

博士論文番号 0281017

セリンプロテアーゼ HtrA1 の軟骨と骨における機能解析

土屋 秋穂

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能学講座

(川市 正史教授)

平成 17 年 1 月 6 日

## 目次

序論		4-12
	図	13-15
材料と方法		16-26
第一章	骨形成における HtrA1 の発現解析	
	結果	27-31
	考察	33-36
	図	37-47
第二章	関節炎マウスを用いた HtrA1 の機能解析	
	結果	48-52
	考察	53-55
	図	56-63
第三章	HtrA1 遺伝子欠損マウスの作製と関節炎の誘導	
	結果	64-68
	考察	69-70
	図	71-75
第四章	軟骨と骨に HtrA1 を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製	
	II 型コラーゲンのプロモーターの下流で HtrA1 を軟骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスの作製	
	結果	76-78
	考察	79-80
	図	81-85
	I 型コラーゲンのプロモーターの下流で HtrA1 を骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスの作製	
	結果	86
	考察	87
	図	88-89

謝辭

90

參考文獻

91-98

## 序論

### HtrA ファミリー

HtrA1/DegP はバクテリアからヒトまで保存されたセリンプロテアーゼである。HtrA ファミリーは中央にタンパク質分解酵素活性を持つセリンプロテアーゼドメインと C 末端側に少なくともひとつのタンパク質間相互作用に働く PDZ ドメインを共通して持っている (図 1) (Clausen et al., 2002)。

バクテリアの HtrA タンパク質は periplasm で、misfold タンパク質の分解酵素 (シャペロン) とヒートショックタンパク質 (high temperature requirement) として変性タンパク質の分解に働いている (Spiess et al., 1999)。また、立体構造も明らかになっており、HtrA は輪状の 3 量体が上下に結合し、球状の 6 量体を形成している。その球の中央にプロテアーゼの活性部位が存在する。球状の 6 量体の側壁部分に PDZ ドメインが存在し、PDZ ドメインは分子の開閉状態をつくり、基質との結合を調整していると考えられている (Krojer et al., 2002)。

ヒトとマウスの HtrA は 1 から 4 まで存在し、HtrA1、HtrA3、HtrA4 は N 末端側に分泌シグナル、IGFBP ドメイン、Kazal-type inhibitor ドメインを持っている (Clausen et al., 2002)。

HtrA2 は他の HtrA とは異なり、N 末端側にミトコンドリア局在化シグナルと膜貫通領域をもち、ミトコンドリアに局在する。HtrA2 はアポトーシス誘導刺激を受けると細胞質に放出され、アポトーシス誘導因子であるカスパーゼを活性化してアポトーシスに導く。また、HtrA2 のプロテアーゼ活性によってカスパーゼを使わずにアポトーシスを誘導できることが知られている (Suzuki et al., 2001、Martins et al., 2002)。HtrA2 遺伝子欠損マウスは線条体のニューロン集合体が欠損し、神経変性障害を起こして、パーキンソン様のフェノタイプを示す。また、運動ニューロンが変性を起こす Motor-neuron degeneration (mnd)2 変異マウスは HtrA2 のセリンプロテアーゼドメインに点変異があり、プロテアーゼ活性が減少している。mnd2 変異マウスはプロテアーゼ活性の欠損のためにミトコンドリアの正常な機能ができなくなり、神経変性などが起こると考えられている (Jones et al., 2003)。HtrA2 もバクテリアの HtrA 同様にミトコンドリアにおける変性タンパク質の分解に働いている可能性が示唆されている。また、HtrA2 はアルツハイマー関連因子の Presenilin や Amyloid  $\beta$  と PDZ ドメインで結合する (Gupta et al., 2004、Park et al., 2004)。Presenilin の C 末端のペプチドが HtrA2 のプロテアーゼ活性を上昇させ、細胞死を誘導することが最近明らかになってきており、アルツハイマーとの関連も

示唆されている(Gupta et al., 2004)。

HtrA1はヒトの線維芽細胞をSV40で形質転換すると発現が消失する遺伝子として単離された(Zumbrunn et al., 1996)。最近、HtrA1は卵巣ガンで発現が上昇し(Shridhar et al., 2002)、卵巣ガンの細胞株でHtrA1を過剰発現させるとアポトーシスが誘導されることが分かっている(Chien et al., 2004)。さらにHtrA1は悪性メラノーマでも発現が減少し、メラノーマの細胞株でHtrA1を発現させると、細胞増殖を抑制することが報告されている(Baldi et al., 2002)。ほかにも脳腫瘍や乳ガン、子宮頸ガン、肝臓ガンなどの細胞株で発現が減少していることが分かっている(Chien et al., 2004)。HtrA1遺伝子は10番染色体の10q25.3-q26.2に位置し(Zumbrunn et al., 1997)、この近くにはガン抑制遺伝子がいくつか存在することが明らかになっている。これらのことから、HtrA1がガン抑制遺伝子である可能性が示唆されている。

HtrA1は変形性関節炎の患者の関節軟骨で発現が上昇することが報告されているが(Hu et al., 1998)、リウマチ性関節炎モデルマウスでは、HtrA3の発現は上昇しないことも分かっている(Tocharus et al., 2004)。

yeast two hybrid screeningにより、HtrA1のPDZドメインとI、II、II型コラーゲンのc-propeptideが結合する。III型コラーゲンのc-propeptideはHtrA1によって分解される。また、PDZドメインへのc-propeptideの結合はHtrA1のプロテアーゼ活性を数倍上昇させることも分かっている(Muruwantoko et al., 2004)。HtrA1とHtrA3のプロテアーゼは軟骨基質成分プロテオグリカンのDecorinやBiglycanを分解する(Tocharus et al., 2004)。

HtrA1の発現部位はTGF- $\beta$  familyの機能領域と一致しており、HtrA1タンパク質は広範なTGF- $\beta$  familyのサイトカインと結合し、そのシグナル伝達活性を阻害することから、HtrA1がTGF- $\beta$ ファミリーのアンタゴニストであることが示唆されている(Oka et al., 2004)。

HtrA3が発現している組織はHtrA1とほぼ一致しているが、HtrA1とは同じ組織でも異なる部位に発現しているものもある(Nie et al., 2003、Tocharus et al., 2004)。また、HtrA3もTGF- $\beta$ のシグナル阻害活性を持つ(Tocharus et al., 2004)。

胎児での骨発生時におけるHtrA1の発現部位がin situ hybridizationにより、分かっている(Oka et al., 2003)。胎生12.5日目では軟骨原基が形成される領域の間葉系細胞凝集部位の周辺や体幹の予定骨形成領域の周辺に発現が見られる。13.5日目では予定関節領域と将来、腱、靭帯、椎体の椎間板が形成される部分に発現している。HtrA1は軟骨になる領域には発現が見られず、軟骨原基の周辺や同じ間葉系細胞から分化した腱や靭帯などに発現が見られる。

TGF- $\beta$  のサイトカインは軟骨形成予定領域で発現し、間葉系細胞を軟骨細胞へと分化させる。HtrA1 は軟骨形成予定領域の周囲で TGF- $\beta$  シグナルを阻害することで、間葉系細胞の軟骨細胞への分化を抑制して腱や靭帯などに分化誘導することが示唆されている (Oka et al., 2004)。

## TGF- $\beta$ シグナル

TGF (transforming growth factor) - $\beta$  スーパーファミリーは TGF- $\beta$  と構造の類似した一群のペプチドを示し、現在までに 30 種類以上見つかっている。TGF- $\beta$  ファミリーは大きく分けて、TGF- $\beta$ 、Activin/Inhibin、BMP (bone morphogenetic protein) のサブファミリーとその他のものに分類できる (Massague et al., 1998)。

TGF- $\beta$  ファミリーは 2 量体を形成して、細胞膜上に存在するセリンスレオニンキナーゼ活性を持つ I 型、II 型受容体と結合する。リガンドが結合した受容体は細胞内のシグナル伝達因子である特異型 Smad をリン酸化する。リン酸化された特異型 Smad は細胞質で Smad4 と結合し、核内へと移行し、転写制御因子として働く (ten Dijke et al., 2004)。特異型 Smad は TGF- $\beta$  と BMP で異なり、TGF- $\beta$  や Activin のシグナルを伝える Smad2、3 と BMP サブファミリーのシグナルを伝える Smad1、5、8 に分けられる (Derynck et al., 2003)。TGF- $\beta$  ファミリーのシグナル伝達を調節する因子として、細胞外で TGF- $\beta$  ファミリーと結合、または受容体と結合してシグナル伝達を阻害するアンタゴニストが存在する。アンタゴニストには特異性があり、Activin には Follistatin、BMP には Noggin や Chordin などが結合し、シグナル伝達を阻害している。

TGF- $\beta$  ファミリーは発生過程で、胚発生や臓器形成、細胞の分化などの調節に必須な役割をしている。また、生後も細胞増殖や細胞死、細胞外基質タンパク質の産生と分解などを調節している。

TGF- $\beta$  ファミリーのサイトカインは、骨でもいろいろな機能を持っている。骨のリモデリングにおいて TGF- $\beta$  は、骨基質中に貯蔵され、破骨細胞による骨吸収が起こった際に放出され、骨芽細胞に対しては促進的に働き、基質の産生を促進させ、破骨細胞に対しては抑制的に働き、骨形成を促進させている (Hill et al., 1998)。

また、TGF- $\beta$  は関節軟骨において軟骨細胞増殖、コラーゲンやプロテオグリカンなどの軟骨の細胞外基質の合成促進、MMP などの分解酵素の産生を抑える働きを持つ (Chubinskaya et al., 2003)。TGF- $\beta$  のシグナル伝達因子である Smad3 を欠損させることにより TGF- $\beta$  シグナルを阻害したマウスは成長するに

つれて関節軟骨で、肥大軟骨細胞の数が増え、関節軟骨に裂け目ができるなど関節軟骨の異常がおこり、ヒトの変形性関節炎に似た関節軟骨の変性を起こすことが報告されている (Yang et al., 2001)。また、TGF- $\beta$  の II 型レセプターのドミナントネガティブのレセプターを骨に過剰発現させたトランスジェニックマウスは成長するにつれて関節軟骨で、肥大軟骨細胞の数が増え、関節軟骨が変性し、軟骨の量が減少する。TGF- $\beta$  II 型レセプターのドミナントネガティブのトランスジェニックマウスもまた関節炎と似たような症状が見られる (Serra et al., 1997)。このことから TGF- $\beta$  シグナルは関節軟骨において軟骨細胞を停止させた状態を維持する役目をしていると考えられている。

## 骨格系

脊椎動物の体はほとんどが軟組織で構成されており、それらを支える組織として骨格系組織が存在する。骨格系には骨、軟骨、腱、靭帯などがある。ヒトの骨は約 200 個存在し、多数の骨といくつかの軟骨から構成され、関節によって可動的に連結されている。骨は腱や靭帯で筋肉と骨または骨同士がつながれ、支えられている。

骨は骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞などの細胞とプロテオグリカン、I 型コラーゲンなどの線維成分と無機塩のヒドロキシアパタイトの結晶で構成されている。骨の約 20% はタンパク質、70% はミネラルである。タンパク質の約 90% はコラーゲンで、I 型コラーゲンのほかに V、XI、XII 型コラーゲンが微量に含まれている。プロテオグリカンは軟骨に比べて少量しか含まれていない。骨はカルシウムや他の無機イオンを貯蔵し、体のカルシウムの恒常性の維持に関与している。また、骨内の骨髄では血球の産生が行われている。

軟骨は骨形成の前駆体や耳や鼻などの限られた部分の支持組織となっている。軟骨は軟骨細胞とプロテオグリカン、II 型コラーゲンから構成され、水分が多く含まれている。

プロテオグリカンは糖側鎖としてグリコサミノグリカンを有するタンパク質の総称である。グリコサミノグリカンは 2 糖の繰り返しで長い糖鎖を形成している。プロテオグリカンは骨や軟骨、皮膚、靭帯などの結合組織に豊富に存在している。プロテオグリカンの糖側鎖が軟骨のプロテオグリカンの中でもっとも量が多いものが Aggrecan で軟骨中の約 90% を占めている。ほかには Decorin や Biglycan、Fibromodulin、Versican などがある。プロテオグリカンの合成は TGF- $\beta$  によって促進される (Demoor-Fossard et al., 1998、Burton-Wurster et

al., 2003)。また、Decorin、Biglycan、FibromodulinはTGF- $\beta$ と結合し、TGF- $\beta$ の基質成分を合成する活性を制御していることが示唆されている(Hidebrand et al., 1994)。

## 骨形成

胎生期の骨の発生は膜性骨化と内軟骨性骨化の2つの様式で行われる。膜性骨化は未分化間葉系細胞が直接骨芽細胞に分化する。頭蓋骨、上顎骨、下顎骨、鎖骨の一部は膜性骨化で形成される。一方、内軟骨性骨化では未分化間葉系細胞がまず軟骨細胞へと分化し、その後、骨へと置き換わる。長管骨、椎骨、骨盤及び頭蓋底の骨などは内軟骨性骨化で形成される。膜性骨化と内軟骨性骨化の骨芽細胞の由来が異なり、膜性骨化は神経堤の外胚葉性間葉系細胞由来の骨芽細胞から形成され、内軟骨性骨化は中胚葉性間葉細胞由来の骨芽細胞から形成される。そのために、骨形成が起こる部分によって方法が異なる。出生後の骨の成長は、長軸方向は内軟骨性骨化で、横径の成長は膜性骨化により行なわれる。

内軟骨性骨化の過程を詳しく説明すると、未分化な間葉系細胞が凝集し、軟骨細胞に分化する(図2-A)。軟骨細胞はさらに静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞へと分化する。軟骨細胞はII型コラーゲンやプロテオグリカンなどの基質を豊富に合成する。その後マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)による軟骨基質の分解が起こるとともに、軟骨細胞は肥大軟骨細胞へと分化する(図2-B)。肥大軟骨細胞はX型コラーゲンなどの基質の分泌、石灰化を行い、アポトーシスにより死滅する。この時期に、肥大軟骨細胞層周辺から血管の侵入が起こる(図2-C)。血管侵入によって持ち込まれた骨芽細胞により石灰化した軟骨基質は吸収され新たに骨基質が沈着し、骨への置換が起こる。血管侵入によって、骨幹部に軟骨細胞と骨芽細胞、骨髄が入り混じった骨化中心ができる(一次骨化中心)。出生後、骨端の軟骨部分にも血管侵入が起こり、二次骨化中心ができる(図2-D)。

骨の成長は骨幹と骨端の境界にある成長軟骨板と呼ばれる軟骨層で軟骨の増殖、分化、骨への置換によって伸長する(図2-E)。成長軟骨板は、骨端側から静止軟骨細胞層、増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層から構成されている(図2-E)。骨端から離れるほど細胞の分化が進んでおり、肥大軟骨細胞層から骨へと置換される。静止軟骨、増殖軟骨細胞層はII型コラーゲン、肥大軟骨細胞層はX型コラーゲンが細胞外基質として存在する(図2-E)。成長期を過ぎた長管骨は成長軟骨板が消滅し、最終的に関節表面を覆う関節軟骨を除いて、軟骨組織の



ほとんどは骨にかわる。完成した長管骨は骨端に関節軟骨、骨中にはスポンジ状の海綿骨、それを囲むように基質のつまった緻密骨から形成されている（図2-E）。

骨は骨芽細胞がI型コラーゲンなどの骨基質を生産し、その基質は類骨と呼ばれる未石灰化状態を経て、石灰化し、成熟する。一部の骨芽細胞は、成熟して扁平な骨芽細胞となり、最終的に骨基質に囲まれた骨細胞へと分化する。完成した骨ではリモデリングが起こり、破骨細胞によって吸収された骨基質は骨芽細胞によって新しい骨基質が再生され、絶えず新しい骨に置き換わっている。

関節軟骨はほかの軟骨が分化して骨へと置換されていくのに対し、軟骨の分化が停止した状態で維持される特殊な軟骨で、血管が存在せず、一度損傷を受けると再生の難しい組織である。

## 関節軟骨

ヒトの体には140もの関節があり、その表面は関節軟骨で覆われている。関節軟骨は血管やリンパ管、神経を持たない。軟骨の構成は軟骨細胞と細胞外マトリックスからなり、その構成は水分70%、コラーゲン20%、プロテオグリカン10%からなる。軟骨を構成するコラーゲンはほとんどがII型コラーゲンで、ほかに数種類のコラーゲンが含まれる。軟骨のプロテオグリカンは、コラーゲンの繊維の間を縫うように編み込まれており、軟骨は目の細かい網目状になっている。プロテオグリカンの糖鎖が水分を吸収し、力学的負荷に対しては水分を流動してそのエネルギーを和らげるため、関節軟骨は激しい衝撃にも耐えられる。加齢などにより、関節軟骨の変性などが起こると、力学的負荷に対する衝撃を吸収する力が弱くなり、直接骨へ負荷が伝わり、痛みとなって現れる。

## 関節炎

関節炎には主に次の2つがある。

## 関節リウマチ

関節リウマチは20～40歳代の人が多く発症し、特に女性に患者が多い。関節リウマチのまだ原因は明らかになっていないが、免疫の異常がその一因と考えられている。関節リウマチは関節周囲の滑膜細胞などが炎症を起こし、関節へと浸潤して軟骨を破壊するほか、他の臓器にも障害が起こる全身性の疾患で、炎症が長く続くと、関節や骨が破壊され、手足の変形が起こる。

滑膜細胞の炎症を促進させているのが TNF $\alpha$  などの炎症性のサイトカインで、TNF $\alpha$  は破骨細胞を活性化させ、骨を破壊する。また、リウマトイド因子が IgG と免疫複合体を形成し、それが補体を活性化して組織に傷害を与えると考えられている。

関節リウマチのモデルマウスはいくつか報告されており、アポトーシス誘導因子である Fas 遺伝子の変異により関節リウマチが自然発症する MRL/lpr マウスや SKG マウスがある。また、TNF や IL-1 などの炎症性サイトカインを高発現させたトランスジェニックマウスでも関節炎が起こる。また、II 型コラーゲンや抗 II 型コラーゲン抗体を投与することにより、マウスにリウマチ性の関節炎を誘導することも可能である（村上雅人 2004）。

## 変形性関節症

変形性関節症の主な原因は、加齢による関節軟骨の変性と過度の力学的ストレスを受けることによると考えられている。加齢により関節軟骨のコラーゲンやプロテオグリカンの全体量が減少する。特にプロテオグリカンは加齢により糖鎖の割合が減少し、その糖鎖によって抱え込まれる水分量が減少する。そのため軟骨の弾力性が減少し、力学的負荷を受けて軟骨が破壊されやすくなる。やがて軟骨基質の破壊が表層から進行し、関節炎がひどくなると関節軟骨の破壊が深部へと達する。最近では関節軟骨の変性には軟骨細胞や滑膜細胞が産生する基質分解酵素の働きが関与していることが明らかになっている（藤井克之 et al., 2002）。

## マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)

MMP は骨から軟骨への置換のために軟骨基質の分解に働いている酵素である。MMP は現在までに約 20 種類以上見つかっている (Murphy et al., 2002)。MMP は亜鉛依存性プロテアーゼとして細胞外基質や細胞表面のタンパク質を分解する。MMP は分泌型と細胞膜貫通型が存在し、分解する基質の特異性などから、コラゲナーゼ、ゲラチナーゼ、ストロムライシン、細胞膜貫通型とその他の MMP に分類される（表 1）。分泌型の MMP は前駆体として細胞外へ分泌され、MMP やセリンプロテアーゼなどにより活性化される。

軟骨基質を分解する主な MMP は MMP1, 2, 3, 7, 8, 9, 13 などがある。MMP1 と 8, 13 は繊維性コラーゲンの I, II, II 型コラーゲンを分解し、MMP2 と 9 はコラーゲン分解後に生じたゲラチンや IV 型コラーゲンを分解する (Murphy et

al., 2002)。

MMP13 は成長軟骨板において肥大軟骨細胞や骨芽細胞で発現し、強力な II 型コラーゲンの分解活性を持つ。この遺伝子を欠損したマウスは骨成長期に肥大軟骨細胞層が長く、骨幹の骨化が遅れている。このことから MMP13 は成長期の骨置換に重要な因子であることがわかっている (Inada et al., 2004、Stickens et al., 2004)。また、MMP13 は変形性関節炎で発現量が上昇し、軟骨破壊への強い関与が示唆されている (Mitchell et al., 1996)。

MMP9 は破骨細胞や単球、内皮細胞などで発現している。この遺伝子の欠損マウスも成長軟骨板の肥大軟骨細胞層が長く骨化が遅れている。MMP9 は基質の分解、肥大軟骨細胞のアポトーシス誘導、骨芽細胞の分化誘導をしていることが示唆されている (Vu et al., 1998)。MMP13 と MMP9 のダブルノックアウトマウスは肥大軟骨細胞がさらに長くなるため、この二つの MMP は骨化において協同して未石灰化の肥大軟骨細胞の基質の分解を行い、軟骨から骨への置換、モデリングに相乗的に働いていることが示唆されている (Stickens et al., 2004)。

関節炎でのタンパク分解酵素の働きが関与していることが明らかになっており、MMP3、8、9、13、MT1-MMP などの発現が確認されている (Murphy et al., 2002)。

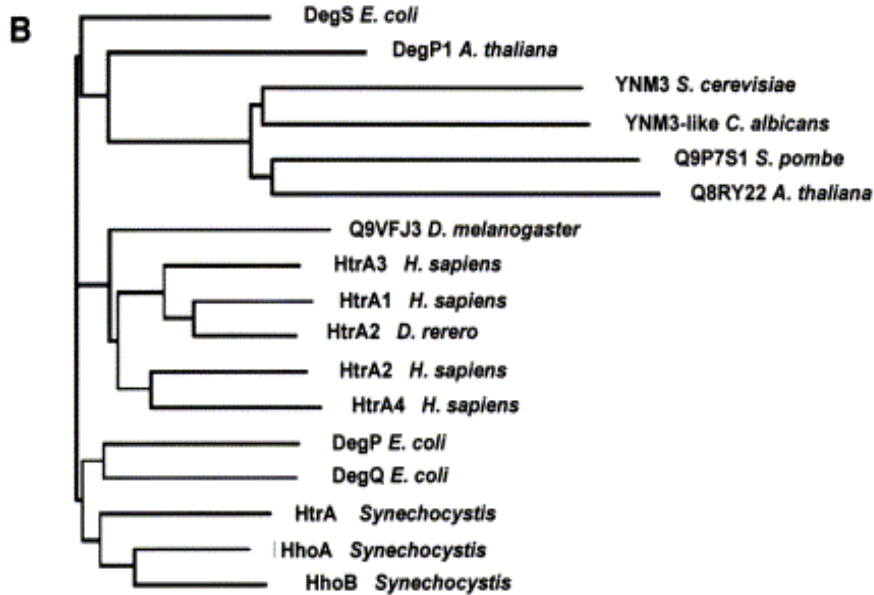
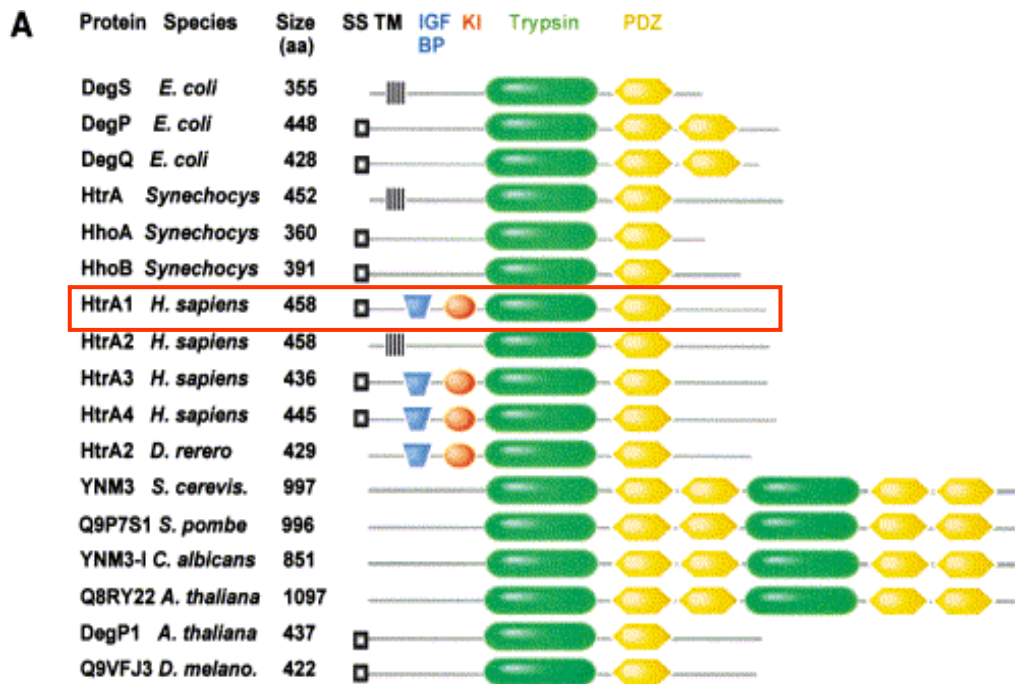
MMP13 を硝子軟骨で過剰発現させたトランスジェニックマウスは関節軟骨でのプロテオグリカンの減少と II 型コラーゲンの分解が見られ、関節軟骨の破壊が起こり、変形性関節炎様の症状が観察された (Neuhold et al., 2001)。このことから、MMP13 の過剰な活性化により関節炎が誘導されることが示唆されている。

