

氏名（本籍）	川島健志	（岐阜県）
学位の種類	博士	（医学）
学位授与番号	甲第1144号	
学位授与日付	令和2年12月16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	Heparan Sulfate Deficiency Leads to Hypertrophic Chondrocytes by Increasing Bone Morphogenetic Protein Signaling	
審査委員	（主査）教授	竹内 保
	（副査）教授	土井 潔
		教授 大沢 匡毅

## 論文内容の要旨

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。過去の MHE モデルマウスを用いたヘパラン硫酸に関する研究から外骨腫に Bone morphogenetic protein (BMP) シグナルが関与していることが示唆されている。一方で、ヘパラン硫酸の欠損が変形性関節症を引き起こす機序については解析が進んでいない。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によって引き起こされる関節軟骨の表現型について解析した。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/Smad- 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<sup>flx/flx</sup>;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不安定化 (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、軟骨細胞の初代培養を行い、ウエスタンブロット法にて Smad1/5/9 のリン酸状態の違いを解析した。さらに BMP 阻害剤を *Ext1-cKO* マウスに腹腔内投与し、その影響を解析した。

### 【結果】

3 か月齢での *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。生後 0 日では関節軟骨に異常が認めなかったが、生後 2 週から関節内に肥大軟骨細胞が観察された。生後 1 か月、生後 6 か月、生後 12 か月の *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、経時的な軟骨変性の進行については、コントロールマウスとの間に有意な差は認められなかった。*Ext1-cKO* マウスの膝関節の免疫組織染色を行なったところ、肥大軟骨細胞に特徴的なマーカーである X 型コラーゲンの発現上昇と、軟骨変性マーカーである Matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) の発現上昇を認め、変形性関節症で観察される肥大軟骨細胞の特徴

として矛盾しなかった。また、軟骨変性への BMP/Smad シグナルの関与を調べるために、リン酸化された Smad1/5/9 を認識する抗体を用いて、*Ext1*-cKO マウスの関節軟骨切片の免疫組織染色を行うとともに、*Ext1*-cKO マウスから得た初代軟骨細胞の抽出タンパク質をウエスタンブロット法によって解析を行なった。いずれの場合も Smad1/5/9 のリン酸化の上昇が認められ、軟骨変性に BMP/Smad シグナルが関与していることが示唆された。BMP/Smad シグナルの役割を調べるために、*Ext1*-cKO マウスに BMP 阻害剤を投与した。その結果、vehicle 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 Smad1/5/9 のリン酸化は vehicle 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 阻害剤によって部分的に改善されたことを認めた。

#### 【考察】

従来の研究から、BMP シグナル亢進が外骨腫形成に関与をしていることが示唆されている。同様に、本研究によって、ヘパラン硫酸の欠損による関節軟骨の変性にも BMP シグナルが関与している可能性が示された。また、変形性関節症治療へ応用の可能性を探るために、*Ext1*-cKO マウスに BMP 阻害剤投与したところ、関節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することが観察された。この結果より、軟骨変性の改善に対する BMP 阻害剤投与の有効性が示された。これまでに、MHE モデルマウスに対する BMP 阻害剤の投与により外骨腫形成が抑制されることが示されているが、関節軟骨に対する効果を示した報告はこれまでにない。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状態を維持するために重要な役割を持つことが示された。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 川島健志は、ヘパラン硫酸合成酵素 EXT1 のノックアウトマウスを用いて、ヘパラン硫酸の欠損が関節軟骨に及ぼす影響について検討した。軟骨特異的に *Ext1* 遺伝子発現をノックアウトさせたマウスを用いて、関節軟骨の肥厚と肥大軟骨細胞数の増加を見出した。肥大化した軟骨細胞には X 型コラーゲンと MMP-13 の発現上昇が認められたが、外科的変形性関節症誘発モデル(内側半月板不安定化モデル)では軟骨変性の進行に変化はみられなかった。加えて BMP/Smad シグナル亢進を見出し、ヘパラン硫酸欠損マウスの表現型が BMP 阻害剤により部分的に改善されることを見出した。本研究は MHE の疾患メカニズムの更なる理解や変形性関節症の新規治療の開発につながることを期待され、今後の研究、治療の発展に少なからず寄与すると認められる。

---

#### [主論文公表誌]

Kenji Kawashima, Hiroyasu Ogawa, Shingo Komura, Takuma Ishihara, Yu Yamaguchi, Haruhiko Akiyama, Kazu Matsumoto : Heparan Sulfate Deficiency Leads to Hypertrophic Chondrocytes by Increasing Bone Morphogenetic Protein Signaling  
Osteoarthritis and Cartilage 28, 1459-1470 (2020). doi: 10.1016/j.joca.2020.08.003.