

学位論文要約
Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

氏名： 川島 健志
Full Name Kenji Kawashima

学位論文題目： 学位論文題目 :
Thesis Title Heparan Sulfate Deficiency Leads to Hypertrophic Chondrocytes by Increasing Bone Morphogenetic Protein Signaling

学位論文要約 :
Summary of Thesis

ヘパラン硫酸合成酵素 (EXT1, EXT2) の異常で発症する遺伝性多発性外骨腫症 (Multiple Hereditary Exostoses; 以下, MHE) では, 全身に多発する骨腫瘍に加え四肢変形など多彩な骨格異常を呈する。またMHE患者では変形性関節症が早期に起こりやすい。過去に様々なMHEモデルマウスを用いてヘパラン硫酸に関して研究が施行され, Bone morphogenetic protein (BMP) シグナルの外骨腫の形成に対する関与を示唆する報告があるが, ヘパラン硫酸の関節軟骨に対する役割は未だに明らかにされていない。そこで本研究では関節軟骨特異的にExt1をノックアウトした遺伝子改変マウスを用いて, ヘパラン硫酸の欠損が関節軟骨に及ぼす影響について解析した。さらにヘパラン硫酸を介してシグナルを活性化させるBMP/Sma- and Mad-Related Protein (Smad) シグナル経路に着目して, そのメカニズムを解析した。

【対象と方法】

関節軟骨特異的にExt1をノックアウトさせたExt1^{f/f};Prg4-Creマウス(以下, Ext1-cKOマウス)を作製し, 関節軟骨の組織学的解析を行った。また外科的変形性関節症誘発モデルとして内側半月板切除 (Destabilization of the medial meniscus; 以下, DMM) モデルを作製し, 変形性関節症の発生や病態の進行の相違について検討した。またExt1-cKOマウスとコントロールマウスの関節軟骨を採取し, 初代軟骨細胞培養を行い, ウェスタンブロット法にてBMPシグナル伝達因子であるpSmad1/5/9の発現の違いを解析した。さらにBMPインヒビターをExt1-cKOマウスに腹腔内投与し, 関節軟骨の表現型の変化を解析した。

【結果】

3ヵ月齢でのExt1-cKOマウスに四肢変形など骨格の異常は認めなかったが, 膝関節の組織染色ではコントロールマウスと比較して関節軟骨の肥厚と肥大軟骨細胞数の増加を認めた。成長軟骨板の柱状構造には異常は認めなかった。生後0日では関節軟骨の表現型に異常は認めなかったが, 生後2週から関節内に肥大軟骨細胞が出現した。生後1ヵ月, 生後6ヵ月, 生後12ヵ月のExt1-cKOマウスについても同様に関節軟骨の肥厚と肥大軟骨細胞数の増加を認めた。しかし, 経時的な関節症性変化の進行についてコントロールマウスとの明らかな相違は認めなかった。DMMモデルでも軟骨変性の進行にコントロールマウスとの明らかな相違は認めなかった。Ext1-cKOマウスの免疫染色では肥大軟骨細胞に肥大細胞マーカーであるX型コラーゲンとMatrix metalloproteinase 13の発現上昇を認めた。またpSmad1/5/9の発現上昇も認め, BMP/Smadシグナルの亢進が示唆された。続いて初代培養軟骨細胞のウェスタンブロット法でもExt1-cKOマウスでのpSmad1/5/9の発現上昇を確認した。Ext1-cKOマウスにBMPインヒビターを投与したin vivoの実験において, 非投与群と比較し, 関節軟骨の組織染色では肥大軟骨細胞数は有意に低下し, 関節軟骨の厚みも減少した。さらに免疫染色においてpSmad1/5/9の発現は非投与群に比べ低下した。よって, ヘパラン硫酸欠損マウスの表現型がBMPインヒビターによって部分的に改善されたことを認めた。

【考察】

従来のMHEモデルマウスの研究からヘパラン硫酸はFibroblast growth factor, Vascular endothelial growth factor, Transforming Growth Factor, Indian Hedgehogなど様々なシグナル経路に関与していることが示されている。またBMPシグナル亢進の外骨腫形成に対する関与を示唆する報告をもとに, 我々が見出したヘパラン硫酸の欠損による関節軟骨の表現型も同様にBMPシグナルが関与しているのではないかと仮説を立てた。またBMPインヒビターの投与により外骨腫形成が抑制されることは過去に示されているが, 関節軟骨に対する効果を示した報告はこれまでにない。我々の作製したExt1-cKOマウスにおいてBMPインヒビター投与により, 関節軟骨における軟骨細胞の肥大化が抑制され, 関節軟骨の厚みも減少したことからヘパラン硫酸の欠損がBMP/Smadシグナルの亢進を介して関節軟骨の表現型の変化に関与していることが明らかになった。本研究がMHEの疾患メカニズムのさらなる理解や変形性関節症の新規治療開発につながるものと

考えられる。

【結論】

ヘパラン硫酸の欠損がBMP/Smadシグナルの亢進を介して関節軟骨細胞を肥大化に導くことが明らかになった。ヘパラン硫酸は正常な関節軟骨の表現型維持に重要な役割を持つことが示唆された。