また、MMP9 遺伝子欠損マウスに抗 II 型コラーゲン抗体を用いてリウマチ性関節炎を誘導すると、関節炎が起こりにくく、関節軟骨の破壊も穏やかである (Itoh et al., 2002)。これは、MMP9 が軟骨の分解と炎症因子の活性化に働いているためと考えられている。

MT1-MMP の遺伝子欠損マウスは、コラーゲンの分解が起こらないために、関節炎や骨減少症、小人症、線維症などの症状が現れることが分かっている (Holmbeck et al., 1999)。

MMP 欠損や過剰な発現により、骨形成の異常や関節軟骨での異常が見られることから、MMP と骨形成、関節炎は密接に関係していることが明らかである。

HtrA1 が胎生期の骨発生で発現が見られ、ヒトの変形性関節炎での発現の上昇が報告されていることから、本研究では、骨形成や関節炎における HtrA1 の役割を解明するために、①出生後の HtrA1 の発現部位の観察、②関節炎モデルマウスを用いた HtrA1 の発現の変化、③HtrA1 遺伝子欠損マウスの作製と関節炎の誘導、④軟骨や骨で HtrA1 を過剰発現させたマウスの作製を行い、様々な角度から HtrA1 と骨との関係を調べることを試みた。



Clausen et al., 2002

図1 HtrAファミリー

SS: signal peptide, TM: transmembrane segment, IGFBP: insulin growth factor binding domain, KI: kazal protease inhibitor domain,

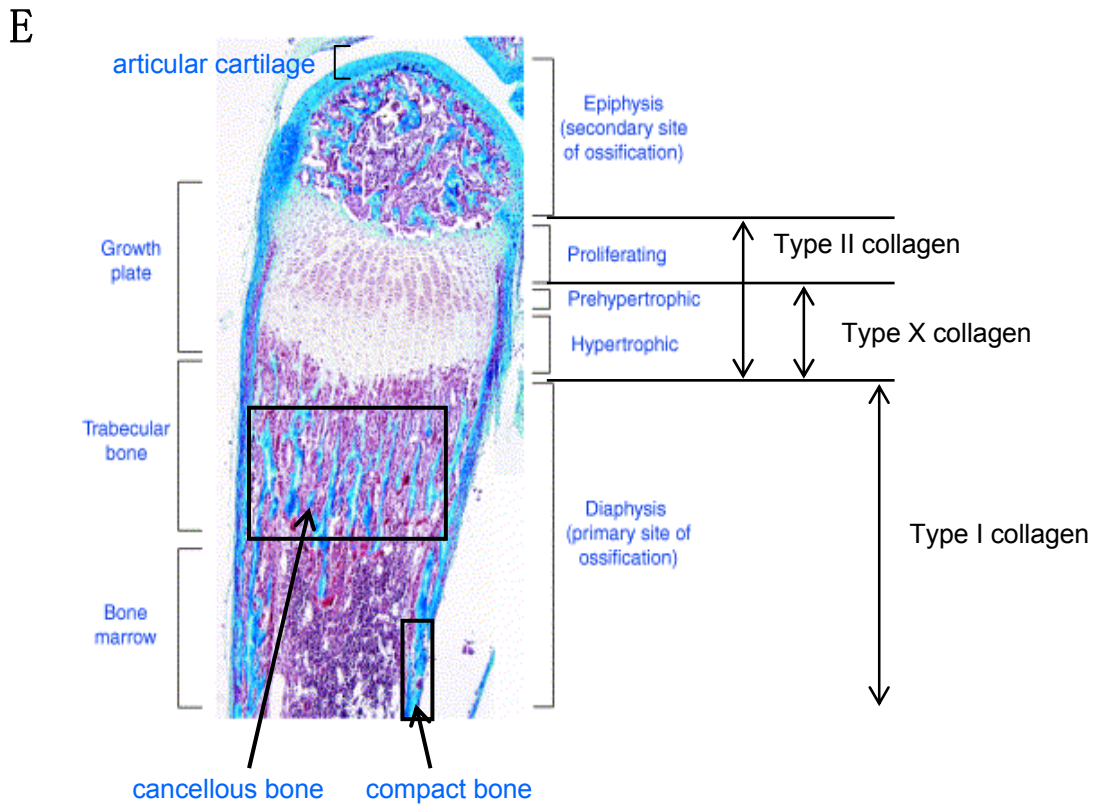
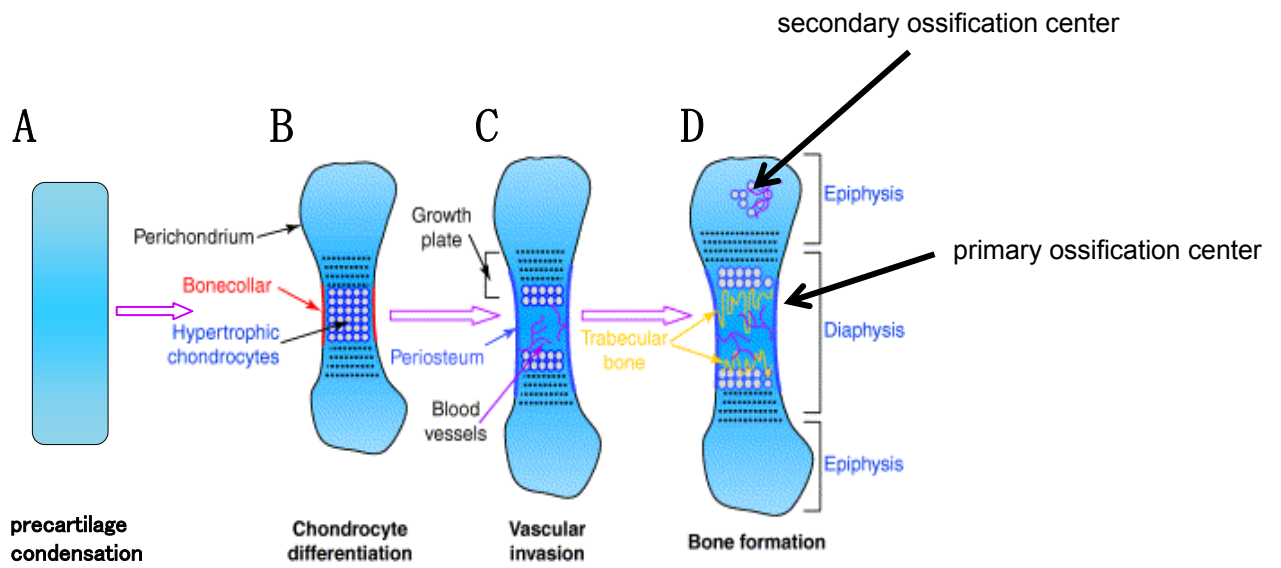


図2 骨形成と骨の構造

a: 内軟骨性骨化による長幹骨の形成、b: 生後2週目のマウスの骨の構造  
ortega et al., 2004

## Matorix metalloproteinases

## Substrates

### Collagenase

Interstitial collagenase

MMP1 (collagenase 1) Type I, II, III, VII, VIII, X collagen, gelatin, aggrecan, versican, proMMP2, proMMP9

Neutropil collagenase

MMP8 (collagenase 2) Type I, II, III, V, VII, VIII, X collagen, gelatin, aggrecan, fibronectin

MMP13 (collagenase 3)

Type I, II, III, IV collagen, gelatin, aggrecan, perlecan, tenascin

### Gelatinase

MMP2 (gelatinase A)

Type I, IV, V, VII, X, XI collagen, gelatin, elastin, fibronectin, aggrecan, versican, ProMMP9, ProMMP13

MMP9 (gelatinase B)

Type III, IV, V, VII, X collagen, gelatin, elastin, aggrecan, versican, fibronectin

### Stromelysin

MMP3 (stromelysin 1)

Type III, IV, IX, X collagen, gelatin, aggrecan, versican, perlecan, fibronectin, laminin, elastin, casein, fibrinogen, proMMP-1, proMMP-7, proMMP8, proMMP9, proMMP13

MMP10 (stromelysin 2)

Type III, IV, V collagen, gelatin, casein, aggrecan, elastin, fibronectin, proMMP1, proMMP8

### Membrane type

MT1-MMP (MMP14)

Type I, II, III collagen, gelatin, casein, elastin, fibronectin, aggrecan, dermatan sulfate proteoglycan, MMP2, MMP13

MT2-MMP (MMP15)

proMMP2, gelatin, fibronectin

MT3-MMP (MMP16)

proMMP-2

### Others

MMP7, MMP11, MMP12, MMP19, MMP20, MMP21, MMP22

---

#### 表1 matrix metalloproteinase (MMP) とその主な基質

MMPは約20種類以上見つかり、基質の違いなどから、コラゲナーゼ群、ゲラチナーゼ群、ストロムライシン群、細胞膜貫通性MMP群、その他の5群に分けられる。(Murphy et al., 2002)

## 材料と方法

### HE 染色、免疫組織化学染色法または in situ hybridization 用切片作製

マウスの膝関節を取りだし、皮をはぎ、筋肉を取り除く。4%PFA/PBS(-) (137 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)に一晩浸ける。脱灰のため 10% EDTA 溶液(10% EDTA-2Na, 100 mM Tris を 1N KOH で pH7.4 にあわせる)に 2~14 日間、4 °C で振盪させながら浸ける。組織の脱水のため 70、80、90%メタノール各 1 回、100%メタノール (モリキュラーシブス [Wako] で脱水処理済) で 3 回、約 12 時間ずつ 4 °C で浸ける。クロロフォルムに 2 時間 3 回、その後、一晩浸ける。70 °C で溶解したパラフィン [Wako、融点: 58~60 °C] に各 2 時間、4 回浸けアルミ箔で作った容器に入れ包埋する。ミクロトームで厚さ 6~7 μm の薄切切片を作製し、MAS コートしたスライドガラス [MATSUNAMI] に伸展する。42 °C で一晩乾燥した後 4 °C で保存した。

### Hematoxylin・Eosin(HE)染色

薄切切片をのせたスライドをキシレンに 5 分間、3 回浸けパラフィンを除く。100%エタノールに 1 分間 2 回、90、80、70%エタノールに各 1 分間浸け水と和する。2 分間流水に浸し、蒸留水に通す。マイヤーのヘマトキシリン溶液 [Wako] で 5 分間染色する。流水下で 15 分間色出し、水洗し、蒸留水に通す。エオジン染色液 (EOSIN Y [nacalai tesque] 0.25 g, 80%エタノール 100 ml, CH<sub>3</sub>COOH 0.5 ml) で 5 分間染色する。70、80、90、100%エタノールで脱水、キシレンで透徹、ENTELLAN [MERCK] で封入する。

### Toluidine Blue 染色

薄切切片をのせたスライドをキシレンにより脱パラフィン、段階希釈したエタノールで水和後、蒸留水で 3 回水洗する。その後、0.05% Toluidine blue 溶液 pH 7.0 (100 mM C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>H<sub>7</sub>・H<sub>2</sub>O 35 ml, 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 165 ml) に 30 分間浸ける。100%エタノールで分別、脱水後、キシレンで透徹し、封入する。



## サフラニン 0 染色

薄切切片をのせたスライドをキシレンにより脱パラフィン、段階希釈したエタノールで水和後、水洗する。ワインゲルトの鉄ヘマトキシリン（1%ヘマトキシリン〔Wako〕/100%エタノールと 1.16% FeCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O, 35% HCl 1 ml を等量混合する）に 1 分間浸け、流水で 5 分間水洗し、分別液（0.25% HCl/70%エタノール）に 5 秒間浸ける。0.02%ファストグリーン水溶液(Wako)に 2 分間浸け、1%酢酸水溶液に 5 秒間浸けて、ファストグリーンを軽く落とす。0.1% サフラニン 0 水溶液〔CHROMA〕10 分間浸け、脱水、透徹、封入する。

## 免疫組織化学染色法 (Toda et al., 1999)

TSA™ Biotin System〔NEN™ Life Science Products〕と VECTASTAIN ABC KIT〔Vector Laboratories〕のキットを用いて TSA-ABC 併用法により行った。スライド上にのせる各液量は、スライド 1 枚につき 100~200 μl である。

抗 HtrA1 抗体、抗 HtrA3 抗体、抗 X 型コラーゲン抗体〔LSL〕はブロッキングに normal goat serum、2 次抗体に biotinyl goat anti-rabbit IgG を用いた。

抗 MMP13 抗体〔CHEMICON〕はブロッキングに normal rabbit serum、2 次抗体に biotinyl rabbit anti-goat IgG〔Jackson〕を用いた。

薄切切片をのせたスライドをキシレンによる脱パラフィン、段階希釈したエタノールで水和する。PBS(-)で 5 分間、3 回、氷上で洗浄する。

抗 X 型コラーゲン抗体の場合、内因性ペルオキシダーゼ酵素を失活させる前に 0.25% Hyaluronidase〔type IV-S, Sigma〕/PBS(-)で 30 分間、37℃で反応させる。

抗 MMP13 抗体の場合、0.24 U/ml chondroitin ABC lyase/PBS (-)〔生化学工業〕で 90 分間、37 °Cで反応させる。

その後、PBS で 5 分間、3 回、氷上で洗浄する。

内因性ペルオキシダーゼ酵素を失活させるため 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100%メタノールに 30 分間、室温で浸す。PBS(-)で 5 分間、3 回、氷上で洗浄する。10% normal serum で、30 分間、室温でブロッキングを行う。各一次抗体抗：HtrA1 抗体、抗 HtrA3 抗体(1/2000)、抗 X 型コラーゲン抗体(1/200)、抗 MMP13 抗体(1/2000)を 1% BSA/PBS(-)で希釈し、一晚、4 °Cで反応させる。PBS(-)で 5 分間、3 回、氷上で洗浄する。2 次抗体(PBS 1 ml, 1% BSA /PBS 500 μl, normal serum 12.5 μl, ビオチン化二次抗体 5 μl)を 40 分間、室温で反応させる。PBS(-)で 5 分間、3 回、氷上で洗浄する。TNB buffer (0.1 M Tris-HCl pH7.5, 0.15 M NaCl, 0.5%

Blocking Reagent [NEN] )で 1 時間、室温でブロッキングする。この間に ABC complex [NEN] (TNB buffer 1 ml, A 液 10  $\mu$ l, B 液 10  $\mu$ l)を作成しておく。ABC complex を 50 分間、室温で反応させる。TNT buffer (0.1 M Tris-HCl pH7.5, 0.15 M NaCl, 0.3% Triton X-100)で 5 分間、3 回、室温で洗浄する。Amplification Dilutant [NEN] で 50 倍希釈した Biotinyl Tyramid [NEN] を 10 分間、室温で反応させる。TNT buffer で 5 分間、3 回、室温で洗浄する。TNB buffer で 100 倍希釈した Streptavidin-Horseradish Peroxidase を 30 分間、室温で反応させる。TNT buffer で 5 分間、3 回、室温で洗浄する。DAB 溶液 (0.5% DAB 150  $\mu$ l, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150  $\mu$ l, 50 mM Tris-HCl pH7.5 1.3 ml)を加え、室温で反応させる。TNT buffer で反応を停止し、ヘマトキシリンによる後染色、透徹、封入を行う。

### Decorin の免疫染色

薄切切片をのせたスライドをキシレンにより脱パラフィン、段階希釈したエタノールで水和後、PBS で 5 分間、氷上で洗浄する。1.25 U/ml chondroitin ABC lyase/0.1 M Tris pH7.2, 0.05 M calcium acetate, 0.01% BSA で 30 分間、37  $^{\circ}$ C で反応させる。PBS (-)で 5 分間、3 回、氷上で洗浄する。0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS で 30 分間、室温でつける。PBS (-)で 5 分間、氷上で洗浄する。20% normal goat serum /PBS (-)で 30 分間、室温で反応させる。抗 Decorin 抗体 (LF103) を 0.1% BSA/PBS (-)で 1/600 に希釈し、4  $^{\circ}$ C で一晩反応させる。0.1% TritonX-100/PBS (-)で 5 分間、3 回、室温で洗浄する。PBS (-)で 100 倍希釈した biotinyl goat anti-rabbit IgG を 30 分間、室温で反応させる。0.1% TritonX-100/PBS (-)で 5 分間、3 回、室温で洗浄する。Vectastain ABC reagent の A 液と B 液 各 1  $\mu$ l を、0.1% Tween 20/PBS (-) 100  $\mu$ l で希釈し、30 分間、室温で反応させる。0.1% TritonX-100/PBS (-)で 5 分間、3 回、室温で洗浄する。DAB で発色させる。ヘマトキシリンで後染色し、脱水、透徹、封入する。

### In situ hybridization (Ohtani et al., 1992, Sasano et al., 1996)

#### プローブ作製

ロシュ・ダイアグノスティックス社の DIG-RNA Labeling Kit を用いて行った。pBluescript II KS+に 1200 bp の *Bam* HI から 1750 bp の *Hinc*II サイトまでをサブクローニングしたプラスミドを用いた。プラスミドをそれぞれセンスプローブは *Sal* I, アンチセンスプローブは *Bam* HI で制限酵素処理する。

H <sub>2</sub> O (RNase free)	12 μl
10×Transcriptional buffer [Roche]	2 μl
DIG-RNA labeling mixture 10×conc. [Roche]	2 μl
Linearized template DNA (1μg/μl) [Roche]	2 μl
RNase inhibitor [Roche]	1 μl (20 U)
RNA polymerase (T3 or T7) [Roche]	1 μl (20~40 U)

上記の試薬を順に加え 1.5 時間、37 °Cで反応させる。DNase (RNase free) を 2 μl 加え、37 °Cで 10 分間反応させる。10 mM Tris HCl pH 7.6/1 mM EDTA 76 μl, 3 M NaOAc 10 μl, 100%エタノール 250 μl を加えて-20 °Cに静置する。15000 rpm、20 分間、4 °Cで遠心する。上清を除去し、70%エタノールを加え、15000 rpm、10 分間、4 °Cで遠心する。上清を除去し、乾燥させる。H<sub>2</sub>O (RNase free) 20 μl, 0.1 M DTT 2 μl, RNase inhibitor 1 μl を加え、-20 °Cで保存する。

*In situ* hybridizationに用いる組織は、固定のときに 0.5% glutaraldehyde 入りの 4% PFA/PBS(-)を用いる。

薄切切片をのせたスライドをキシレンにより脱パラフィン、段階希釈したエタノールで水和後、0.2 N HCl に 20 分間、室温で浸す。PBS で 3 分間、3 回洗浄後、20 μg/ml Proteinase K/PBS(-)で 30 分間、37 °Cで反応させる。PBS(-)で 3 分間、3 回洗浄後、100%エタノールにより脱水する。ハイブリダイゼーションバッファー (50% Formamide, 20 mM Tris-HCl pH8.0, 2.5 mM EDTA, 1 mg/ml tRNA, 1×Denhardt's, 300 mM NaCl, 10% Dextran sulfate) にプローブを加え、90 °C、5 分間処理し、氷中で急冷する。プローブ液をスライドに滴下し、45 °Cで一晩ハイブリダイゼーションする。2×SSC(10×SSC: 1.5 M NaCl, 150mM Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O)で軽く洗浄し、2×SSC/50% Formamide で 1 時間、45 °Cで洗浄する。2×SSC で 3 分間、室温で 2 回、浸透しながら洗浄する。20 μg/ml RNase A/2×SSC で 30 分間、37 °Cで処理する。2×SSC/50% Formamide で 1 時間、45 °Cで洗浄する。1×SSC/50% Formamide で 1 時間、45 °Cで洗浄する。PBS(-)で 5 分間、室温で 3 回洗浄する。0.5%ブロッキングバッファー(0.5% Blocking reagent [Roche] /PBS(-))室温で 20 分間ブロッキングする。0.5% BSA/PBS(-)に Anti-Digoxigenin-AP Fab fragment [Roche] を 500 倍量になるように加え、4 °Cで一晩反応させる。TBS (10 mM Tris-HCl pH9.5, 150 mM NaCl)で 5 分間、3 回、室温で洗浄する。アルカリフォスファターゼバッファー (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>) 5 分間、2 回、室温で洗浄する。アルカリフォスファターゼバッファー 1 ml に NBT (70% *N,N*-Dimethylformamide、75

mg/ml Nitro Blue Tetrazolium) 10  $\mu$ l, BCIP (25 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indlyl phosphate p-toluidine salt/*N,N*-Dimethylformamide) 7.5  $\mu$ l 加え、遮光して発色させる。PBS(-)で発色を停止させる。3.7% formalin/PBS(-)で1時間、室温で固定後、流水で10分間水洗する。0.05% メチルグリーン水溶液 (MERCK) による後染色、透徹、封入を行う。

### 関節炎モデルマウスの作製

関節炎誘導モノクローナル抗体キット〔岩井化学薬品株式会社〕を用いてプロトコールに従って行った。

7週齢のBALB/cマウス(SPFコンディション)の尾静脈内にType II collagenのモノクローナル抗体カクテルを1匹当たり0.5 ml (2 mg)投与する。4日後 LPS 0.1 ml (50  $\mu$ g)を腹腔内に投与する。LPS投与後1~3日後に臨床的関節炎(関節の腫脹)が観察できる。6~13日後に関節部分を取り出す。

LPS投与後からノギスを用いて前足首の幅、後ろ足首の前後、左右、後ろ足の幅を測定した。HtrA1 遺伝子欠損マウスで行なったときは足の厚さも測定した。

### TUNEL 染色

TUNEL-detection kit (TaKaRa)を用いて、プロトコールにしたがって行なった。

膝関節の薄切切片のスライドを脱パラフィン、水和後、15  $\mu$ g/ml proteinase Kで15分間、室温で処理する。その後、PBS(-)で5分間、3回洗浄する。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で5分間、室温で処理し、その後、PBS(-)で5分間、3回洗浄する。deoxynucleotidyl transferase と biotinylated dUTP の入った terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) buffer で90分間、37℃で反応させる。PBS(-)で5分間、3回洗浄する。anti-FITC horseradish peroxidase-conjugated antibodyで30分間、37℃で反応させる。PBS(-)で5分間、3回洗浄する。DABで発色させる。0.05%メチルグリーン〔MERCK〕で後染色後、透徹、封入する。

## 骨からタンパク質抽出

大腿骨と脛骨の関節軟骨を削り取る。組織を抽出バッファー (4 M GuHCl, 50 mM CH<sub>3</sub>COOK pH 5.9, 10 mM EDTA, 5 mM benzamidine-HCl, 100 mM 6-amino-*n*-caproic acid, 0.35 mg/ml Pefabloc-SC (4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl-fluoride, hydrochloride)) で48時間、4 °Cで抽出する (Brandau et al., 2002)。肋骨から軟骨タンパク質を抽出する場合は、20 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100 で2時間、4 °Cで抽出する。その後、0.1 M Tris-HCl/0.1 M NaCl pH 7.3 で透析した。

## Proteolysis assay

pET 28b ベクターに組み込んだ HtrA1 タンパク質は N 末端側 150 アミノ酸を欠損させて Histidine タグを付加させたもの ( $\Delta$ N HtrA1) を大腸菌 BL21 で発現させ、Ni-NTA agarose beads で精製した (Muruwantoko et al., 2004)。関節軟骨と肋骨の軟骨から抽出したタンパク質を 0.05, 0.1, 0.3  $\mu$ g の  $\Delta$ N HtrA1 と 50 mM Tris-HCl pH7.6 を加え全量 20  $\mu$ l で2時間、37 °Cで反応させた。その後、Decorin, Fibromodulin, Aggrecan は最終濃度 0.1 U/ml chondroitinase ABC [protease-free、生化学工業] で2時間、37 °Cで反応させて糖鎖を取り除いた。その後 2 $\times$ SDS buffer (100m M Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, BPB) を加え、95 °Cで3分間加熱し、6~10% SDS-PAGE gel で泳動し、western blotting を行った。

## Western blotting

SDS-PAGE 泳動後、PVDF membrane に 20%メタノール/100 mM Tris/190 mM glycine pH 8.3 のバッファーを用いて 12 V、40 分間トランスファーする。Blocking buffer (5% non-fat dry milk, 50 mM Tris-HCl pH7.6, 1% TritonX-100, 10 mM EDTA) に1時間浸ける。30 mg/ml BSA/TBS で希釈した抗 HtrA1 抗体 (1/1000)、抗 Decorin 抗体 (1/500) (LF-113)、抗 Fibromodulin 抗体 (1/500) (LF-150)、抗 Aggrecan 抗体 (1/800) [Chemicon International]、抗 Type II collagen モノクローナル抗体 (1/200) [Immuno-Biological Laboratory] で 4 °Cで一晩反応させる。Blocking buffer で5分間、室温で3回洗浄する。30 mg/ml BSA/TBS で 1000 倍に希釈した horseradish peroxidase-conjugate anti-rabbit immunoglobulin G [Amersham] を加え、1時間、室温で反応させる。Blocking buffer で5分間、室温で3回洗浄する。TBS (12 mM Tris-HCl pH7.6, 93 mM NaCl)

