

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	住吉 範彦
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 The role of tetraspanin CD9 in osteoarthritis using three different mouse models (3個のマウス実験モデルで解析したテトラスパニン CD9 の変形性関節症における役割)			
論文審査担当者			
主査	教授	杉山 英二	印
審査委員	教授	青山 裕彦	
審査委員	教授	外丸 祐介	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>変形性関節症(OA)は罹患率の高い疾患であり，関節軟骨の変性，軟骨下骨や滑膜などその他の関節内組織の障害を特徴としている。その主要な要因は，加齢，外傷，炎症などによる関節組織の恒常性の破綻であるが，OAの発症，伸展における分子レベルでのメカニズムに関しては不明な点が多い。</p> <p>CD9は哺乳類細胞の細胞膜または一部のエンドソームに存在する細胞膜4回貫通型タンパクであり，CD63，CD81，CD82，CD151などのテトラスパニンタンパクファミリーの一員である。CD9は細胞結合や遊走，シグナル伝達系に作用して血管新生に重要な役割を果たしている。また，受精や破骨細胞の分化誘導，筋新生に関わる細胞融合にも関与している。OAを生じた滑膜内でのCD9発現増加，骨粗鬆症モデルでは活性化破骨細胞におけるCD9発現増加，コラーゲン誘導関節炎モデルでは骨びらんの部位におけるCD9発現増加が報告されている。一方，OAにおけるテトラスパニンCD9の役割については明らかではない。</p> <p>本研究では，OAの病態におけるCD9の役割を明らかにするために，CD9ノックアウトマウス(CD9<sup>-/-</sup>マウス)を用い，加齢モデル，サージカルモデル，抗原誘導関節炎(AIA)モデルの3種類の関節症モデルを作製し，軟骨変性および炎症の程度を組織学的にスコアリングして野生型マウスと比較検討した。また，軟骨基質の変性に対するCD9の関与を解析するため，マウス大腿骨頭からのプロテオグリカンの放出量をプロテオグリカン放出アッセイで測定した。さらに，炎症性サイトカインであるIL-1で刺激した軟骨細胞の2型コラーゲン(<i>Col2a1</i>)とアグリカン(<i>Aggrecan</i>)の発現をリアルタイムPCR法を用いて解析した。</p> <p>関節症性モデルの解析では，加齢モデルおよびAIAモデルにおいて，軟骨変性および軟部組織の炎症スコアがCD9<sup>-/-</sup>マウスで有意に抑制されていた。一方，サージカルモデルでは関節症性変化の程度，炎症スコアともに野生型マウスと差は認めなかった。</p>			

主要な軟骨基質分解酵素である ADAMTS-5 や MMP-13 の発現を AIA モデルにおいて免疫染色で解析したところ、軟骨細胞における ADAMTS-5 の発現は野生型マウスと CD9<sup>-/-</sup>マウスで差は認められなかったが、MMP-13 の発現は CD9<sup>-/-</sup>マウスで低下していた。

プロテオグリカン放出アッセイにおいて、野生型および CD9<sup>-/-</sup>マウスにおける大腿骨頭からのプロテオグリカンの放出は、両群とも IL-1 刺激により増加したが、その増加率には両群間で差を認めなかった。

軟骨の主要な細胞外マトリックスである *Col2a1*, *Aggrecan* の軟骨細胞における発現をリアルタイム PCR 法で検討すると、CD9<sup>-/-</sup>マウスにおいて *Col2a1*, *Aggrecan* の発現が増加しており、IL-1 刺激による発現増強も野生型マウスと比較し、CD9<sup>-/-</sup>マウスで高かった。

本研究は、OA の発症、進展における CD9 の役割を 3 種類の関節症性モデルで解析した初めての報告である。CD9<sup>-/-</sup>マウスは発達過程で関節の発生において異常は示さず、関節も 6 か月齢では組織学的に正常であった。しかし加齢に伴い生じる軟骨変性は CD9<sup>-/-</sup>マウスにおいて抑制されていた。また、著者の研究では、AIA モデルでは CD9<sup>-/-</sup>マウスにおいて OA 進展の抑制がみられたが、サージカルモデルでは両者に有意な差は認められなかった。これは、サージカルモデルにおける力学的負荷が CD9 欠損による関節保護的な作用を上回る負荷であったためと考えられた。

IL-1 によるプロテオグリカンの放出については、野生型マウスと CD9<sup>-/-</sup>マウスで差が認められなかったが、軟骨細胞の *Col2a1* および *Aggrecan* は CD9<sup>-/-</sup>マウスで発現が上昇していた。*Col2a1* および *Aggrecan* は軟骨の細胞外マトリックスを構成する主要な蛋白であり、CD9 欠損による OA 進展の抑制はこれらの蛋白の発現上昇と関連があるかもしれない。

以上の結果から、本論文では、加齢、炎症により発症する OA の病態における CD9 の役割が明らかにされた。また、CD9<sup>-/-</sup>マウスにおいて、OA 進展の抑制が認められたことから、CD9 を標的とした新たな治療の可能性が示唆された。これらの知見は、発症や伸展について病態解明が未だ十分ではない変形性関節症において、新たな研究の方向を示すものであり、整形外科領域の発展に資すること大である。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。