で DDH モデルを作成し、組織学的解析と遺伝子発現変化について解析した。

【結果】

10 日齢の DDH ラットで股関節脱臼と臼蓋低形成を認め、4 週齢で臼蓋関節軟骨の変性を認めた。3

週齢ラットの臼蓋軟骨の RNA シークエンシングの結果、2 倍以上の発現変化を示し、有意差 ($p < 0.05$) を認めた 81 遺伝子について解析した。DDH で上昇した遺伝子は 21 遺伝子、低下した遺伝子は 60 遺伝子であった。81 遺伝子の多くは細胞外マトリックスに関連し、上昇した 21 遺伝子は細胞接着に、低下した 60 遺伝子は軟骨形成に関連する遺伝子が多く含まれた。上昇した 21 遺伝子の中から軟骨形成阻害や軟骨変性に関連する因子として *Postn* に着目した。10 日齢と 4 週齢の DDH ラットの臼蓋関節軟骨では、*Postn* と *Postn* に関連する軟骨異化因子である IL-6 とマトリックスメタロプロテアーゼ 3 (*Mmp3*) の発現上昇を認めた。軟骨細胞において、*Postn* はインテグリンに結合して焦点接着キナーゼ (FAK) や Src を介して細胞内シグナルを活性化し、核内因子 κ B (NF- κ B (p65)) シグナルを介して *IL-6* と *Mmp3* の発現を誘導した。さらに、IL-6 はシグナル伝達兼転写活性化因子 3 (STAT3) シグナルを介して *Postn* の発現を誘導した。軟骨細胞では、微小重力条件が STAT3 を介して *Postn* の発現を誘導した。これらの結果から、*Postn* の喪失により DDH の臼蓋軟骨の変性が抑制されると予想し、*Postn*^{-/-} DDH マウスを作成し解析した。その結果、Wild DDH マウスと比較して IL-6 と *Mmp3* の発現が抑制され、早期軟骨変性が抑制された。さらに、Wild DDH マウスではリン酸化 STAT3 の発現が上昇したのに対し、*Postn*^{-/-} DDH マウスでは、Wild DDH マウスと比較してリン酸化 STAT3 の発現が抑制された。

【考察】

本研究は、股関節脱臼によって動的負荷が減少した臼蓋軟骨が変性するメカニズムに焦点を当てた。実際、DDH モデルでは、持続的な過度のストレスや外傷による変形性関節症にみられる軟骨の摩耗、毛羽立ち、欠損のような所見はみられず、一般的な変形性関節症発症メカニズムとは異なるメカニズムが働くことが想定された。*Postn* は、細胞増殖や細胞浸潤、脱分化、組織変性や組織再成などを促進する。さらに、*Postn* は異なる細胞同士の細胞間シグナル伝達に寄与し、細胞表面のインテグリンに結合して様々な細胞内シグナル経路を誘発する。本研究では、軟骨への動的負荷減少は STAT3 シグナルを介して *Postn* を誘導し、*Postn* はインテグリンに結合して FAK/Src を介して NF- κ B (p65) シグナルを活性化し、IL-6 と *Mmp3* の発現を誘導することで軟骨変性を引き起こすことが示された。IL-6 は、STAT3 シグナルを介して *Postn* の発現を促進することによって、軟骨細胞間の STAT3-*Postn*-IL-6 loop を活性化して軟骨変性を促進することが示された。

【結論】

股関節脱臼によって動的負荷が減少した臼蓋軟骨が変性するメカニズムの一端を明らかにした。関節軟骨の形成と維持には動的負荷が必要であり、DDH 患者の軟骨変性を防止するには股関節脱臼の早期発見と治療が重要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 中村 寛は、股関節脱臼による臼蓋軟骨軟骨への動的負荷の減少が、STAT3 シグナルを介した *Postn* 発現を誘導し、それがさらに FAK/Src から NF- κ B (p65) を介する IL-6 と *Mmp3* の発現を誘導することで軟骨変性を引き起こすことを明らかにした。本研究結果は、発育性股関節形成不全症の病態解明に繋がる重要な成果であり、整形外科の発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Reduced dynamic loads due to hip dislocation induce acetabular cartilage degeneration by IL-6 and MMP3 via the STAT3/periostin/NF- κ B axis
Scientific Reports 12(1):12207 (2022) doi: 10.1038/s41598-022-16585-6.