5 分間、室温で洗浄する。ECL kit [Amersham] を用いて X 線フィルムに感光する。

### HtrA1 遺伝子欠損マウスの作製

HtrA1 遺伝子の単離は、129SV ゲノムライブラリーを用いて、プラークハイブリダイゼーションによって行なった。

### HtrA1 導入 ES 細胞のセレクション

ES 細胞へのターゲティングベクターの導入はエレクトロポレーション法により行なった。エレクトロポレーション後、翌日から G418 (GENETICIN SOLUTION [SIGUMA])、200~400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  入りのメディウムで G418 耐性の細胞をセレクションした。約 10 日間で ES 細胞のコロニーが見える。コロニーを 24 well plate へ移し、ウエルいっぱいになるまで培養する。一部を凍結保存し、残りはゲノム抽出用にグラチンコートしたプレートにまいた。ウエルいっぱいになったところで、ゲノム DNA を抽出し、southern hybridization によりターゲティングベクターの導入を確認した。

### ES 細胞からのゲノム DNA 抽出

グラチンプレートの ES 細胞を PBS 500  $\mu\text{l}$  で洗う。Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.4% SDS) を 500  $\mu\text{l}$  加える。37  $^{\circ}\text{C}$  で 15 分間以上インキュベートする。チューブに移し、Proteinase K (20 mg/ml) を 5  $\mu\text{l}$  加え、55  $^{\circ}\text{C}$  で一晩振盪する。10 mg/ml RNaseA を 1  $\mu\text{l}$  加え、37  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させる。phenol:CIAA を 500  $\mu\text{l}$  加え、15 分間混ぜる。15000 rpm、5 分間遠心し、上清を別のチューブに移す。これを 2 回繰り返す。等量の 2-プロパノール、1/10 倍量の 3 M NaOAc pH 5.2 を加え室温で 10 分間静置する。15000 rpm、30 分間遠心する。70%エタノール 1 ml 加える。15000 rpm、5~10 分間遠心する。軽く 70%エタノールを除く。10 mM Tris-HCl pH8.0 を 100  $\mu\text{l}$  加えて DNA を溶かす。

## Southern hybridization

ゲノム DNA を適当な酵素で制限酵素処理し、サイズマーカーと共に 0.8% アガロースゲル/TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM CH<sub>3</sub>COOH, 1 mM EDTA pH8.0) で電気泳動する。DNA を変性させるためにゲルの 5 倍量の Denaturing buffer (0.5 N NaOH/1.5 M NaCl) で 30 分間振盪した。ゲルを軽く水洗し、次に中和させるために Neutralizing buffer (1 M NH<sub>4</sub>Ac, 0.02 M NaOH) をゲルの 5 倍量の溶液で 30 分間ずつ 2 回振盪した。Neutralizing buffer の入ったトレイにガラス板を渡し、濾紙がトレイの中のバッファーにつかるようにガラス板の上からたらし、バッファーをかけしめらせる。濾紙の上にゲルを表裏逆に置き、バッファーに浸したニトロセルロースメンブレン、濾紙を 2 枚重ねる。更に乾いた濾紙を 2 枚重ね、ペーパータオルの束をのせ、ガラス板の上から重石をゲルに均一に重さがかかるようにのせ、一晩ブロッティングする。翌日、メンブレンにボールペンでコームの位置の印を付け、2×SSC で 5 分間振盪する。軽く水分をとばし、80 °C の真空オーブンで 2 時間または UV cross linker (FUNA-UV-LINKER FS-1500 [フナコシ]) にて固定した。

## ハイブリダイゼーション

固定したメンブレンを 3×SSC に浸す。メンブレンをハイブリボトルへ入れハイブリダイゼーションバッファー (6×SSC, 10 mM EDTA pH8.0, 0.1% SDS, 5×Denhart's solution, 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA) を加え 65 °C、30 分間以上ハイブリオーブンで回転させながらプレハイブリを行う。

## プローブ調整

DNA プローブ 25~50 ng を蒸留水と合わせて 16 µl を 1.5 ml チューブに入れ、95 °C で 5 分間加熱し変性させ氷中に置く。1×OLB (5×OLB: 0.1 mM dATP, dTTP, dGTP, 0.18% β-mercaptoethanol, 250 mM Tris-HCl pH8.0, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM HEPES pH6.6, OD260 5.4 U/ml pd(N)6random oligmer), 0.4 mg/ml BSA, <sup>32</sup>P-α CTP 25 µCi, 2.5 U Klenow を加え、蒸留水であわせて 50 µl にする。37 °C で 30 分間インキュベートする。反応液に 100 mg/ml denatured salmon sperm DNA 10 µl を加え TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) で 100 µl に合わせる。SephadexG-50 カラムに入れ、1500 rpm、4 分間遠心して精製した。新しいチューブにプローブ液を移し、95 °C で 5 分間加熱し変性させ氷中に置く。

プレハイブリダイゼーションの終了したハイブリダイゼーションバッファーにプローブ液を入れる。65 °C で 16~24 時間ゆっくり回転させながらハイブリダイゼーションする。

翌日、1×SSC/1% SDS で 65 °C、20 分間回転させながらメンブレンの洗浄を行う。X 線フィルムに-80 °Cで一晩感光し、自動現像機で現像する。

## RNA 抽出

脳、約 0.25 g を 15 ml チューブに入れ ISOGEN [Wako] を 2.5 ml 加え、ホモジナイズする。5 分間、室温で静置する。1 ml ずつ、1.5 ml チューブに移し、クロロフォルムを 200  $\mu$ l 加え、15 秒間よく振盪させる。2、3 分間室温で静置し、12000 rpm、10 分間、4 °C で遠心する。上清を新しいチューブに移し、2-プロパノールを 500  $\mu$ l 加える。5~10 分間、室温で静置し、12000 rpm、10 分間、4 °C で遠心する。70%エタノールを 500  $\mu$ l 加え、攪拌する。7500 rpm、5 分間、4 °C で遠心する。軽く乾燥させ、DEPC 処理した蒸留水 8  $\mu$ l を加え、溶かす。

## Northern hybridization

### サンプル調整

RNA 20  $\mu$ g、10×MOPS buffer (200 mM MOPS、50 mM CH<sub>3</sub>COONa、10 mM EDTA-2Na) 2  $\mu$ l、formaldehyde 4  $\mu$ l、formamide 10  $\mu$ l を合わせて 20  $\mu$ l に調整する。65 °C で 15 分間処理後、氷中で急冷後、loading buffer (50% Glycerol, 0.4% Xylencyanol, 0.4% Bromophenol blue) を 2  $\mu$ l 加える。

1% agarose/660 mM formaldehyde、1×MOPS buffer のゲルで、1×MOPS buffer を用いて 50 V で泳動する。エチジウムブロマイドに浸け、泳動の確認をする。DEPC 処理した蒸留水で 30 分間、2 回、振盪しながら洗浄する。その後、Gene Screen Plus membrane (NEN Research Products) に 10×SSC (DEPC 処理) で一晩トランスファーする。トランスファー後、2×SSPE (360 mM NaCl, 20 mM NaPO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 7.7) で洗浄し、UV cross linker で固定した。

プローブは southern hybridization と同様にラベリングした。

固定したメンブレンを 3×SSC に浸す。メンブレンをハイブリボトルへ入れハイブリ液 (5×SSPE, 50% formamide, 0.5% SDS, 5×Denhart's solution, 200  $\mu$ g/ml denatured salmon sperm DNA) を加え 42 °C、2 時間以上ハイブリオーブンを回転させながらプレハイブリを行う。ハイブリ液にプローブ液を入れ、42 °C で 16~24 時間ゆっくり回転させながらハイブリする。

2×SSC/0.1% SDS で 65 °C、15 分間、さらに 1×SSC/0.1% SDS で 65 °C、15 分間を 2 回、回転させながらメンブレンの洗浄を行う。X 線フィルムに-80 °C



で2時間～一晩感光する。

### マウスの尾からのゲノム DNA 抽出

マウスの尾を1 cm 切り、Tail buffer (50 mM Tris pH 7.6、100 mM NaCl、100 mM EDTA、1% SDS)を600  $\mu$ l と20mg/ml Proteinase K を5  $\mu$ l 加え、55  $^{\circ}$ Cで一晩浸透しながら溶かす。10 mg/ml RNase を1  $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる。phenol:CIAA を600  $\mu$ l 加え、15分間回転させながら混ぜる。15000 rpm、5分間、室温で遠心し、上清を新しいチューブに移す。これを2回繰り返す。2-プロパノールを600  $\mu$ l 加え、10分間、室温で静置する。15000 rpm、30分間、室温で遠心する。70%エタノールを1 ml 加え、15000 rpm、5分間遠心する。軽く乾燥させ、TEを100  $\mu$ l 加えて溶かす。100倍希釈してPCRに用いる。

### II 型コラーゲンのプロモーターの下流で HtrA1 を軟骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス (ColIII-HtrA1 TG) の作製

I 型コラーゲンのプロモーターとエンハンサーを持つトランスジェニックマウス作製用プラスミドと、II 型コラーゲンのプロモーターを持つトランスジェニックマウス作製のプラスミドは大阪大学 医学部の小森先生からいただいた。

### I 型コラーゲンのプロモーターの下流で HtrA1 を骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス (ColI-HtrA1 TG) の作製

II 型コラーゲンプロモーターは pNASS (CLONTECH) の中に  $\alpha$ 1 Type II collagen のプロモーター (1940-2971 nt) とエンハンサー (4930-5571 nt) を持つ (Ueta et al., 2001)。

I 型コラーゲンプロモーターは骨で発現させるために特異的なプロモーター領域を使用している。pNASS (CLONTECH) の中に pro- $\alpha$  (1) collagen の 2310 bp 上流のからのプロモーターを持つ (Liu et al., 2001, Rossert et al., 1995)。

**HtrA1 遺伝子欠損マウス、Type I collagen promoter-HtrA1, Type II collagen promoter-HtrA1 トランスジェニックマウスの genotyping PCR**

ロシュ・ダイアグノスティックス社の Faststart taq DNA polymerase の試薬と home made Taq を用いて行った。

反応条件とプライマーの組み合わせは以下のとおりに行なった。

**HtrA1 遺伝子欠損マウス genotyping PCR**

primer

S86F 5' -ACGCTCCTGTCTTTGCTACT-3'

S85R 5' -AACTGGATGCCTAGAACAAC-3'

b-geo screening 5' -AATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTT-3'

S84R 5' -TGTGCACGCCGTCGTACTGT-3'

**S86F-S85R**

95°C 4 min, 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 1 sec, 72°C 7 min, 4°C ∞,  
35cycle

**b-geo screening-S84R**

94°C 5 min, 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 sec, 72°C 7 min, 4°C ∞,  
35cycle

**ColIII-HtrA1 TG と ColI-HtrA1 TG マウスの genotyping PCR**

primer

MS8F 5' -CGCTTATCAAGATTGACCACC-3'

MS8R 5' -TTGATGACATCGCTGACG-3'

**MS8F-MS8R**

95°C 4 min, 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 1 sec, 72°C 7 min, 4°C ∞,  
35cycle

第 1 章  
骨形成における HtrA1 の発現解析

## 結果

現在までに我々は、*in situ hybridization*により、胎児における骨発生期の *HtrA1* の発現部位を調べた (Oka et al., 2004)。胎生期 *HtrA1* は四肢や体幹の軟骨細胞に分化する間葉系細胞には発現が見られず、その周辺や同じ間葉系細胞から分化する腱や靭帯などで発現が見られる。これらの領域では TGF- $\beta$  が未分化間葉系細胞を軟骨細胞へと分化誘導している。このことから、*HtrA1* は TGF- $\beta$  シグナルを阻害して、軟骨細胞への分化を抑制し、腱や靭帯への分化誘導することが示唆されている (Oka et al., 2004)。

また、*HtrA1* はヒトの変形性関節炎患者の関節軟骨で発現量が上昇することが報告されている (Hu et al., 1998)。

*HtrA1* が骨発生時や、関節軟骨の異常時に特徴的な発現を示すことから、*HtrA1* が軟骨や骨でどのような働きをしているのか探るために、マウスを用いて軟骨や骨における *HtrA1* の発現部位を観察した。

骨の形成には内軟骨性骨化で形成される長管骨と膜性骨化で形成される頭蓋骨や顎の骨がある。

まず、内軟骨性骨化によって形成される長管骨の脛骨と大腿骨における *HtrA1* の発現を免疫組織化学染色法 (免疫染色) と *in situ hybridization* によって調べた。

### 内軟骨性骨化

出生直後、軟骨細胞のみで形成されている長管骨の骨端は、次のようにして骨へと置換される。骨端に凝集している軟骨細胞は肥大軟骨細胞へ分化して、アポトーシスを起こし、軟骨基質はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) によって分解される。この時期に軟骨凝集部の中央部へ向けて血管が侵入して骨芽細胞などが運ばれる。骨芽細胞によって産生された骨基質は石灰化して骨を形成する。骨端で骨化が起こる部分を二次骨化中心と呼ぶ。

### 軟骨から骨への移行時期における *HtrA1* の発現

生後 0 日目の脛骨の骨端部はまだ骨化が始まっておらず、軟骨細胞のみで形成されている (図 1-1A)。この時期、骨端の軟骨部分で *HtrA1*

タンパク質は全く見られない (図 1-1B、D、F)。免疫染色によって観察される HtrA1 タンパク質のシグナルは弱く、HtrA1 タンパク質の蓄積が少ないことが分かる。HtrA1 タンパク質は靱帯 (図 1-1B、D、矢印)、関節包 (図 1-1B、D、矢頭)、軟骨膜 (図 1-1F、矢印)、緻密骨の骨基質に見られる (図 1-1F、矢頭)。

生後 6 日目ごろになると骨端の軟骨細胞凝集部に血管が侵入する。血管は管状の canal の中を通して軟骨凝集部の中心へと侵入する (図 1-2E、白棒)。Canal には血管のほか、骨芽細胞や破骨細胞が存在し、canal はそれらを軟骨凝集部へと運ぶ役割をしている。HtrA1 タンパク質は、canal の側面の再吸収層に蓄積している (図 1-2A、B、矢印)。再吸収層は軟骨基質が活発に分解されている領域である (Lee et al., 2001)。ここでは、軟骨基質分解酵素の MMP13 などが活発に働いていることが分かっている (Lee et al., 2001, Davoli et al., 2001)。MMP13 タンパク質は canal の先端に蓄積していた (図 1-2C、D、矢印)。

MMP13 は軟骨の主成分である II 型コラーゲンを分解する活性を持つコラゲナーゼである。生後 6 日目で、MMP13 は canal の先端で、HtrA1 は側面にタンパク質が蓄積していた。このことは canal が形成される際、まず、MMP13 が先に軟骨基質の II 型コラーゲンを分解し、その後、HtrA1 がその他の基質成分を分解していると示唆される。HtrA1 は軟骨基質成分を分解することが分かっており、そのことに関しては後述する。

生後 9 日目ごろから骨端の軟骨凝集部に軟骨細胞と骨芽細胞、血液成分が混在する二次骨化中心が形成される (図 1-3B、棒)。HtrA1 タンパク質は大腿骨骨端の二次骨化中心領域に多く蓄積している (図 1-3A、矢印)。拡大すると、HE 染色によって濃いピンク色に染色される canal の再吸収層に (図 1-3D、矢印)、HtrA1 タンパク質は蓄積していた (図 1-3C、矢印)。特に、骨化の進んでいる側の再吸収層に HtrA1 タンパク質は蓄積していた (図 1-3C、矢印)。また、HtrA1 タンパク質は、二次骨化中心の骨化領域と接する肥大軟骨細胞周辺に見られる (図 1-3C、矢頭)。HtrA1 タンパク質が周囲に蓄積している肥大軟骨細胞の中には、細胞の中に骨芽細胞などが侵入して、肥大軟骨細胞が壊れ始めているものもあった。

二次骨化中心で軟骨基質が骨へと置き換わるとき MMP13 が軟骨基質を分解する (Davoli et al., 2001)。二次骨化中心での HtrA1 と MMP13

タンパク質はともに肥大軟骨細胞周辺に見られるが(図 1-3E、F、矢頭)、HtrA1 タンパク質のほうがより広い領域に存在していた(図 1-3E、矢頭)。canal の再吸収層に関してはほぼ同じ部分に蓄積が見られた(図 1-3F、矢印)。

HtrA1 mRNA は二次骨化中心周囲の肥大軟骨細胞にシグナルが見られる(図 1-4A、矢頭)。一方、HtrA1 タンパク質は二次骨化中心周囲の肥大軟骨細胞周辺に見られる(図 1-4C、矢頭)。HtrA1 mRNA やタンパク質が発現している部分に肥大軟骨細胞のマーカーの X 型コラーゲンタンパク質が存在することから(図 1-4D、矢頭)、HtrA1 mRNA は肥大軟骨細胞から分泌され、その周辺の基質にタンパク質が蓄積していることが確認できた。

9 週齢の成体マウスになると、長管骨は関節軟骨と成長軟骨板を残して骨へと置き換わる。骨端において、HtrA1 タンパク質は関節軟骨深層の肥大軟骨細胞で観察されるが(図 1-5C、矢印)、その他の関節軟骨層には HtrA1 タンパク質は見られない(図 1-5C)。

成長軟骨板では、肥大軟骨マーカーの X 型コラーゲンの免疫染色(図 1-6D) との比較から HtrA1 タンパク質は増殖軟骨細胞層などには見られず(図 1-6C)、肥大軟骨細胞層の最も骨側の骨髄や骨基質と接している領域に蓄積していることが分かった(図 1-6C、矢印)。また、MMP13 タンパク質も増殖軟骨細胞等では見られず、肥大軟骨細胞の骨髄側に存在していた(図 1-6E、矢印)。

HtrA1 と MMP13 タンパク質は二次骨化中心では類似した場所に存在していた。このことと HtrA1 が軟骨基質成分を分解することから(後述)、軟骨から骨への移行時期に HtrA1 は MMP13 とともにプロテアーゼとして軟骨基質の分解に機能している可能性が示唆された。

## 骨における HtrA1 の発現

生後 9 日目の海綿骨は骨基質の産生を活発に行う立方状の骨芽細胞に取り囲まれている (図 1-7C)。HtrA1 mRNA は骨基質の周囲にぎっしりと並んでいる細胞ではなく、骨面に密着するように存在している、成熟した扁平な骨芽細胞に発現している (図 1-7B、矢印)。また、骨基質に存在する骨細胞にも *HtrA1* は発現している (図 1-7B、矢頭)。HtrA1 タンパク質は骨の縁の部分に蓄積し (図 1-7D、矢印)、MMP13 タンパク質も同様の部分に蓄積している (図 1-7E、矢印)。

骨幹の緻密骨では骨細胞に HtrA1 mRNA のシグナルが見られ (図 1-8C、矢頭)、タンパク質は骨基質や骨細胞周辺に見られた (図 1-8D、矢頭)。HtrA1 は緻密骨の骨髄側に線状に並んで活発に骨基質を産生している立方状の骨芽細胞には発現していない (図 1-8B、C、矢印)。

9 週齢の成体マウスでは、HtrA1 タンパク質は骨基質全体に蓄積し、そのシグナルも生後 0 日目や 9 日目よりも強く、多くの HtrA1 タンパク質が蓄積されていることが分かる (図 1-5C、1-6C、1-9C)。海綿骨において、類骨と呼ばれる骨芽細胞から産生されたばかりの石灰化していない骨基質は HE 染色によって濃いピンク色に染まる (図 1-6B、矢頭)。HtrA1 タンパク質はその類骨に多く蓄積している (図 1-6C、矢頭)。類骨は骨細胞の周りにも存在し (図 1-6B、アスタリスク)、その部分でも HtrA1 タンパク質が蓄積していた (図 1-6C、アスタリスク)。MMP13 タンパク質も HtrA1 同様に、骨基質の類骨部分に蓄積していた (図 1-6E、矢頭)。

骨幹の緻密骨でも骨基質全体に HtrA1 タンパク質が見られ、特に骨の骨髄側の骨基質 (図 1-9C、矢印) や骨細胞周辺 (図 1-9C、矢頭) に多く蓄積していた。

MMP13 は軟骨成分の II 型コラーゲンだけでなく、骨の主成分である I 型コラーゲンも分解する活性を持つコラーゲナーゼであり、骨での MMP13 は成熟した扁平な骨芽細胞や骨細胞で発現し、骨基質を分解して、骨基質の代謝を行っていることが報告されている (Sasano et al., 2002)。HtrA1 は骨でも MMP13 と類似した発現パターンを示すことから、骨基質を分解して骨代謝に機能している可能性が示唆された。

## 膜性骨化

頭蓋骨や下顎骨は膜性骨化により形成され、軟骨から骨へと置き換わる内軟骨性骨化と異なり、未分化間葉系細胞が直接骨芽細胞に分化して骨形成する。ここでは膜性骨化によって形成される下顎骨や頭蓋骨での *HtrA1* の発現を調べた。

生後 2 日目のマウスの下顎骨と頭蓋骨の *in situ hybridization* と免疫染色を行った。骨基質の周りは活発に骨基質を産生する立方状の骨芽細胞が骨基質を取り囲むように存在する (図 1-10A、矢印) (Sasano et al., 2002)。 *in situ hybridization* の結果により、 *HtrA1* mRNA は骨の表面で活発に働く立方状の骨芽細胞ではなく、骨の表面で骨基質に埋もれ始めている成熟した扁平な骨芽細胞が発現していた (図 1-10B、矢印)。また、骨基質中の骨細胞も *HtrA1* を発現していた (図 1-10B、矢頭)。 *HtrA1* タンパク質は、下顎骨や頭蓋骨の骨基質全体に見られた (図 1-10D、F、矢印)。成熟した骨芽細胞や未熟な骨芽細胞が *HtrA1* mRNA を発現し、骨基質にタンパク質が蓄積されると考えられる。

下顎骨に唯一存在する軟骨組織のメッケル軟骨で *HtrA1* mRNA は発現し (図 1-11C)、タンパク質が蓄積している (図 1-11D)。メッケル軟骨は成長すると退化するが、後方は耳小骨のキヌタ骨とツチ骨となる。

長管骨でも下顎骨でも *HtrA1* タンパク質は骨基質に蓄積している。骨基質は破骨細胞の骨吸収と骨芽細胞の骨形成により維持されている。  $TGF-\beta$  は破骨細胞による骨吸収を抑制し、骨形成を促進する。 *MMP13* は扁平な骨芽細胞や骨細胞で発現し、骨基質を分解して、骨基質の代謝を行なっていると考えられている。 *HtrA1* が  $TGF-\beta$  シグナルを阻害する働きを持ち、 *MMP13* の発現パターンと類似している。骨での *HtrA1* の機能は  $TGF-\beta$  シグナルの調整役として、また、骨基質の分解酵素として骨の恒常性維持に働いていると考えられた。



## 考察

今回、骨形成における HtrA1 の発現様式を調べ、MMP13 と比較することで、HtrA1 が軟骨から骨への移行時期に軟骨基質の分解を行ない、骨芽細胞による骨基質の産生の場の準備をしていること、また、HtrA1 が骨のリモデリングのために骨基質の分解をしていることが示唆された。

### 軟骨における HtrA1 の働き

HtrA1 は生後も長管骨の骨端の軟骨凝集部や、成長軟骨板の静止軟骨細胞や増殖軟骨細胞、関節軟骨には発現していなかった（図 1-1、2、3、5、6）。

HtrA1 タンパク質は生後 6 日目に骨端軟骨に侵入する canal の側面に蓄積していた（図 1-2）。また、MMP13 タンパク質は canal の先端に蓄積していた。生後 9 日目では MMP13 も HtrA1 タンパク質同様に canal を取り囲む再吸収層に蓄積していた（図 1-3）。軟骨凝集部には血管がなく、その凝集部に血管が侵入することにより軟骨を吸収する破骨細胞や破軟骨細胞、骨基質を産生する骨芽細胞が運ばれ、軟骨から骨へと置換が行なわれる。canal は血管を軟骨凝集部へと運ぶ通路である。その canal が軟骨に侵入するためには、軟骨基質の分解が必要であり、それを行なうのが MMP である。

MMP13 は軟骨の主成分である II 型コラーゲンや骨の主成分である I 型コラーゲンを基質として分解するコラゲナーゼである (Murphy et al., 2002)。MMP13 の遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べ、胎生期の肥大軟骨細胞層が長く、軟骨凝集部への血管侵入が遅れ、そのために骨化中心の形成が遅れている。その原因は、MMP13 遺伝子欠損マウスは、軟骨基質の II 型コラーゲンの分解ができないため、軟骨層に血管侵入ができず、骨芽細胞などが運ばれないためだと考えられている (Inada et al., 2004、Stickens et al., 2004)。

Canal の先端や周囲に蓄積している MMP13 の働きは軟骨成分である II 型コラーゲンを分解して canal を軟骨凝集部の中心へと侵入させることである (Davoli et al., 2001)。後述するが、HtrA1 も軟骨の成分であるプロテオグリカンや可溶性の II 型コラーゲンを分解することが分かっている（図 2-7）。軟骨は II 型コラーゲンにヒアルロン酸を通して複数のプロテオグリカンが結合した網目構造をしている。HtrA1 は

MMP13 よりも多くの軟骨成分を分解できるが、コラゲナーゼ活性はないと考えられる。そのことから、軟骨凝集部へ canal が侵入し始めたときに、まず、MMP13 が軟骨の骨格を形成している II 型コラーゲンを分解し、その後、残ったプロテオグリカンなどを HtrA1 が分解していると考えられる。

生後 9 日目の骨端で、HtrA1 タンパク質は二次骨化中心の周辺にある肥大軟骨細胞の周囲にも蓄積していた。(図 1-3、4)。このときの MMP13 タンパク質は HtrA1 と同様に肥大軟骨細胞の周囲に見られるが、HtrA1 のほうがより広い領域に蓄積していた(図 1-3)。HtrA1 は多様な軟骨成分を分解することから、軟骨から骨への置換のための肥大軟骨細胞周辺の軟骨基質の分解に活発に働いていると示唆される。

生後 9 週目の成体マウスでは関節軟骨の浅層や中間層には HtrA1 タンパク質は見られないが、深層の肥大軟骨細胞周囲には HtrA1 タンパク質の蓄積が見られた(図 1-5)。また、成長軟骨板では肥大軟骨細胞の骨により近い部分に HtrA1 タンパク質も MMP13 タンパク質も蓄積していた(図 1-6)。HtrA1 が成長軟骨板の肥大軟骨細胞層に現れるのは成体マウスになってからである。MMP13 の遺伝子欠損マウスでは成長後はほぼ正常な成長軟骨板を形成することから、成長軟骨板の形成初期には MMP が軟骨基質の分解に働き、成長した後は MMP13 と共に HtrA1 が働いている基質の分解を行なっている可能性が示唆される。

HtrA1 は下顎骨のメッケル軟骨で発現し、タンパク質が蓄積していた。メッケル軟骨は成長するにつれ、退化していく。HtrA1 はこの軟骨の分解にも関与していることが示唆される。

## 骨における HtrA1 の発現

生後 0 日目の骨基質での HtrA1 の蓄積量は少ない (図 1-1)。生後 9 日目の海綿骨において *HtrA1* は成熟した扁平な骨芽細胞から分泌され、タンパク質は骨の周囲に蓄積していた (図 1-7)。9 週齢の海綿骨では石灰化していない類骨に多くの HtrA1 タンパク質が蓄積していた。生後 9 日目、9 週齢のマウスでの MMP13 タンパク質は HtrA1 タンパク質と同様部分に蓄積していた (図 1-6、7)。

生後 9 日目の緻密骨において *HtrA1* は骨細胞による発現が確認された (図 1-8)。HtrA1 タンパク質は、生後 9 日目と 9 週齢の緻密骨の骨細胞周囲や骨基質にタンパク質の蓄積が見られた (図 1-8、9)。海綿骨、緻密骨ともに活発に働く立方状の骨芽細胞には発現していなかった。

生後 2 日目の頭蓋骨、下顎骨でも扁平な骨芽細胞や骨細胞が HtrA1 を発現し、タンパク質は骨基質全体に蓄積していた (図 1-10、11)。

骨は絶えず破骨細胞による再吸収、骨芽細胞による骨形成が行なわれ、新しい骨に交換されている。骨芽細胞から分泌された骨基質はすぐに石灰化されずしばらくは未石灰化骨基質の類骨と呼ばれる状態にあり、その後石灰化される。通常骨には I 型コラーゲンなどの有機基質の類骨がその表面を覆っており、類骨を除去しなければ破骨細胞はその下にあるミネラル分に富んだ骨の吸収ができない。その類骨を分解する酵素として MMP やカテプシン K が知られている。海綿骨は軟骨から骨へと置換されるとすぐに緻密骨に吸収されるため、海綿骨の長さは常に一定に保たれている。この海綿骨の類骨に多くの HtrA1 が蓄積している。MMP13 も同様の部分に蓄積し、I 型コラーゲンを分解する。HtrA1 は類骨で、MMP と同様に破骨細胞の骨吸収の準備のために類骨を分解し、骨の代謝に機能していると示唆される。

TGF- $\beta$  は、骨基質中に貯蔵され、破骨細胞による骨吸収が起こった際に放出され、TGF- $\beta$  は骨芽細胞の分化、増殖に促進的に作用し、I 型コラーゲンの分泌を促進し、類骨を形成させる。破骨細胞には抑制的に働き、骨の維持の調整役として働いている (Hill et al., 1998)。HtrA1 は TGF- $\beta$  のシグナル活性を阻害し (Oka et al., 2004)、長管骨や頭蓋骨、下顎骨で骨基質に HtrA1 タンパク質の蓄積が見られる。それらことから、HtrA1 は TGF- $\beta$  の調節を行なって、I 型コラーゲンなどの分泌の調整や骨の代謝に働いていることが示唆される。

脱灰をしない骨の免疫染色を行なうと、HtrA1 タンパク質の染色性が

落ちる。これは、骨基質中で、HtrA1 がカルシウムに覆われて存在しているため、脱灰により HtrA1 を囲んでいるカルシウム分を取り除くことで HtrA1 タンパク質が露出し、抗体と結合しやすくなる可能性が考えられる。HtrA1 は石灰化されていない類骨での染色性が特に強いのは HtrA1 がカルシウム分に覆われていないためかもしれない。HtrA1 は骨の代謝に備え、骨基質中でカルシウムに囲まれて存在しているの

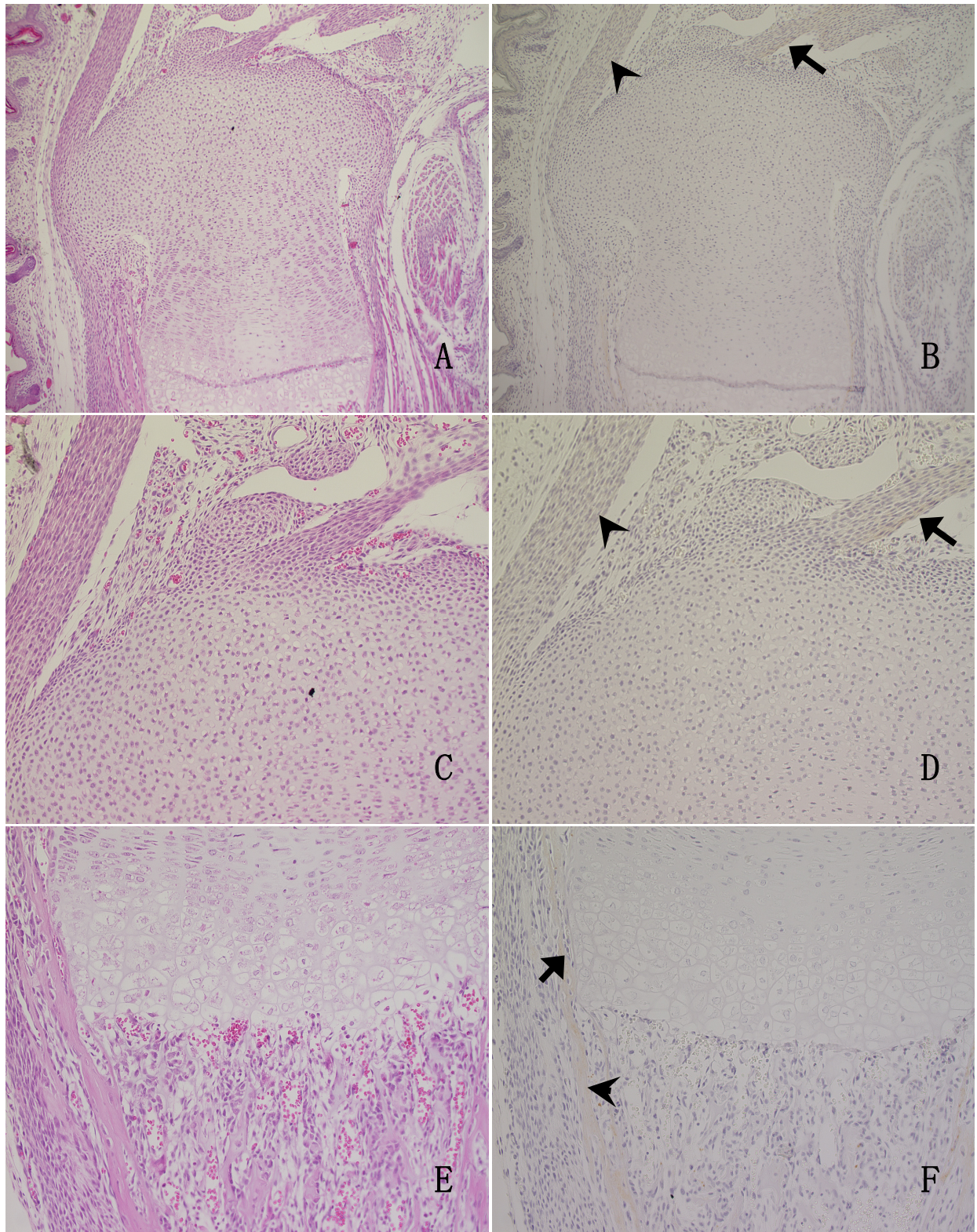


図1-1 生後0日目の頸骨の骨端部のHtrA1タンパク質の発現部位

A, C, E: HE染色、B, D, F: 抗HtrA1抗体による免疫染色

靭帯(B, D、矢印)や関節包(B, D、矢頭)にHtrA1タンパク質が見られるが、骨端の軟骨にはHtrA1タンパク質は見られない(B, D, F)。軟骨膜(F、矢印)と緻密骨(F、矢頭)にHtrAタンパク質が存在する。

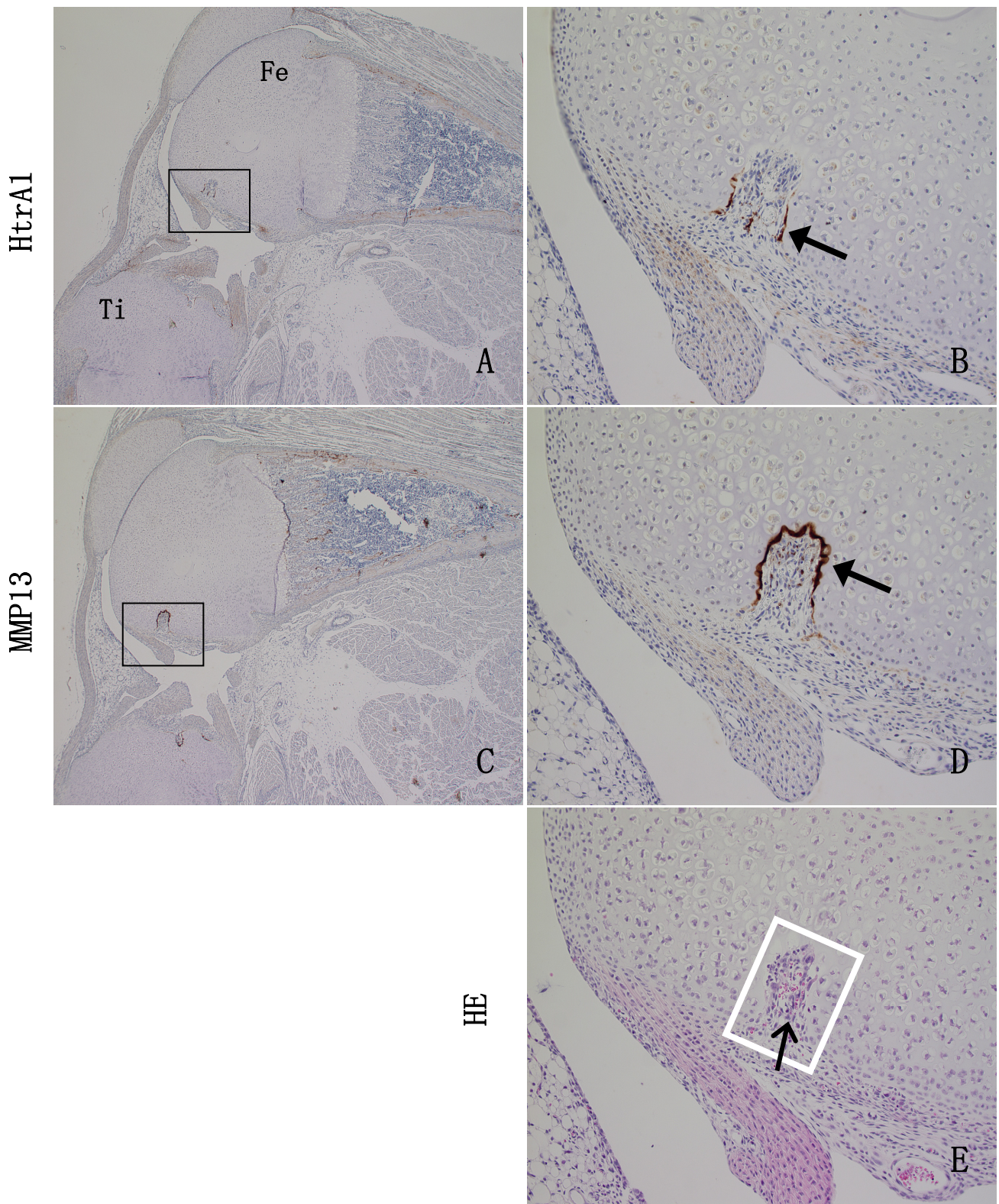


図1-2 生後6日目の大腿骨の骨端部のHtrA1タンパク質の蓄積部位

A, B: 抗HtrA1抗体による免疫染色、C, D: 抗MMP13抗体による免疫染色、E: HE染色、Ti; 脛骨、Fe; 大腿骨  
 B, DはA, Cの拡大図、Eの白枠は血管侵入によって形成されたcanal。矢印のほうへ侵入していく。  
 生後6日目ごろから骨端の軟骨にcanalが現れ、それと共に血管が侵入し、軟骨から骨への置換が始まる (E、  
 白枠)。HtrA1タンパク質は血管侵入のためにできたcanalの側面に蓄積しているが (B、矢印)、MMP13は  
 canalの先端にタンパク質が蓄積している (D、矢印)。

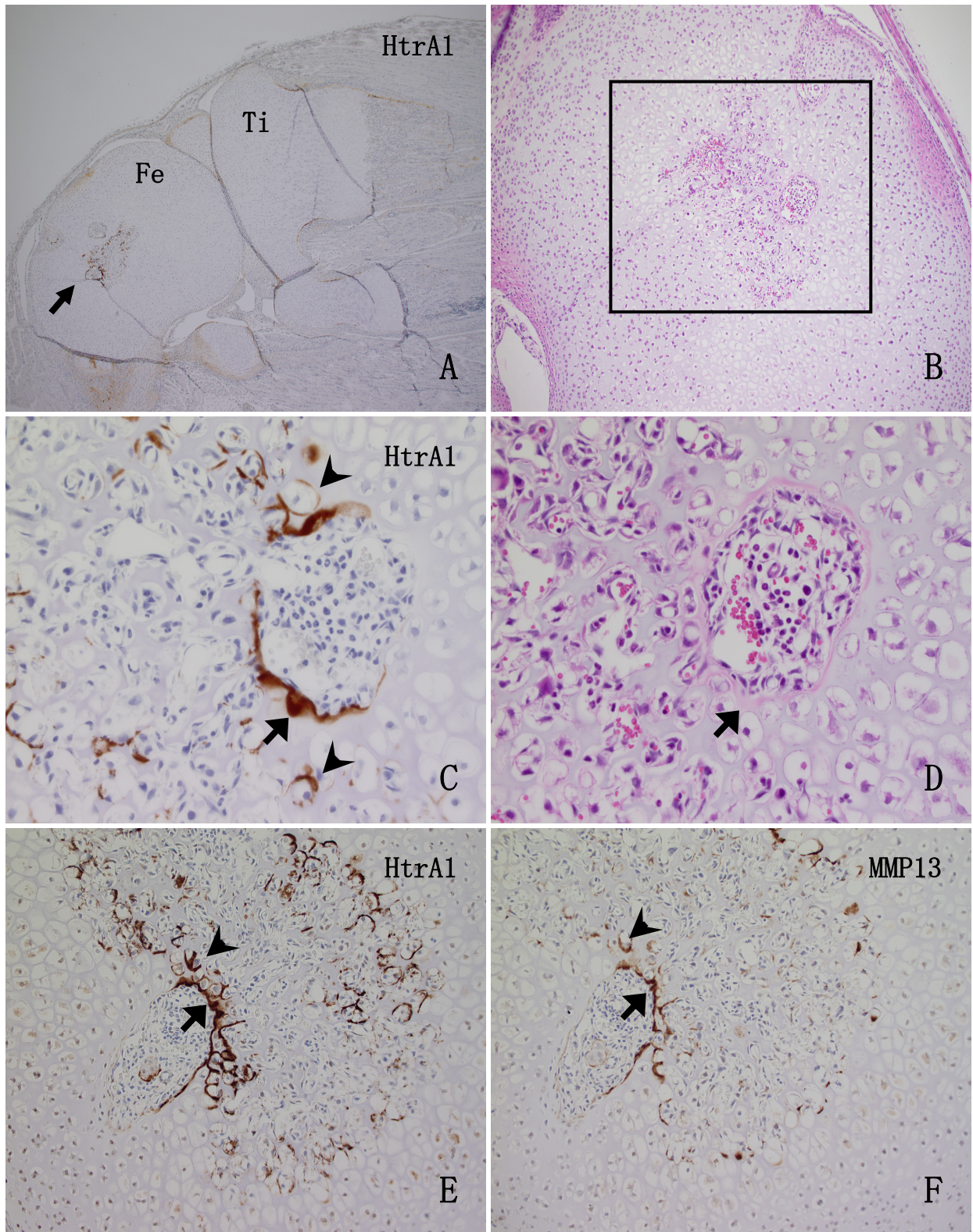


図1-3 生後9日目の大腿骨骨端部のHtrA1タンパク質とMMP13タンパク質の蓄積部位

A, C, E: 抗HtrA抗体による免疫染色、B, D: HE染色、F: 抗MMP13抗体による免疫染色、

Ti; 脛骨、Fe; 大腿骨

HE染色によって濃いピンク色の部分 (D、矢印) は軟骨の基質が分解されている部分(再吸収層)である。

HtrA1タンパク質は再吸収層部分 (C、矢印) と肥大軟骨細胞周辺 (C、矢頭) に見られる。

MMP13タンパク質はHtrA1タンパク質と類似して肥大軟骨細胞周辺 (E, F、矢頭) や再吸収層 (E, F、矢印) に見られる。

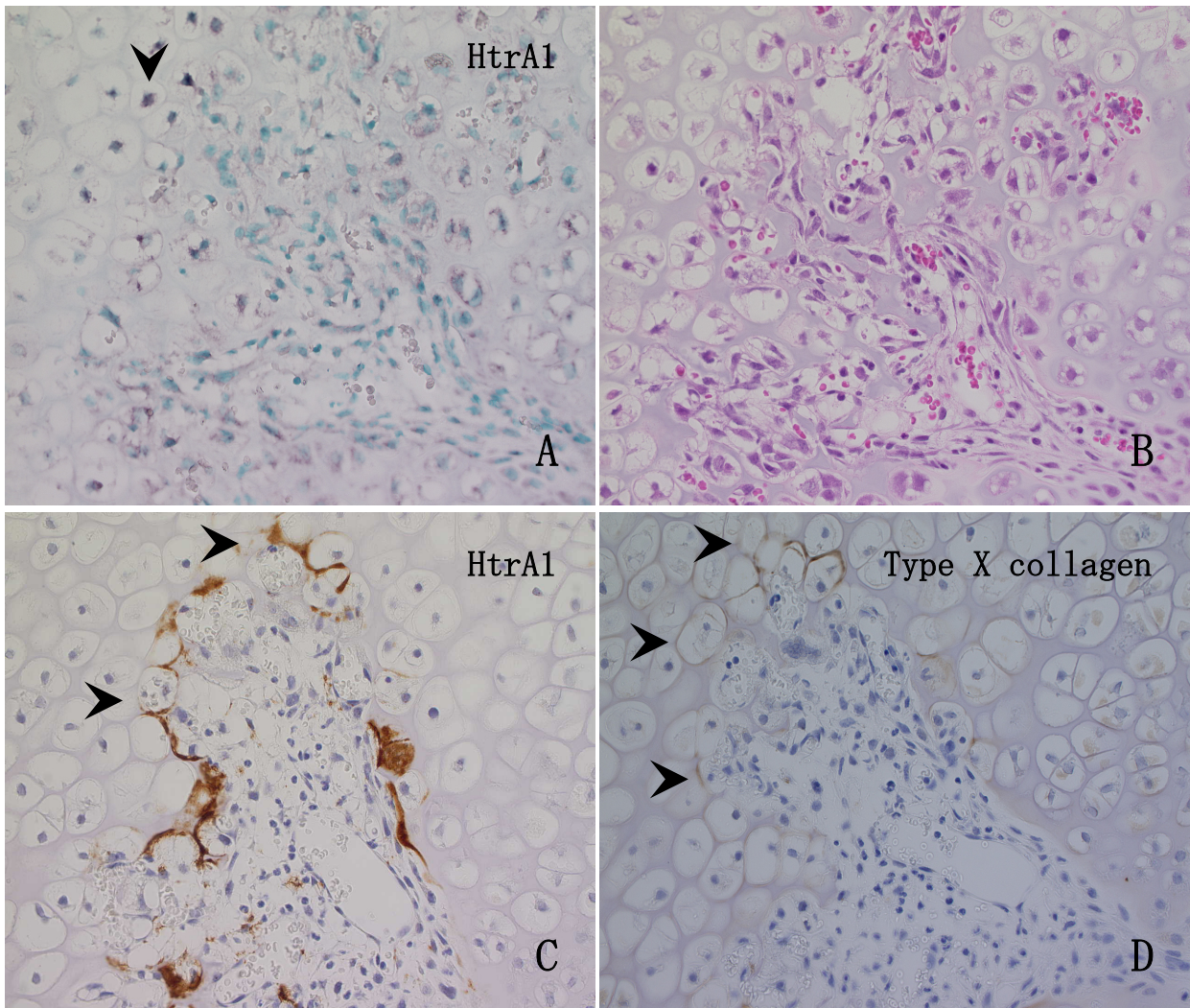


図1-4 生後9日目の骨端部の二次骨化中心におけるHtrA1mRNAとタンパク質の存在部位

A: HtrA1のin situ hybridization、 B: HE染色、 C: 抗HtrA1抗体による免疫染色、 D: 抗X型コラーゲン抗体による免疫染色

抗X型コラーゲン抗体によって染色されている肥大軟骨細胞 (D、矢頭) と同様な細胞にHtrA1 mRNAのシグナルが見られる (A、矢頭)。HtrA1タンパク質は二次骨化中心周辺と肥大軟骨細胞周辺に蓄積している (C、矢頭)。



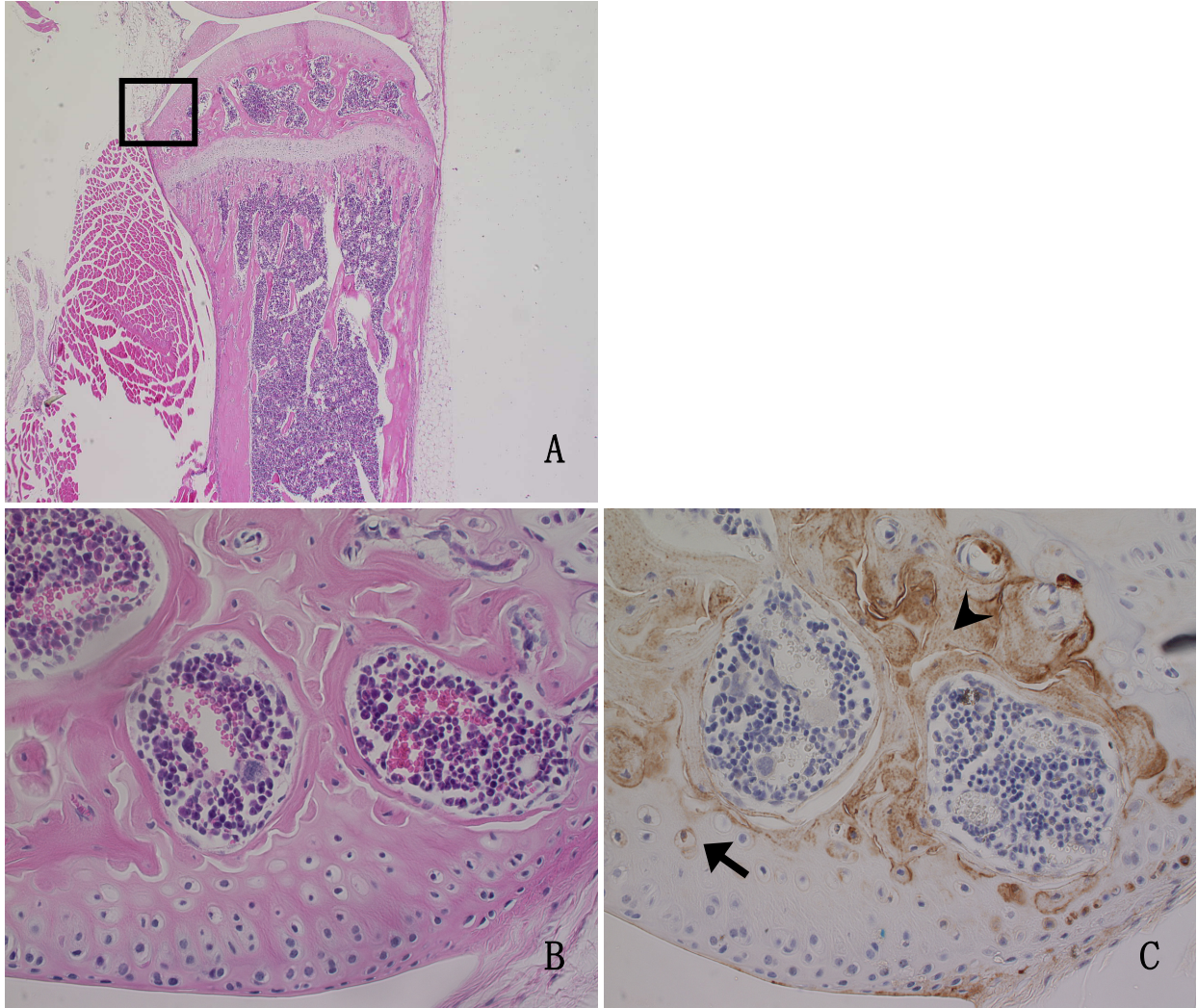


図1-5 成体マウスの関節軟骨におけるHtrA1タンパク質の存在部位

A: 脛骨の全体像、B, C: 関節軟骨部分の拡大図、A, B: HE染色、C: 抗HtrA1抗体による免疫染色  
 関節軟骨深部の肥大軟骨細胞周辺 (C、矢印) と骨基質にタンパク質の蓄積が見られる。

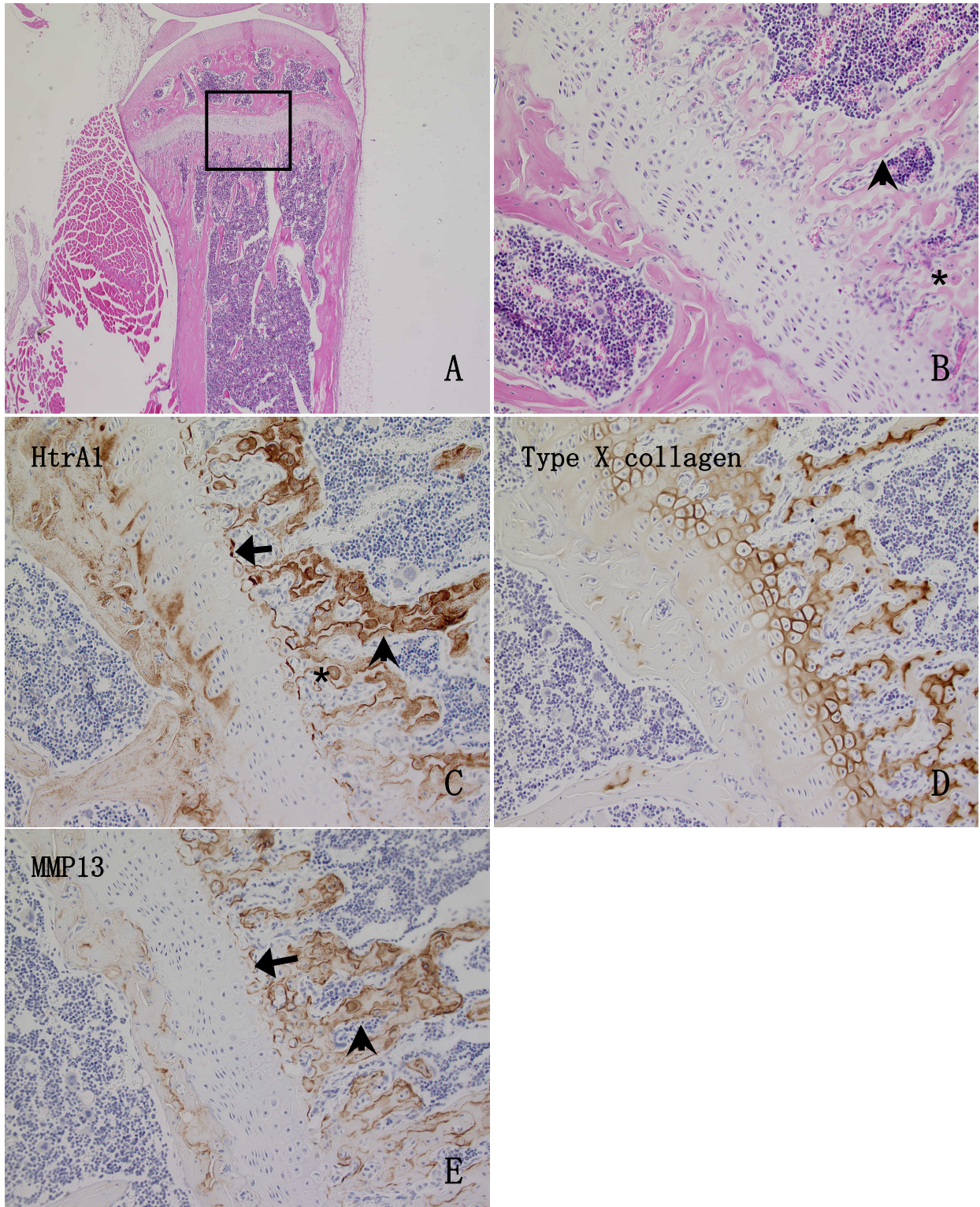


図1-6 成体マウスの脛骨の成長軟骨板におけるHtrA1タンパク質の存在部位

A: 脛骨全体像、B, C, D, E: 成長軟骨板部分の拡大図、A, B: HE染色、C: 抗HtrA1抗体による免疫染色、D: 抗X型コラーゲン抗体による免疫染色、E: 抗MMP13抗体による免疫染色

肥大軟骨細胞層と骨髄との境目 (C、矢印) や類骨と呼ばれる未石灰化の骨基質 (B, C、矢頭)、骨細胞周辺 (B, C、アスタリスク) にHtrA1タンパク質が見られる。肥大軟骨細胞が抗X型コラーゲン抗体で染色される (D)。HtrA1とX型コラーゲンを比較すると、HtrA1タンパク質は、肥大軟骨細胞層の最も骨側に存在することが分かる。MMP13タンパク質はHtrA1タンパク質の存在場所と類似して、肥大軟骨細胞層の骨側 (E、矢印) や類骨に存在する (E、矢頭)。

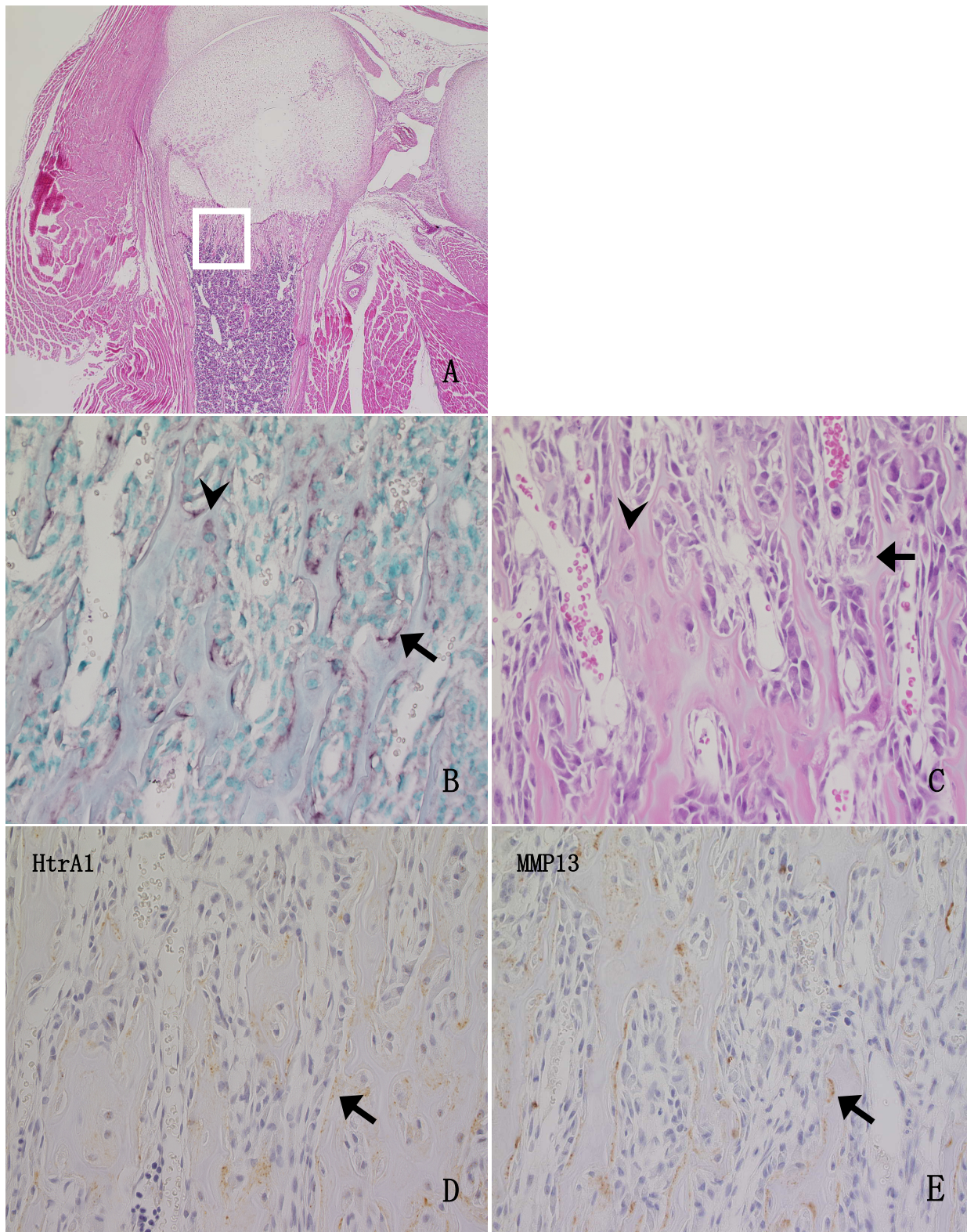


図1-7 生後9日目の海綿骨におけるHtrA1 mRNAとタンパク質の存在部位

A: 大腿骨全体像、B, C, D, E: Aの白枠の海綿骨部分の拡大図

A, C: HE染色、B: HtrA1によるin situ hybridization、D: 抗HtrA抗体による免疫染色、E: 抗MMP13抗体による免疫染色

海綿骨でHtrA1 mRNAは成熟した骨芽細胞 (B、矢印) や骨基質に埋もれた骨細胞 (B、矢頭) に発現している。HtrA1タンパク質は骨基質周辺に見られ (D、矢印)、MMP13タンパク質も同様に骨基質周辺にみられる (E、矢印)。

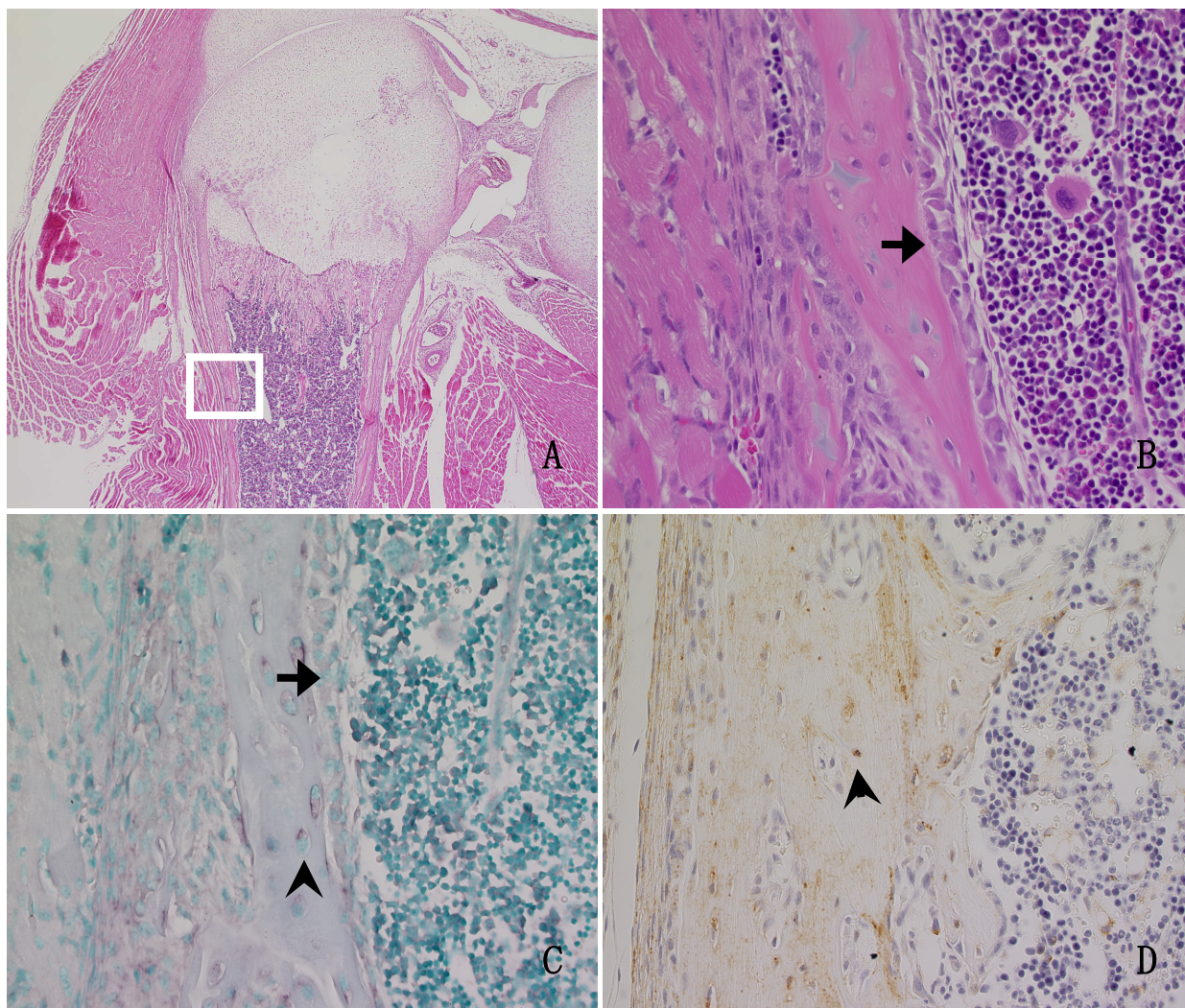


図1-8 生後9日目の緻密骨におけるHtrA1タンパク質とmRNAの発現部位

A: 大腿骨全体像、B, C, D: Aの白枠の緻密骨部分の拡大図

A, B: HE染色、B: HtrA1によるin situ hybridization、D: 抗HtrA抗体による免疫染色、緻密骨でHtrA1 mRNAは骨細胞 (C、矢頭) が発現している。骨髄と接している部分の骨基質に線状にならび、活発に骨基質を産生している立方状の骨芽細胞 (B, C、矢印) にはHtrA1 mRNAの発現は見られない。HtrA1タンパク質は骨細胞の周辺 (D、矢頭) や骨基質に見られる(D)。

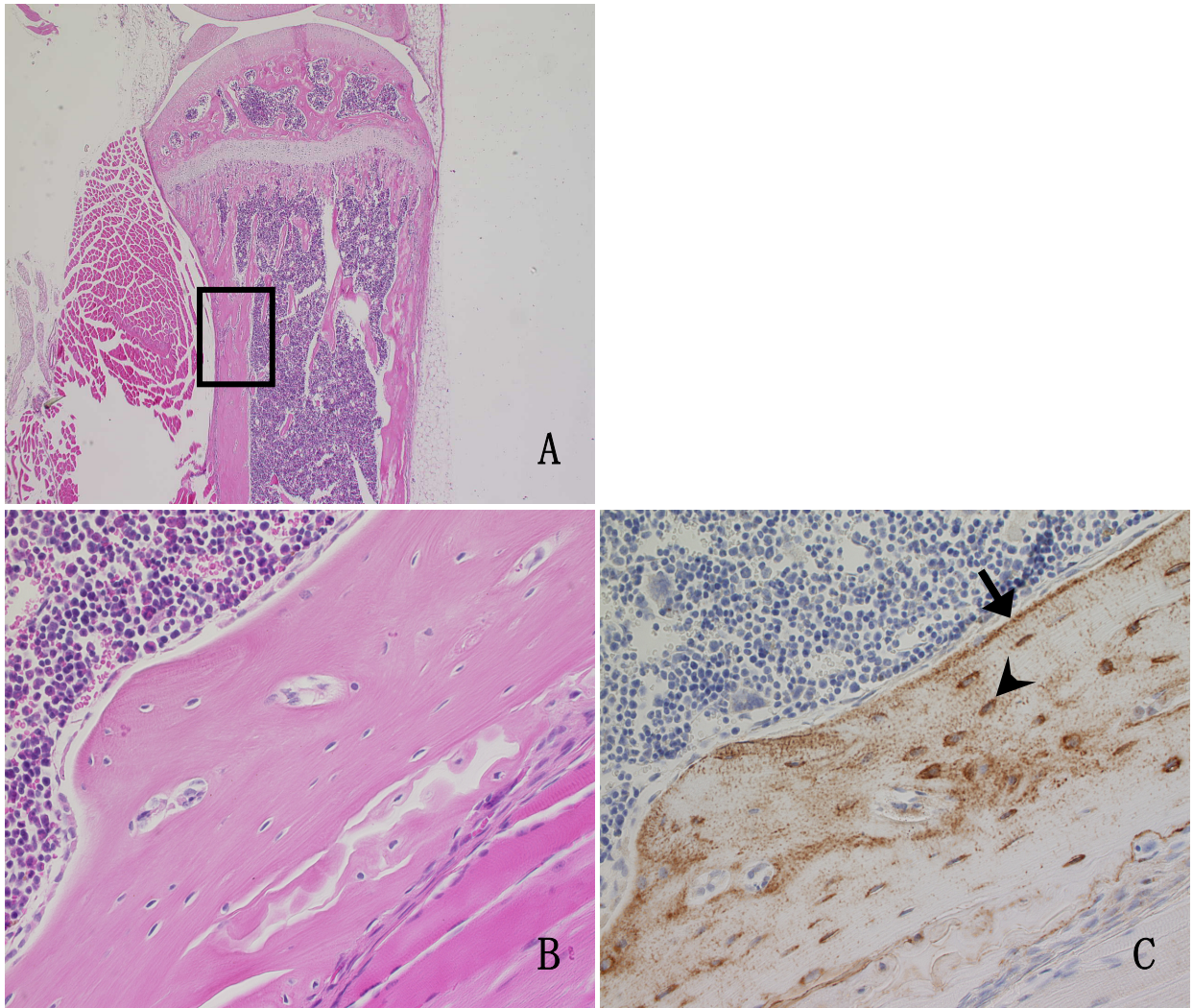


図1-9 成体マウスの脛骨の緻密骨におけるHtrA1タンパク質の存在部位  
 A: 脛骨の全体像、B, C: 緻密骨の拡大図、A, B: HE染色、C: 抗HtrA1抗体による免疫染色  
 骨髄沿いの骨基質 (C、矢印) と骨細胞周辺 (C、矢頭) に特に強く、骨基質全体にHtrA1タンパク質が見られる。

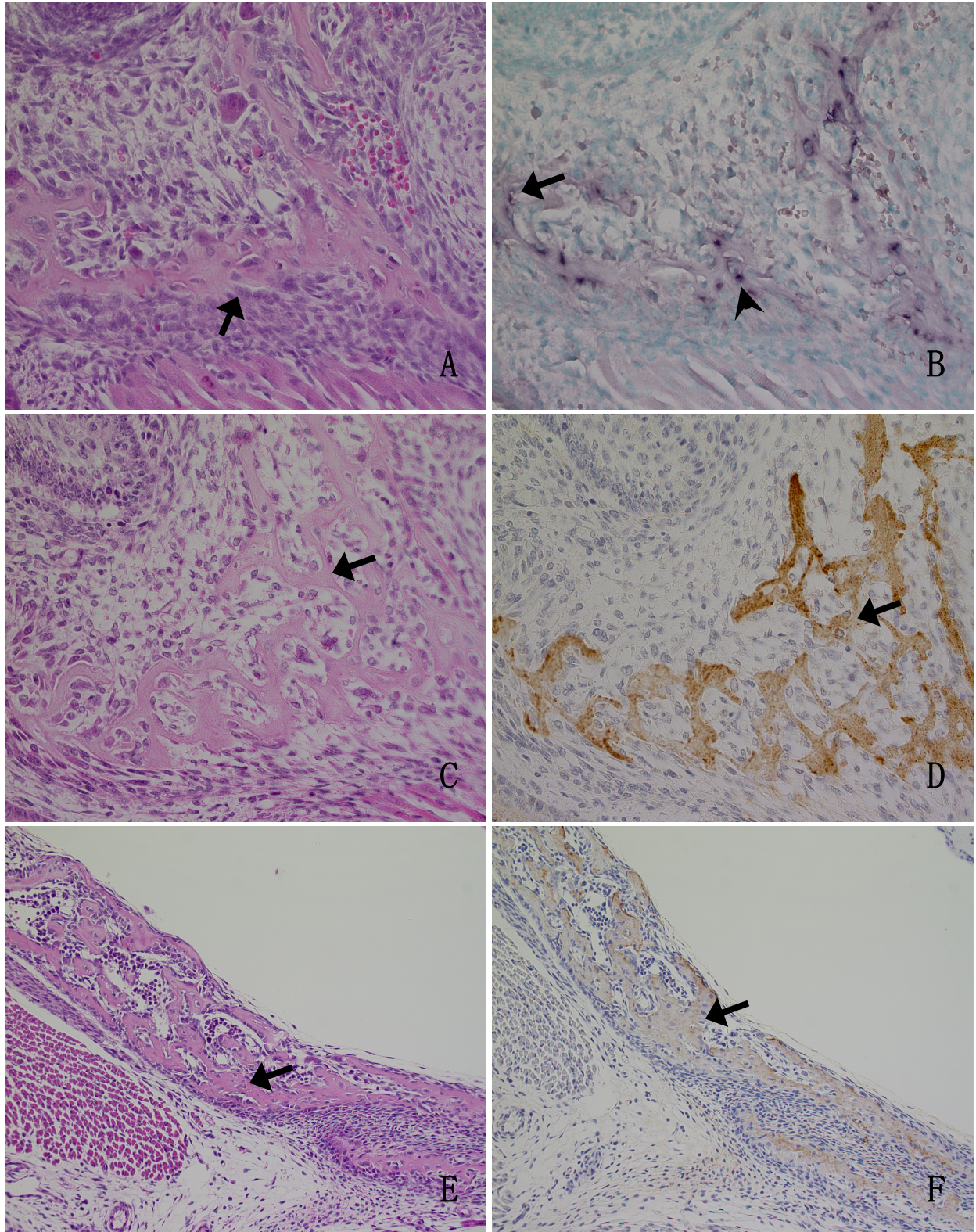


図1-10 生後2日目の下顎骨と頭蓋骨でのHtrA1 mRNAとタンパク質の存在部位

A, B, C, D: 下顎骨、E, D: 頭蓋骨

A, C, E: HE染色、B: HtrA1のin situ hybridization、D, F: 抗HtrA1抗体による免疫染色

下顎骨では成熟した骨芽細胞(B、矢印)や骨細胞(B、矢頭)で発現が見られる。HtrA1 mRNAは線状に並んで、立方状の活発に働いている骨芽細胞には発現が見られない(A、矢印)。

下顎骨や頭蓋骨の骨基質全体にHtrA1タンパク質が多く見られる(C, F、矢印)。

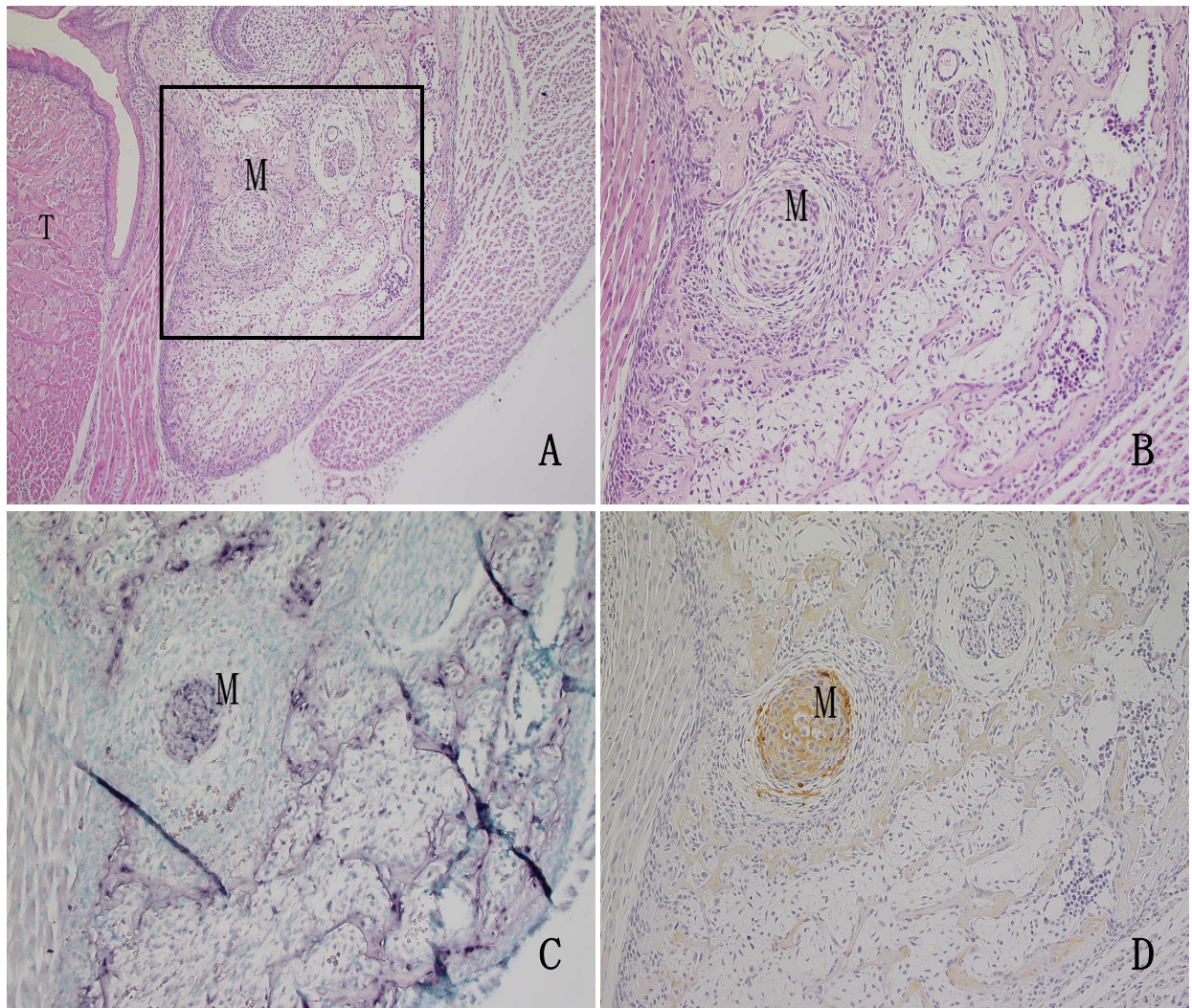


図1-11 生後2日目の下顎骨におけるHtrA1 mRNAとタンパク質の存在部位  
 A, B: HE染色、C: HtrA1のin situ hybridization、D: 抗HtrA1抗体による免疫染色  
 B, C, D: メッケル軟骨部分の拡大図、M: メッケル軟骨、T: 舌  
 下顎骨に唯一存在する軟骨組織のメッケル軟骨にHtrA1 mRNA (C)、タンパク質は存在する(D)。

## 第 2 章 関節炎モデルマウスを用いた HtrA1 の機能解析



## 結果

ヒトの HtrA1 は変形性関節炎の関節軟骨において、mRNA レベルで約 7 倍に発現が上昇することが報告されている (Hu et al., 1998)。そこで、関節炎での HtrA1 の機能を調べるために関節炎モデルマウスを用いて解析を行った。

関節炎マウスは、関節炎誘導用の抗 II 型コラーゲン抗体カクテルを使用して作製した。LPS に感受性のある BALB/c、7 週齢の雌の SPF コンディションマウスの尾静脈に抗 II 型コラーゲンモノクローナル抗体のカクテル 2 mg と 4 日後に腹腔内に炎症のレベルを上げるために、LPS (lipopolysaccharide) 50  $\mu$ g を投与して免疫反応により関節炎を発症させ、リウマチ性関節炎モデルマウスを作製した。

### 関節炎の誘導確認

#### スコア

関節炎誘導によっておこる手足の腫れにより、関節炎のレベルを示した。この関節炎マウスは LPS 投与後に腫れが見られることから、LPS 投与前と後の両前足首の前後の幅、両後ろ足首の前後、左右の幅、かかと部分の幅の計 8 ヶ所をノギスで測定した。関節炎のスコアは LPS 投与前を 1 としたときの比を各部分で出し、すべてを足して測定箇所数の 8 で割って数値を出した (図 2-1A)。抗 II 型コラーゲン抗体投与後、あまり変化は見られないが (図 2-1B、C)、LPS 投与後、3 日目から後ろ足のかかと部分や前足首で腫れが目立ち (図 2-1A、D、矢印)、9 日目ごろには前後足の指でも腫れが見られた (図 2-1E、矢印)。腫れのピークは 9 日目で、その後、腫れがひいていった (図 2-1A)。

### 関節炎による Decorin と HtrA1 タンパク質の発現量の変化

正常と LPS 投与後 6、9、13 日目の関節軟骨からタンパク質を抽出して、HtrA1 の発現量を定量した。関節炎で発現が上昇することが報告されている軟骨成分であるプロテオグリカンの Decorin は (Dourado et al., 1996)、9 日目ごろから発現量が上昇する (図 2-2)。HtrA1 タンパク質は 9 日目に最も発現量が高く、正常マウスの約 4.6 倍上昇した (図

2-2)。13 日目にはやや発現量が減ることもわかった。一方、HtrA3 タンパク質は関節炎であまり発現が上昇しないことがわかっている (Jiraporn et al., 2004)。HtrA1 タンパク質の発現量の変化は関節の腫れのレベル増加と一致していた (図 2-1A、2-2)。

### 関節炎の関節軟骨でのアポトーシス細胞の変化

関節炎の関節軟骨では関節炎の進行に伴って、アポトーシスがおこり、軟骨の破壊へと導かれる (Blanco et al., 1994)。LPS 投与後、6、9、13 日目の関節軟骨細胞でアポトーシスをおこした細胞の数を TUNEL 染色によって調べた。その結果、正常マウスの関節軟骨ではアポトーシス細胞はほとんど観察されないが (図 2-3A、B)、6 日目の関節軟骨で観察されたアポトーシス細胞は関節軟骨の表面に見られ (図 2-3C)、その数は正常の約 17 倍に増加していた (図 2-3A)。9 日目以降、アポトーシス細胞は減少する (図 2-3A)。軟骨細胞の細胞死は関節炎誘導の初期の段階に集中し、その後軟骨基質などの破壊が起こると考えられた。アポトーシスをおこした細胞には HtrA1 タンパク質は存在しない (図 2-3C、D、矢印)。HtrA1 は卵巣ガンの細胞株でアポトーシスを誘導するという報告があるが (Chien et al., 2004)、関節炎での関節軟骨細胞のアポトーシスには HtrA1 が関与していないと示唆される。

### 組織学的解析

関節炎マウスの膝関節を抗 HtrA1 抗体による免疫染色によって観察した。正常な関節軟骨では HtrA1 タンパク質は関節軟骨深層に蓄積している (図 2-4A)。LPS 投与後 3 日目では関節軟骨深部で HtrA1 タンパク質の蓄積が見られる (図 2-4B)。6 日目では関節表面近くまで HtrA1 タンパク質が見られるようになり (図 2-4C)、9 日目では関節軟骨全体で HtrA1 タンパク質が広がっていた (図 2-4D)。また、6 日目の関節腔内の変性軟骨 (図 2-4C、矢印) や 9 日目の滑膜細胞が関節軟骨に浸潤している境界部分にも HtrA1 タンパク質が観察された (図 2-4D)。

正常の関節軟骨では HtrA1 が発現している細胞はその形態から肥大軟骨細胞ではないかと考えられた。関節炎では関節軟骨の変性が起こり、静止軟骨細胞で停止していた軟骨細胞の分化が進み、肥大軟骨細胞が関節軟骨内に増加する (Serra et al., 1997, Yang et al., 2001)。

そこで、肥大軟骨細胞の分化マーカーである抗 X 型コラーゲン抗体を用いて免疫染色を行うと、X 型コラーゲンタンパク質は正常なマウスでは関節軟骨深部にしか見られないが（図 2-4E）、関節炎マウスでは関節軟骨層全体に見られるようになる（図 2-4F）。X 型コラーゲンの発現領域は関節軟骨全体で、HtrA1 タンパク質が関節軟骨で見られる領域よりもより浅層まで広がっていることから、成長軟骨板などで見られるように HtrA1 タンパク質は最終分化した肥大軟骨細胞が産生していると示唆された。

13 日目になると、変形性関節炎で見られるような関節軟骨が大きく破壊され、核が消失した軟骨細胞が関節軟骨表面で観察される（図 2-5A）。この部分はプロテオグリカン青色に染色する Toluidine blue 染色により、水色に染色され、プロテオグリカンが消失していることが分かる（図 2-5B）。プロテオグリカンの消失している関節軟骨表面に HtrA1 タンパク質は大量に蓄積していた（図 2-5C）。HtrA3 タンパク質も HtrA1 同様にこの部分に蓄積していることが観察された（図 2-5D）。

また、HE 染色によって関節軟骨の浅層と中間層の軟骨細胞の核がなくなり（図 2-6A）、さらに Toluidine blue 染色によってプロテオグリカンの消失が見られる部分で（図 2-6B）、HtrA1 の強い発現が見られた（図 2-6C、矢印）。この部分ではプロテオグリカンの Decorin タンパク質の量が減少していた（図 2-6D、矢印）。関節軟骨において、HtrA1 が強く発現しているところで、プロテオグリカンの消失が見られたことから、HtrA1 が軟骨基質成分を分解している可能性が考えられた。

### 軟骨基質成分と HtrA1 のプロテアーゼ活性

関節炎における関節軟骨で HtrA1 タンパク質が多く存在している部分では軟骨細胞の核が消失して、プロテオグリカン量が減少し、関節軟骨の変性が起こっていた。その部分で HtrA1 が軟骨基質成分を分解しているように見えた。そこで HtrA1 が軟骨基質成分を分解するか調べるために軟骨から可溶性のタンパク質を抽出し、HtrA1 と反応させた。大腸菌で活性化型の HtrA1 を発現させるために、マウスの HtrA1 の N 末端側を欠損させた活性化型 HtrA1（セリンプロテアーゼドメインと PDZ ドメインを持つ）を大腸菌で発現させ、関節軟骨または肋骨の軟骨から抽出したタンパク質と 37 °C で 2 時間反応させ、その後のタンパク質量を western blotting によって調べた。関節軟骨、肋骨の軟骨中に

含まれるプロテオグリカンの Decorin、Fibromodulin、Aggrecan と軟骨の主成分である II 型コラーゲンを分解することが分かった(図 2-7A、B)。

HtrA1 は関節炎が誘導され、関節軟骨での発現が上昇すると、関節軟骨基質の成分を分解し、軟骨破壊を行ない、関節炎を悪化させている可能性が示唆された。

### 自然発症関節炎マウス

ほかの関節炎マウスでも HtrA1 の発現が関節軟骨で上昇するか調べた。

自然発症的にリウマチ性関節炎の症状が見られる MCH-lpr/lpr マウスの関節軟骨を抗 HtrA1 抗体で免疫染色を行い観察したところ、正常マウスの関節軟骨に比べ(図 2-8A、C)、関節炎マウスの関節軟骨深層部で HtrA1 タンパク質が増加していた(図 2-8B、D)。

HtrA1 タンパク質は老化などで関節軟骨が磨り減って起こる変形性関節炎だけではなく、自己免疫疾患等によって起こるリウマチ性関節炎でも発現が上昇することが明らかになった。HtrA1 は病因に関わらず、関節軟骨が破壊されることで誘導される可能性が考えられた。

## 考察

HtrA1 は変形性関節炎で発現が 7 倍上昇することが報告されていた (Hu et al., 1998)。今回、II 型コラーゲンの抗体を用いてリウマチ性関節炎を誘導することにより、HtrA1 タンパク質が関節軟骨で約 5 倍に上昇し (図 2-2)、関節軟骨での存在部位も関節軟骨深層から中間層、浅層へと広がっていくことが分かった (図 2-4)。また、関節軟骨が強く破壊された部分に HtrA1 タンパク質が大量に蓄積しており、その部分では Decorin などのプロテオグリカンの減少が観察された (図 2-5、6)。HtrA1 の軟骨成分に対するプロテアーゼ活性を調べたところ、プロテオグリカンの Decorin、Fibromodulin、Aggrecan と II 型コラーゲンを分解した (図 2-7)。また、Tocharus らにより、HtrA1 は Biglycan を分解することも分かっている (Tocharus et al., 2004)。

MMP も関節炎で発現が上昇し、関節軟骨の成分の II 型コラーゲンやプロテオグリカンなどを分解することが報告されている (Mitchell et al., 1995、Neuhold et al., 2001、Murphy et al., 2002、Itoh et al., 2002)。

MMP9 はリウマチ性関節炎で発現が上昇する。MMP9 遺伝子欠損マウスに抗 II 型コラーゲン抗体を用いてリウマチ性関節炎を誘導すると、関節炎が起こりにくく、関節軟骨の破壊も穏やかである (Itoh et al., 2002)。これは、MMP9 が関節炎で軟骨の分解と炎症因子の活性化を行っているためと考えられている。

MMP13 は強力な II 型コラーゲンの分解活性を持ち、リウマチ性関節炎の滑膜や変形性関節炎で発現量が上昇し、軟骨破壊への強い関与が示唆されている (Mitchell et al., 1996)。

HtrA1 は骨形成で軟骨や骨で、MMP13 と同様な部分にタンパク質が存在する。HtrA1 は多様なプロテオグリカンを分解することから、関節炎の関節軟骨で、MMP13 が軟骨の II 型コラーゲンを破壊し、HtrA1 がその他の成分を分解することで、関節軟骨を破壊することが示唆される。

TGF- $\beta$  のシグナル伝達因子である Smad3 を破壊することにより TGF- $\beta$  シグナルを阻害した遺伝子欠損マウスは成長するにつれて関節軟骨で、肥大軟骨細胞の数が増え、関節軟骨に裂け目ができるなど関節軟骨の異常がおこり、ヒトの変形性関節炎に似た関節軟骨の変性を起こすことが報告されている (Yang et al., 2001)。また、TGF- $\beta$  のドミ

ナントネガティブの II 型レセプターを骨に過剰発現させたトランスジェニックマウスも成長するにつれて関節軟骨に肥大軟骨細胞の数が増え、関節軟骨が変性し、軟骨の量は減少する。このように TGF- $\beta$  II 型レセプターのドミナントネガティブのトランスジェニックマウスもまた関節炎と似たような症状が見られる (Serra et al., 1997)。関節軟骨は軟骨の分化が停止した状態に保たれた特殊な軟骨細胞である。ノックアウトマウスなどの結果から、その維持には TGF- $\beta$  シグナルが重要であることがわかっている。HtrA1 は TGF- $\beta$  のシグナル伝達を阻害することから、関節炎によって関節軟骨で発現が上昇した HtrA1 は TGF- $\beta$  シグナルを強く阻害し、関節軟骨細胞の分化を進める。その結果、関節軟骨の変性が起こり、関節炎悪化へと導かれると示唆される。

また、TGF- $\beta$  は軟骨成分であるコラーゲンやプロテオグリカンの合成を促進させる (Demoor-Fossard et al., 1998, Burton-Wurster et al., 2003)。さらに、Decorin、Biglycan、Fibromodulin は TGF- $\beta$  と結合し、TGF- $\beta$  の基質成分を合成する活性を制御していることが示唆されている (Hidebrand et al., 1994)。

関節炎の関節軟骨で HtrA1 の発現が上昇すると、HtrA1 は、TGF- $\beta$  シグナルを阻害し、プロテオグリカンなどの軟骨基質を分解するため、TGF- $\beta$  とプロテオグリカンとのバランスも壊され、TGF- $\beta$  による基質の合成も減少し、さらに関節炎が悪化へと進むと考えられる。

関節炎で正常の関節軟骨の 4~5 倍にアポトーシスが上昇する (Blanco et al., 1998)。HtrA1 も卵巣ガンの細胞で、アポトーシスを誘導することが報告されている (Chien et al., 2004)。しかし、関節炎によって誘導されるアポトーシスは、HtrA1 の発現部位と異なることから (図 2-3)、関節炎において、HtrA1 はアポトーシス誘導に関わっていないかった。

HtrA1 はヒトの変形性関節炎、抗 II 型コラーゲン抗体を用いたリウマチ性関節炎モデルマウス、さらに、自然発症のリウマチ性関節炎マウスにおいて、関節軟骨での発現の上昇が観察された。変形性関節炎は関節軟骨の加齢による変化、力学的ストレスなどによって誘導される。一方、リウマチ性関節炎は免疫学的な異常などによって誘導される。HtrA1 はどちらの関節炎でも発現が上昇することから、HtrA1 関節

炎の誘導原因に関わらず、関節軟骨の異常によって発現が誘導されると示唆される。

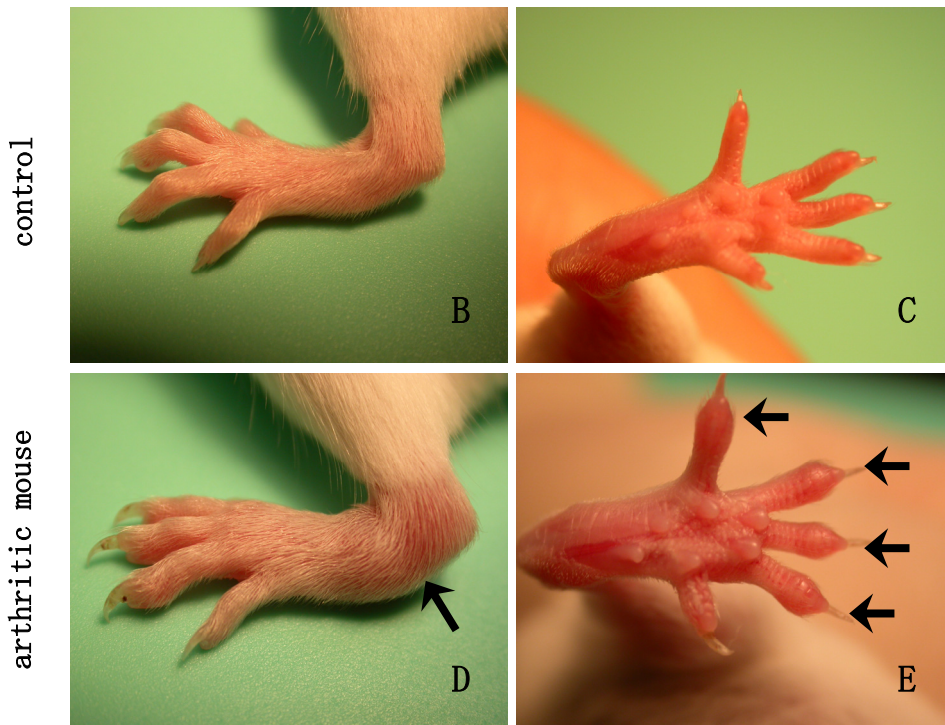
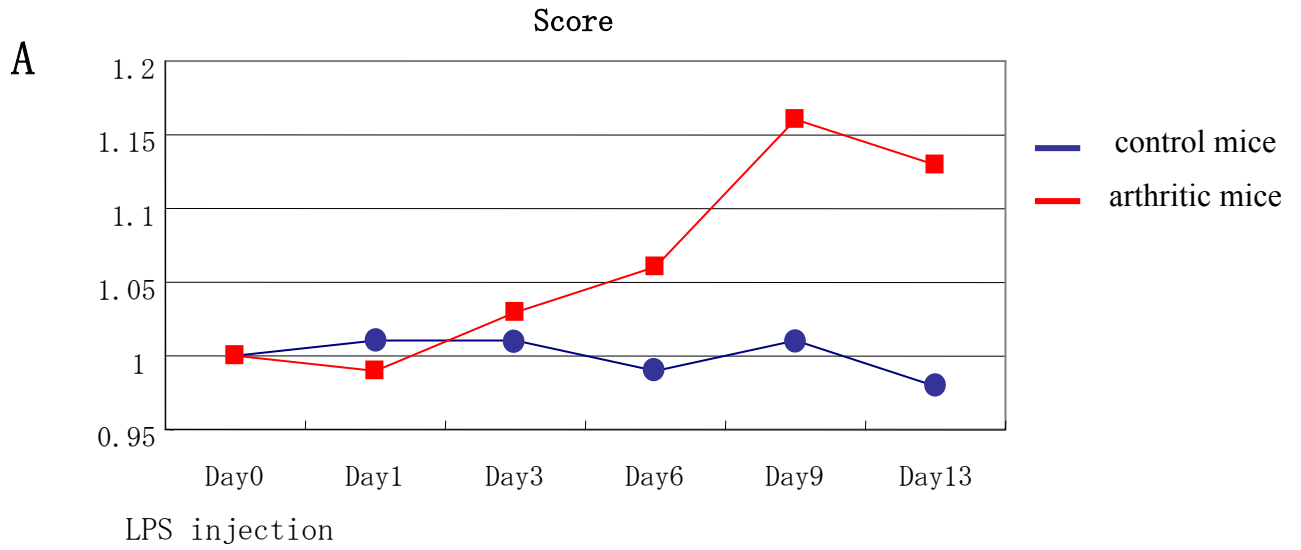


図2-1 関節炎のスコアと関節炎マウスの外見の比較

A: 関節炎マウスとコントロールマウスの関節炎スコア、青：コントロールマウス、赤：関節炎マウス  
 両手首の幅、両足首の前後、左右の幅、足の厚さの計8ヶ所をノギスで測定し、LPSを投与した日の数値を1としたときの比をすべて足し、8で割った数値。

B, C: コントロールマウス、D, E: LPS投与後9日目の関節炎マウスの外見  
 D、踵部分が腫れている（矢印）。E、第2、3、4、5指の指先が腫れている（矢印）。



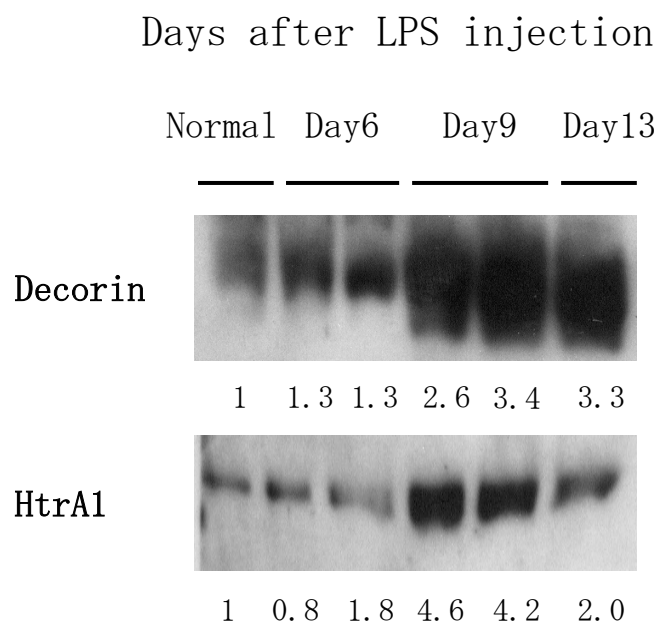


図2-2 関節炎マウスの関節軟骨タンパク質の発現量の変化

LPS投与後、6、9、13日目に関節軟骨のタンパク質を抽出し、総タンパク質量  $4 \mu\text{g}$  でSDS-PAGEを行い、各抗体で検出した。

上段：軟骨成分のプロテオグリカンのDecorinタンパク質の発現量。関節炎誘導時間が長いほど発現量が増えている。

下段：HtrA1のタンパク質の発現量。9日目に約4.6倍まで上昇し、13日目にはやや減少する。

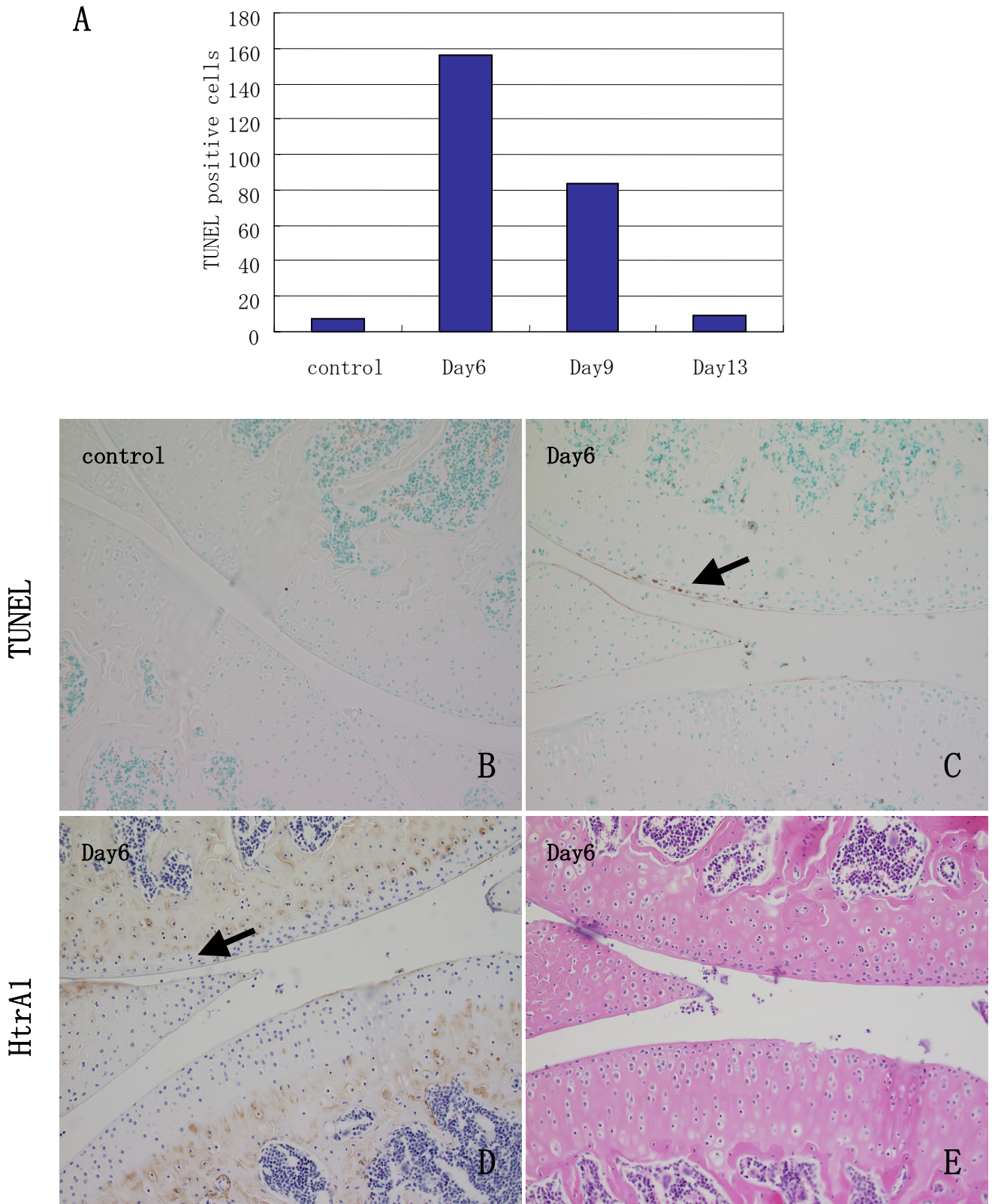


図2-3 関節炎マウスの関節軟骨でのアポトーシス細胞数とその組織

A: 関節軟骨でのアポトーシスの数、B: コントロールマウスの関節軟骨、C, D, E: LPS投与後6日目のマウスの関節軟骨、B, C: TUNEL染色、D: 抗HtrA1抗体による免疫染色、E: HE染色

A、関節軟骨でのアポトーシス数は6日目にピークをむかえる。

正常マウスでは関節軟骨にほとんどアポトーシスを起こしている細胞は見られない(B)。関節炎マウスでは関節表面にアポトーシスが見られるが(C、矢印)、その部分にHtrA1タンパク質は存在しない(D、矢印)。

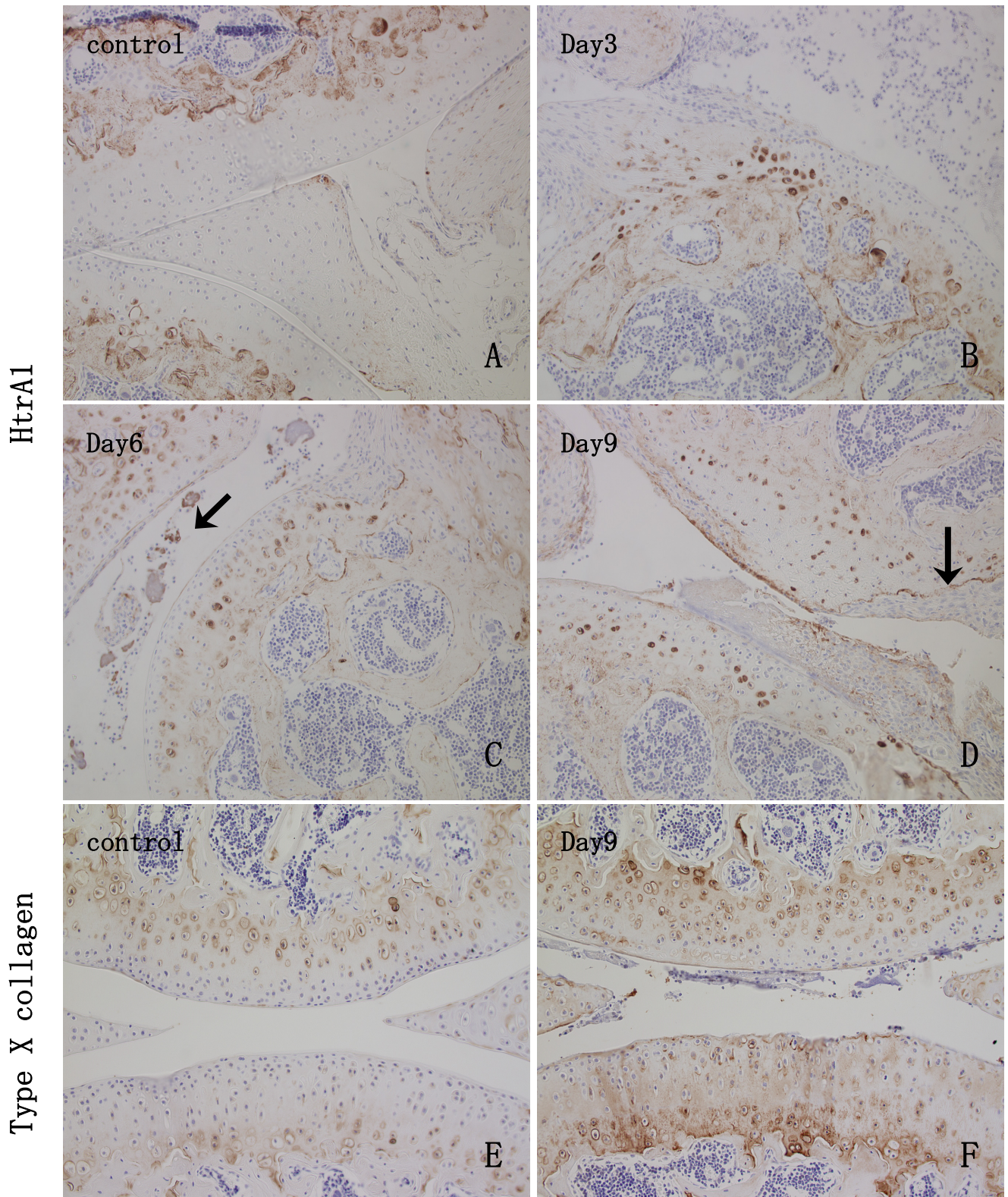


図2-4 関節炎マウスの関節軟骨におけるHtrA1タンパク質の存在部位

A, E: 正常マウス、B: LPS投与後3日目、C: 6日目、D, F: 9日目の関節軟骨

A, B, C, D: 抗HtrA1抗体による免疫染色、E, F: 抗X型コラーゲン抗体による免疫染色

正常マウスの関節表面にはHtrA1タンパク質は見られない(A)。LPS投与後3日目ごろから関節軟骨深部にHtrA1タンパク質が強く見られる(B)。6日目では関節軟骨の表面近くや関節腔内の変性軟骨でもタンパク質が見られる(C、矢印)。9日目には関節軟骨全体や関節表面に見られ(D)、浸潤してきた滑膜細胞と関節軟骨との境界にHtrA1タンパク質が見られる(D、矢印)。

正常マウスの関節軟骨では表面まで抗X型コラーゲン抗体で染色されない(E)。関節炎マウスの関節軟骨では関節軟骨細胞の分化が進み、抗X型コラーゲン抗体で染色される肥大軟骨細胞の数が増える(F)。

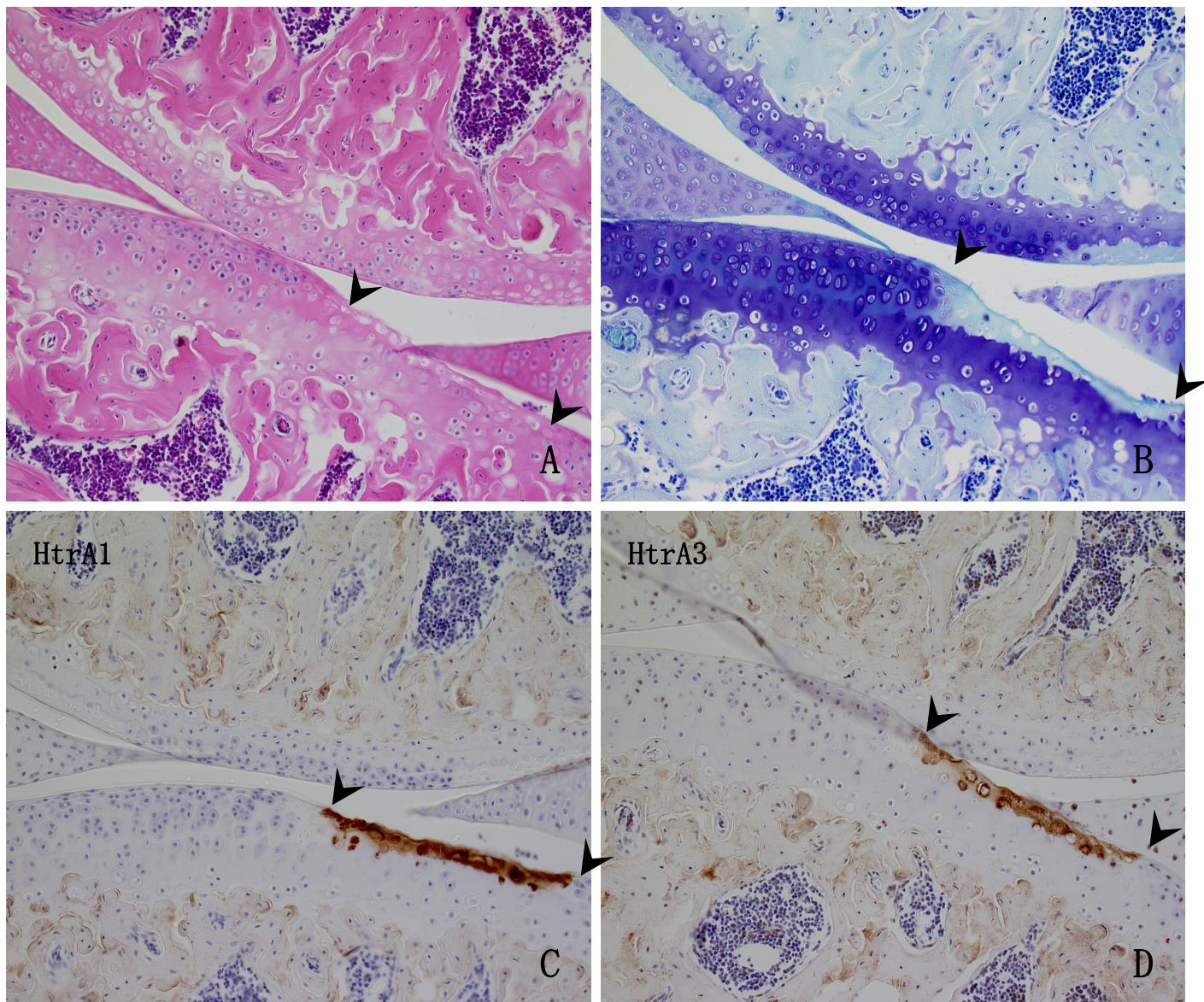


図2-5 LPS投与後13日目の関節炎マウスの関節軟骨-1

A: HE染色、B: Toluidine blue染色、C: 抗HtrA1抗体の免疫染色、D: 抗HtrA3抗体の免疫染色

関節軟骨の核が抜けた部分(A)ではプロテオグリカンの量が減少している(B、水色の部分)、その部分ではHtrA1(C)、HtrA3(D)タンパク質量が増加している。

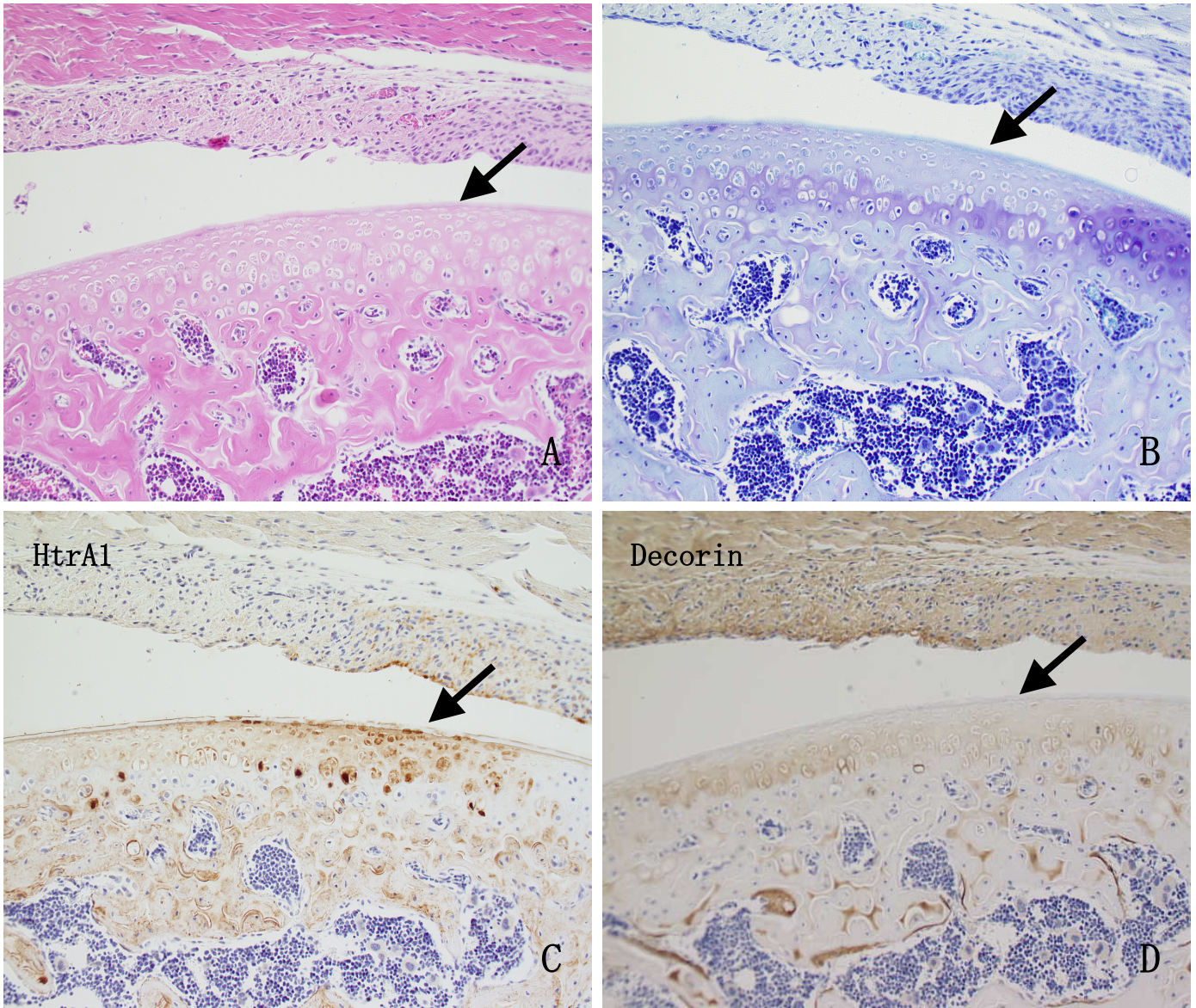
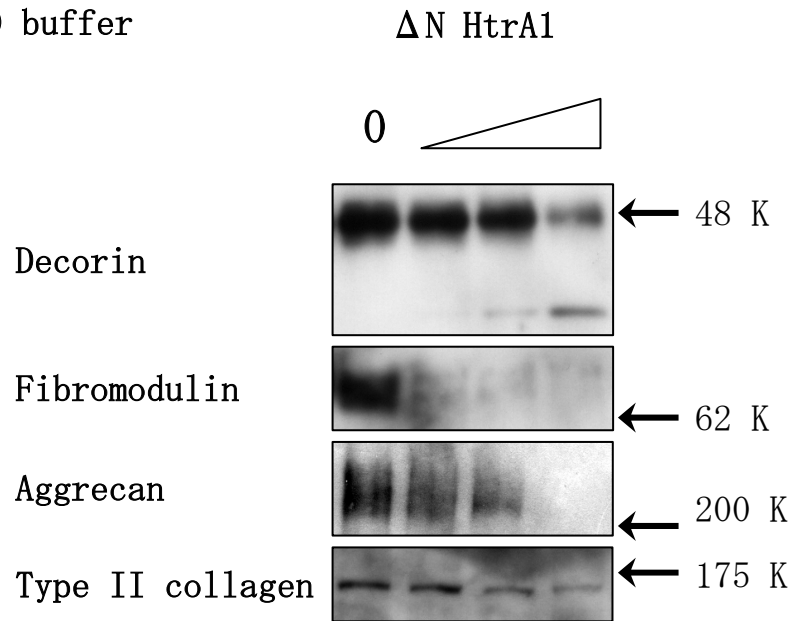


図2-6 LPS投与後13日目の関節炎マウスの関節軟骨-2

A: HE染色、B: Toluidine blue染色、C: 抗HtrA1抗体による免疫染色、D: 抗Decorin抗体による免疫染色  
 関節軟骨でHtrA1タンパク質が多く見られるところでは(C、矢印) 核のない軟骨細胞が見られた (A、矢印)。  
 その部分はToluidine blue染色によって、プロテオグリカンの量が減少していることが 確認され (B、矢印)、  
 Decorinタンパク質量が減少しているように見られる(D、矢印)。

A. Rib TritonX-100 buffer



B. Articular cartilage  
GuHCl buffer

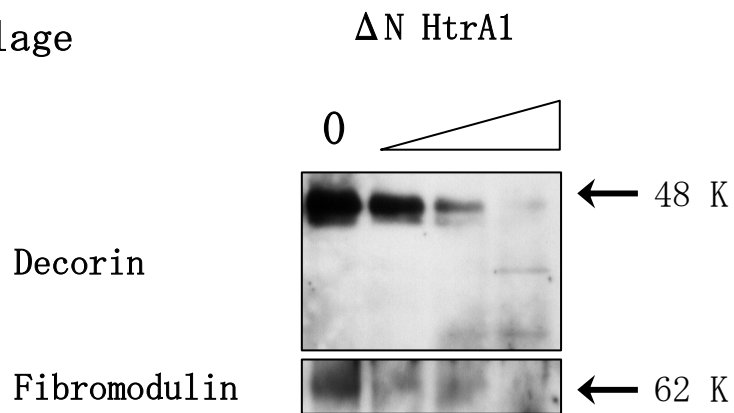


図2-7 HtrA1による軟骨基質成分の分解

大腸菌で発現させた活性型HtrA1タンパク質( $\Delta N$  HtrA1)を、軟骨から抽出したタンパク質と反応させて、各タンパク質を検出した。

A: 肋骨からTritonX-100を含んだバッファーで抽出したタンパク質を用いて分解活性を見たもの。

B: 関節軟骨からグアニジン塩酸を含んだバッファーを用いて抽出したタンパク質を用いて分解活性を見たもの。  
HtrA1はプロテオグリカンのDecorin、Fibromodulin、Aggrecanと軟骨の主成分であるII型コラーゲンを分解した。

control

MCH-1pr/1pr

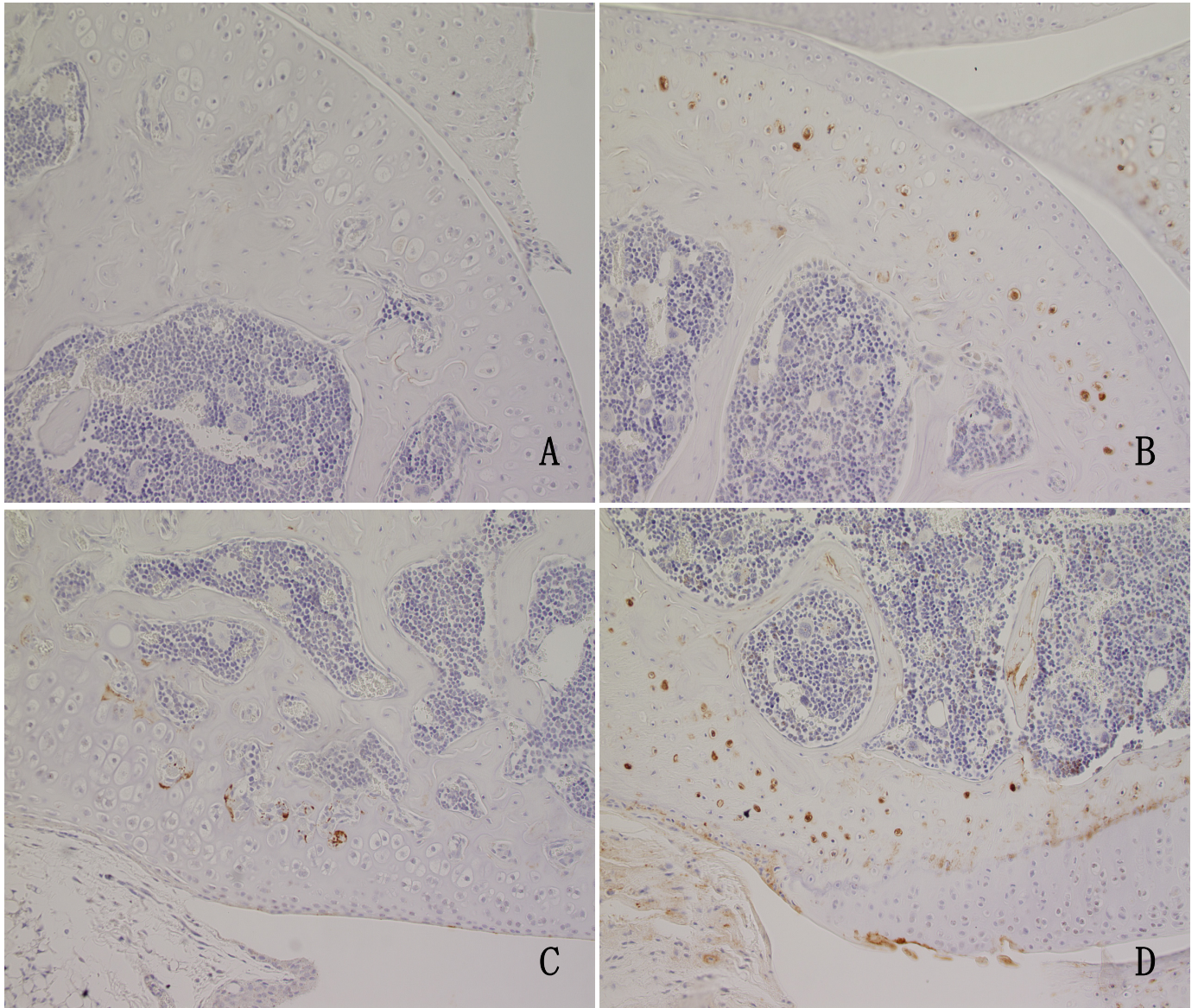


図2-8 自然発症リウマチ性関節炎モデルマウス (MCH-1pr/1pr) でのHtrA1タンパク質の存在部位  
A, C: 正常マウス, B, D: MCH-1pr/1pr 自然発症リウマチ性関節炎マウス  
関節炎マウスでは関節軟骨深層でのHtrA1タンパク質の増加が観察された (B, D)。  
脱灰液のバッファーの違いによりHtrA1のシグナルが弱い。

### 第 3 章

## HtrA1 遺伝子欠損マウスの作製と関節炎の誘導



## 結果

HtrA1 の発現部位の解析は進んでいるが、生体内で、HtrA1 がどのような働きをしているか不明な部分が多い。そこで、HtrA1 遺伝子を欠損させることにより、発生過程等でどのような障害が現れるか調べるために HtrA1 遺伝子欠損マウスを作製した。

### HtrA1 遺伝子欠損マウスの作製

HtrA1 ゲノム遺伝子は 129SV ゲノムライブラリーを用いて、プラークハイブリダイゼーションにより、第 1 エクソン部分周辺のゲノムを単離した。

HtrA1 は EST 検索において ES 細胞で発現していることが確認されている。そこで、相同組み換え体を効率よくセレクションするためにプロモータートラップのできる IRES (internal ribosome entry site)、LacZ 遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、その下流に SV poly A を持ったベクターを用いてターゲティングベクターを作製した。

エクソン 1 の *Xho* I サイトに IRES- $\beta$ -geo(LacZ, neo, polyA) を挿入するかたちで、上流に 1.6 kb、下流に 9.0 kb の HtrA1 遺伝子を組み込んだプラスミドを作製した (図 3-1A)。相同組み換えの確認は *Bam*HI による制限酵素処理を行い、N 末端のプローブを用いて Southern hybridization によって行った (図 3-1B)。

3 個の組み換え ES 細胞が得られ、そのうち 1 つを受精卵にインジェクションした。

キメラマウスに C57BL/6J マウスを掛け合わせ、その後、ヘテロマウス同士を掛け合わせて HtrA1 遺伝子欠損マウスを作製した。HtrA1 遺伝子欠損マウスの genotyping は *Eco*RI による制限酵素処理を行い C 末側のプローブを用いて Southern hybridization により行った。(図 3-1C)。さらに PCR による確認も行なった (図 3-1D)。

HtrA1 遺伝子欠損マウスは正常に誕生し、生殖能力に異常はなかった。

得られた HtrA1 遺伝子欠損マウスの脳から RNA を抽出して Northern hybridization により発現の確認を行なった。HtrA1 遺伝子欠損マウスでは HtrA1 mRNA の発現が検出されなかったことから、このマウスでの HtrA1 の発現は完全に抑えられていることが確認できた (図 3-1E)。また、生後 9 日目と成体マウスの骨での抗 HtrA1 抗体を用いた免疫染色

の結果からも HtrA1 遺伝子欠損マウスでは HtrA1 タンパク質が産生されていないことが確認できた (図 3-2)。

HtrA1 遺伝子欠損マウスを作製したプラスミドには  $\beta$ -galactosidase 遺伝子が挿入されているため、X-gal 染色ができる。しかし、ヘテロマウスの組織を用いて X-gal 染色を行なったが、ヘテロマウスの小脳や眼では染色されなかった。脳の RNA を用いた Northern blotting でも LacZ 遺伝子の発現は確認できなかった。これは X-gal 染色を行なった部分での HtrA1 の発現量が少なかったため染色されなかったと考えられる。

成体マウスの眼、皮膚、心臓、骨、成長過程の骨 (生後 9 日目) の薄切切片を作製し、観察したが特に異常は見られなかった。生後約 3 ヶ月のマウスの骨の HE 染色を観察したところ、生後 3 ヶ月の HtrA1 遺伝子欠損マウスの成長軟骨板は、成長軟骨板と骨との境界が不鮮明であり、軟骨細胞の列の乱れ、腱の付着部が厚いという異常が見られた (図 3-3)。生後 1 ヶ月の HtrA1 遺伝子欠損マウスの成長軟骨板の軟骨細胞の列は縦一列に比較的きれいに並んでいる (図 3-3A、B)。生後 3 ヶ月の正常な成長軟骨板は縦に一列にきれいに軟骨細胞が並んでいる (図 3-3C、E、黒枠)。しかし、HtrA1 遺伝子欠損マウスの成長軟骨板の軟骨細胞はきれいな列を作らず、細胞が枝分かれしたように見える部分もある (図 3-3D、F、黒枠)。また、特に 2 次骨化中心側の成長軟骨板と骨基質との境界が不鮮明である (図 3-3D、F、矢印)。

約 2 年間マウスを飼育したが、目立った異常は観察されなかった。哺乳類で HtrA1 遺伝子はファミリーを形成しており、HtrA1、HtrA3、HtrA4 は類似した構造を持ち、相同性も高い。そのため、HtrA1 が欠損しても、HtrA3 や HtrA4 がその働きを補っている可能性が考えられた。

## HtrA1 遺伝子欠損マウスの関節炎誘導

HtrA1 と関節炎との関係をさらに詳しく調べるために、HtrA1 遺伝子欠損マウスを用いてリウマチ性関節炎の誘導を行なった。HtrA1 遺伝子欠損マウスの系統は 129SV と C57BL/6J であり、C57BL/6J は関節炎誘導に用いる抗体カクテルキットの LPS への感受性が低く関節炎が誘導されにくいマウスである。このことから、HtrA1 遺伝子欠損マウスの系統を関節炎が誘導されやすい BALB/c マウスにバッククロスした。5 回バッククロスをしたところで関節炎の誘導を行なった。

HtrA1 遺伝子欠損マウスの 7 週齢の雄 2 匹、雌 2 匹、野生型マウスの雄 1 匹、雌 2 匹を関節炎誘導した。また、ヘテロマウスの雄 1 匹と雌 1 匹を、関節炎を誘導させないコントロールマウスとした。

BALB/c マウスを用いた関節炎誘導と同じように、抗 II 型コラーゲン抗体 2mg を尾静脈に、4 日後に LPS 50  $\mu$ g を腹腔内に投与した。

関節炎発症の指標とするために前後足の腫れからスコアをつけ、野生型マウスと HtrA1 遺伝子欠損マウスを比較した。LPS 投与前と後の両前足首の前後の幅、両後ろ足首の前後、左右の幅、かかとの幅、足の厚さの計 10 ヶ所をノギスで測定し、野生型、欠損型各マウスの数値の平均値で示した。関節炎のスコアは LPS 投与前を 1 としたときの比を各部分で出し、すべてを足して測定箇所数の 10 で割って数値を出した。野生型マウスは LPS 投与後 3 日目ごろから徐々に腫れが見られた（図 3-4A）。一方、HtrA1 遺伝子欠損マウスは野生型マウス同様に激しい腫れが見られるマウスもいたが、雌マウス 1 匹だけは全く腫れが見られなかった。雄の欠損型マウスでの腫れは野生型マウスほどひどくなかった。HtrA1 遺伝子欠損マウスの腫れの程度は、腫れの見られなかった欠損型マウスを除いたスコアを野生型マウスのスコアと比較しても弱かった（図 3-4A）。

関節炎マウスの膝関節の組織を HE 染色と Toluidine blue 染色によって観察した。野生型マウスでは関節軟骨の破壊が起こり、関節軟骨浅層や中間層のプロテオグリカンが消失している部分が観察された（図 3-5A、C）。一方、欠損型マウスでは関節軟骨の破壊やプロテオグリカンの消失はほとんど観察されなかった（図 3-5B、D）。

今回の結果は、全体的な数が少ないことから結論を導き出すこと難しいが、HtrA1 遺伝子が欠損すると、関節炎誘導が抑制され、炎症反応が起こりにくく、野生型マウスに比べ腫れの割合が穏やかあること、また、関節軟骨での HtrA1 のプロテアーゼ活性が減少し、関節軟骨の

破壊が緩和されることが示唆された。HtrA1 遺伝子が関節炎の悪化因子であることが強く示唆される。今後、さらにバッククロスを行い、全体的な関節炎マウスを増やして解析を行なっていく必要があると考える。

## 考察

### HtrA1 遺伝子欠損マウスの作製

HtrA1 の生体内での機能を調べるために HtrA1 遺伝子欠損マウスを作製した。HtrA1 遺伝子欠損マウスは正常に生まれ、外見的には異常は見られなかった。組織を観察すると、生後 3 ヶ月齢の HtrA1 遺伝子欠損マウスの成長軟骨板で、成長軟骨板と骨の境界が不鮮明で、軟骨細胞の列の乱れが見られた (図 3-3)。1 ヶ月齢の欠損型マウスの成長軟骨板の軟骨細胞の列は比較的きれいに並んでいる (図 3-3A、B)。成体マウスで、HtrA1 タンパク質は肥大軟骨細胞層の最も骨側に見られる。MMP13 の遺伝子欠損マウスは成長期の成長軟骨板の肥大軟骨層が長いという異常が見られるが、成長すると成長軟骨板や骨は正常に形成される (Inada et al., 2004、Stickens et al., 2004)。HtrA1 タンパク質の成長軟骨板の肥大軟骨細胞層での蓄積が目立つのは成体マウスになってからであり、骨成長初期に働いている MMP の発現時期よりも遅い。このことから、MMP は発生の初期に、HtrA1 はその後 MMP と協同して成長軟骨板の肥大軟骨から骨への置換のために、軟骨基質を分解している可能性が考えられる。そのため、MMP の働きが弱まった、成体マウスの成長軟骨板で異常が見られると示唆される。

哺乳類の HtrA には HtrA1 と相同性の高い HtrA3 と HtrA4 が存在する。HtrA3 が発現している組織は HtrA1 とほぼ一致しているが、HtrA1 とは同じ組織でも異なる部位に発現しているものもある (Nie et al., 2003、Tocharus et al., 2004)。HtrA4 に関しては詳しい報告はまだない。HtrA3 は TGF- $\beta$  シグナルを阻害し、Decorin や Biglycan などのプロテオグリカン分解するなど、HtrA1 と同様の機能を持っている (Tocharus et al., 2004)。これらのことから HtrA1 遺伝子欠損マウスでは HtrA3 や 4 が HtrA1 の働きを補償している可能性が示唆される。このことを調べるためにも、HtrA4 の解析や HtrA3 と HtrA4 の遺伝子欠損マウスの作製を行い、ダブルノックアウトマウスを作製し、それらのマウスを解析することにより、HtrA ファミリーの生体内での働きが明らかになることが期待される。

また、HtrA1 遺伝子欠損マウスの細胞を用いることで、現在までに報告されている HtrA1 のガン化や骨形成での機能がより明らかになると期待される。

## HtrA1 遺伝子欠損マウスを用いた関節炎マウスの作製

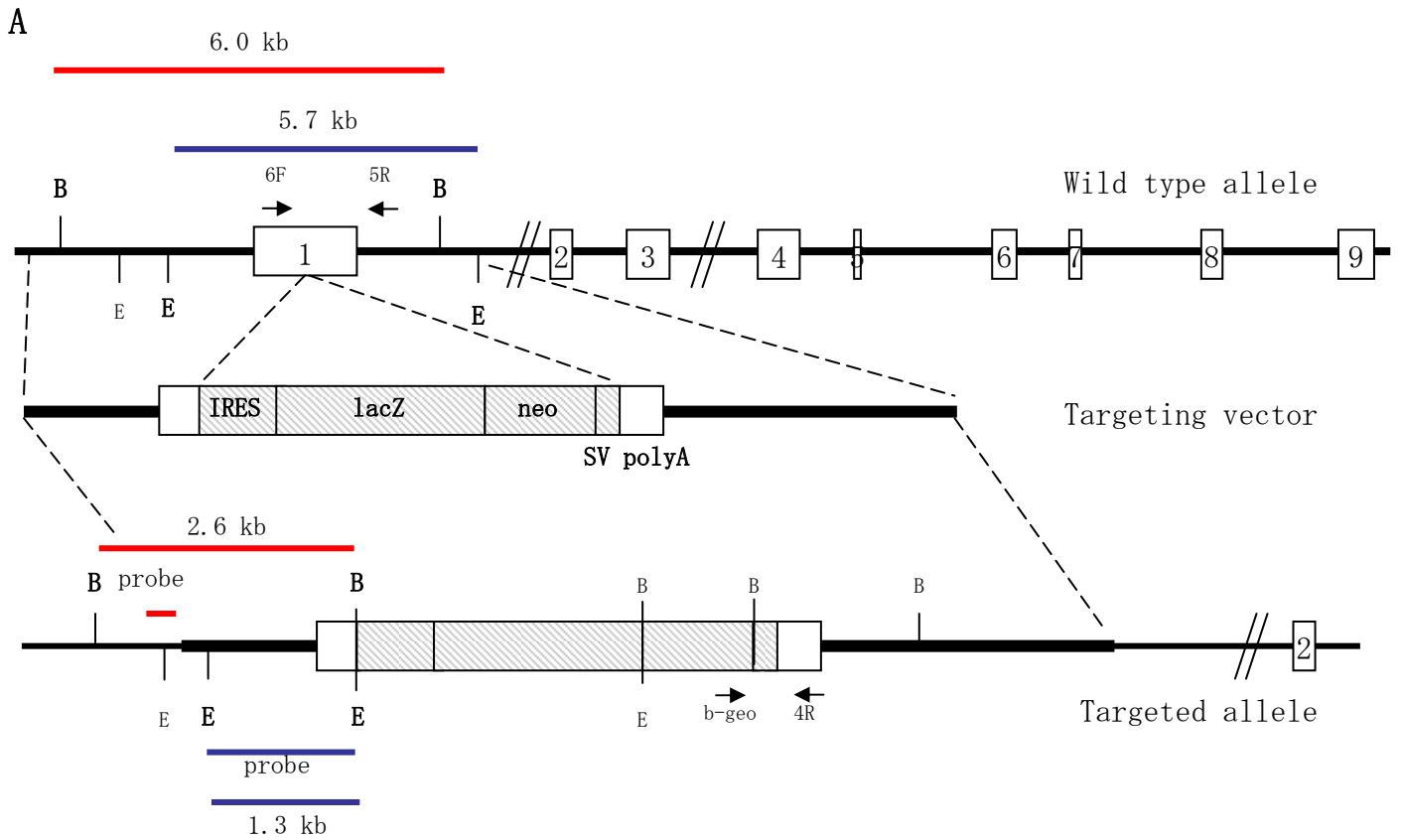
HtrA1 遺伝子欠損マウスのリウマチ性関節炎誘導において、関節炎による腫れのスコアが野生型に比べ、HtrA1 遺伝子欠損マウスではスコアが低かった (図 3-4)。欠損型マウスの中にも野生型マウスと同様にひどい腫れを見せたマウスもいたが、腫れが全く見られないマウスもいた。このことは HtrA1 遺伝子の欠損により、関節炎に抵抗性を示したか、抗体を静脈に投与する際、うまくマウスに投与できていなかったため、関節炎が誘導されなかった可能性も考えられる。このことを解明するために、今後、HtrA1 遺伝子欠損マウスの関節炎マウスの数を増やし、解析していく必要がある。

関節炎で腫れのみられた欠損型マウスの関節軟骨は、野生型に比べ、関節軟骨の破壊やプロテオグリカンの消失があまり起こっていなかった (図 3-5)。

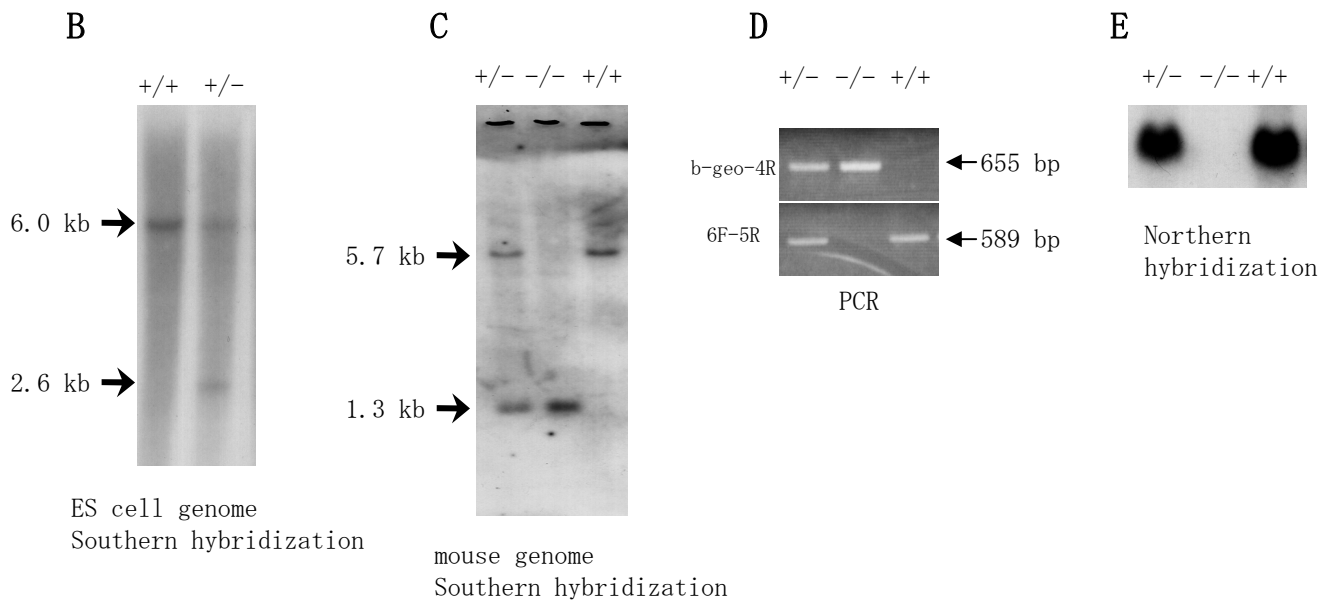
MMP9 は変形性関節炎でもリウマチ性関節炎でも発現の上昇が見られる。MMP9 遺伝子欠損マウスで、抗 II 型コラーゲン抗体を用いたリウマチ性関節炎を誘導すると、関節炎が起こりにくく、関節軟骨の破壊も穏やかである (Itoh et al., 2002)。これは、MMP9 が軟骨の分解と炎症因子の活性化を行なっているためと考えられている。HtrA1 も軟骨の成分であるプロテオグリカンやコラーゲンを分解することから、HtrA1 が欠損したことにより、軟骨を分解するプロテアーゼが減少し、関節炎の破壊が起こりにくくなったことが示唆される。

関節炎では関節の軟骨細胞が肥大軟骨細胞へと分化し、軟骨の変性が起こる。その原因は TGF- $\beta$  シグナルが阻害されるためだと考えられている (Serra et al., 1997, Yang et al., 2001)。HtrA1 は関節炎の関節軟骨で、発現が上昇し、TGF- $\beta$  シグナルを阻害している可能性が示唆される。HtrA1 遺伝子欠損マウスでは、関節軟骨で HtrA1 が TGF- $\beta$  シグナルの阻害しないため、関節炎が誘導されても関節軟骨細胞が正常なまま維持され、軟骨の変性が起こりにくかったことが考えられる。

今後、さらに HtrA1 遺伝子欠損マウスでの関節炎誘導を行ない、解析を行なっていく必要がある。



IRES: internal ribosome entry site, lacZ: b-galactosidase gene, neo: neomycin resistance gene  
 E: *Eco* RI, B: *Bam* HI



### 図3-1 HtrA1遺伝子欠損マウスの作製

A: HtrA1遺伝子とターゲティングベクター、B, C, D: HtrA1のgenotyping、E: northern hybridization  
 B、ES細胞のスクリーニングはゲノムDNAを*Bam* HI切断し、Southern hybridizationによって行なった。プローブと確認されるバンドは赤線で示した。野生型は6.0 kb、欠損型は2.6 kbのバンドが見られる。  
 C、マウスのgenotypingはゲノムDNAを*Eco* RI切断し、Southern hybridizationによって行なった。プローブと確認されるバンドは青線で示した。野生型は5.7 kb、欠損型は1.3 kbのバンドが見られる。  
 D、PCRでは野生型は589 bp、欠損型は655 bpのバンドが見られる。  
 E、Northern hybridizationにより、ノックアウトマウスではHtrA1を発現していないことを確認した。

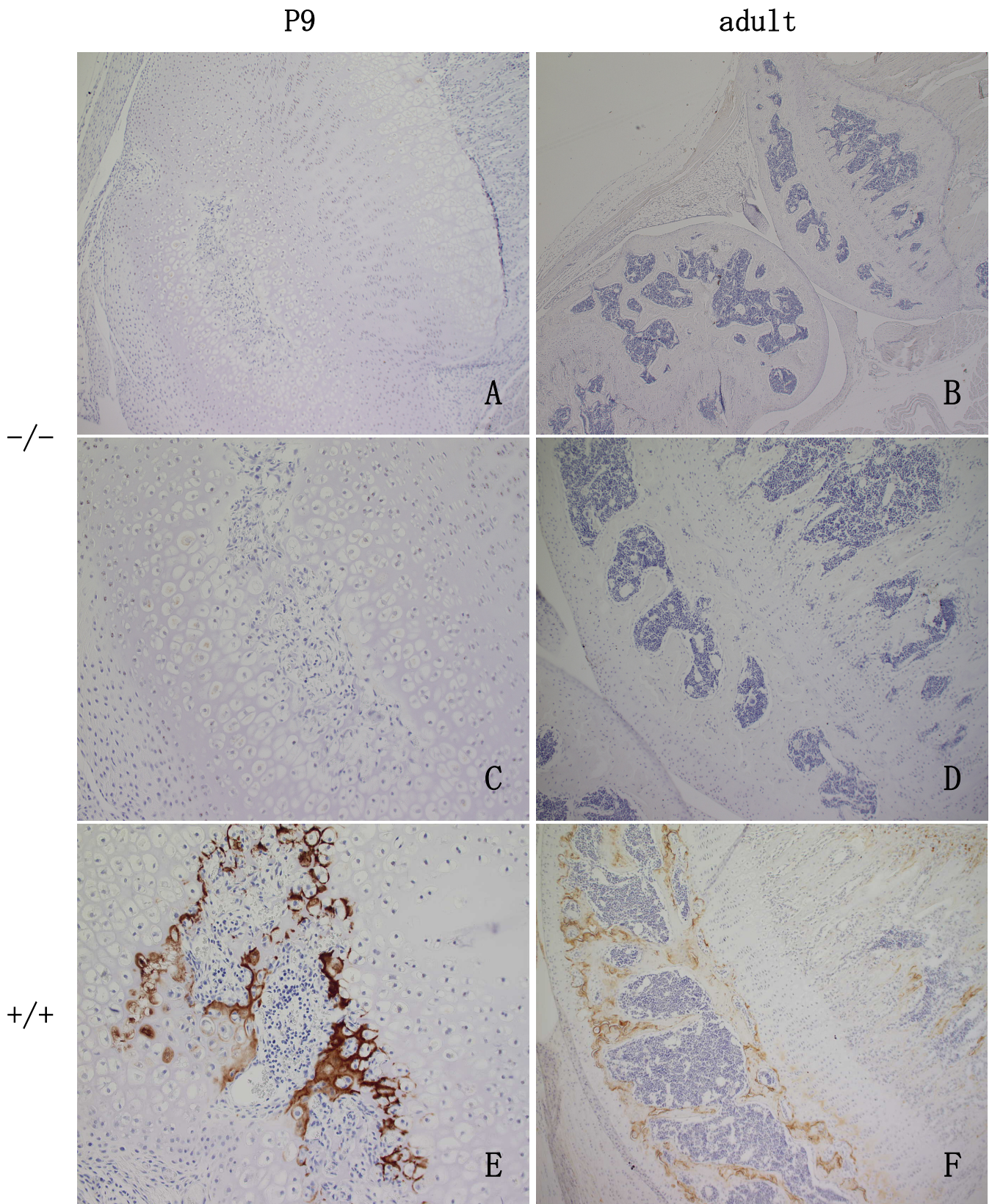


図3-2 HtrA1遺伝子欠損マウスの骨を用いた抗HtrA1抗体による免疫染色

A, C, E: 生後9日目(P9)の脛骨の骨端部、B, D, F: 成体マウスの脛骨の骨端部

A, B, C, D: HtrA1遺伝子欠損マウス、E, F: 野生型マウス

HtrA1遺伝子欠損マウスの骨は抗HtrA1抗体によって染色されないことから、HtrA1の発現が完全に抑えられていることが分かる。



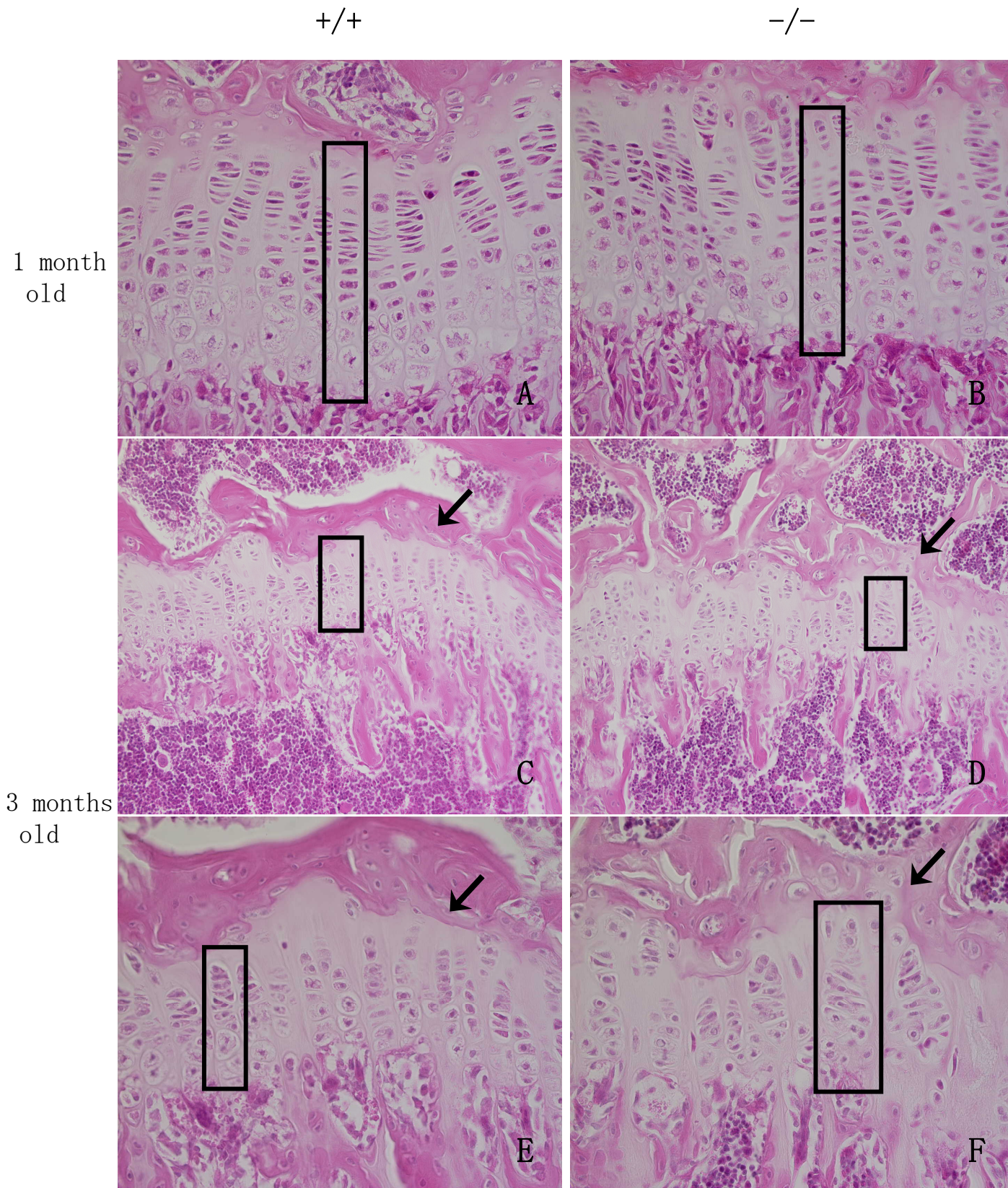


図3-3 1ヶ月齢と3ヶ月齢のHtrA1遺伝子欠損マウスの成長軟骨板

A, C, E: 野生型マウス、B, D, F: HtrA1遺伝子欠損マウス、A, B :1ヶ月齢、C, D, E, F: 3ヶ月齢  
 生後1ヶ月齢の欠損型マウスは野生型マウスに比べて、成長軟骨板の軟骨の配列は比較的きれいに並んでいる。  
 生後3ヶ月齢のマウスは野生型マウスの成長軟骨板に比べて、HtrA1遺伝子欠損マウスは成長軟骨板の境界が  
 不鮮明で (C, D, E, F、矢印)、軟骨細胞の列の乱れ (C, D, E, F、黒枠) などが見られる。

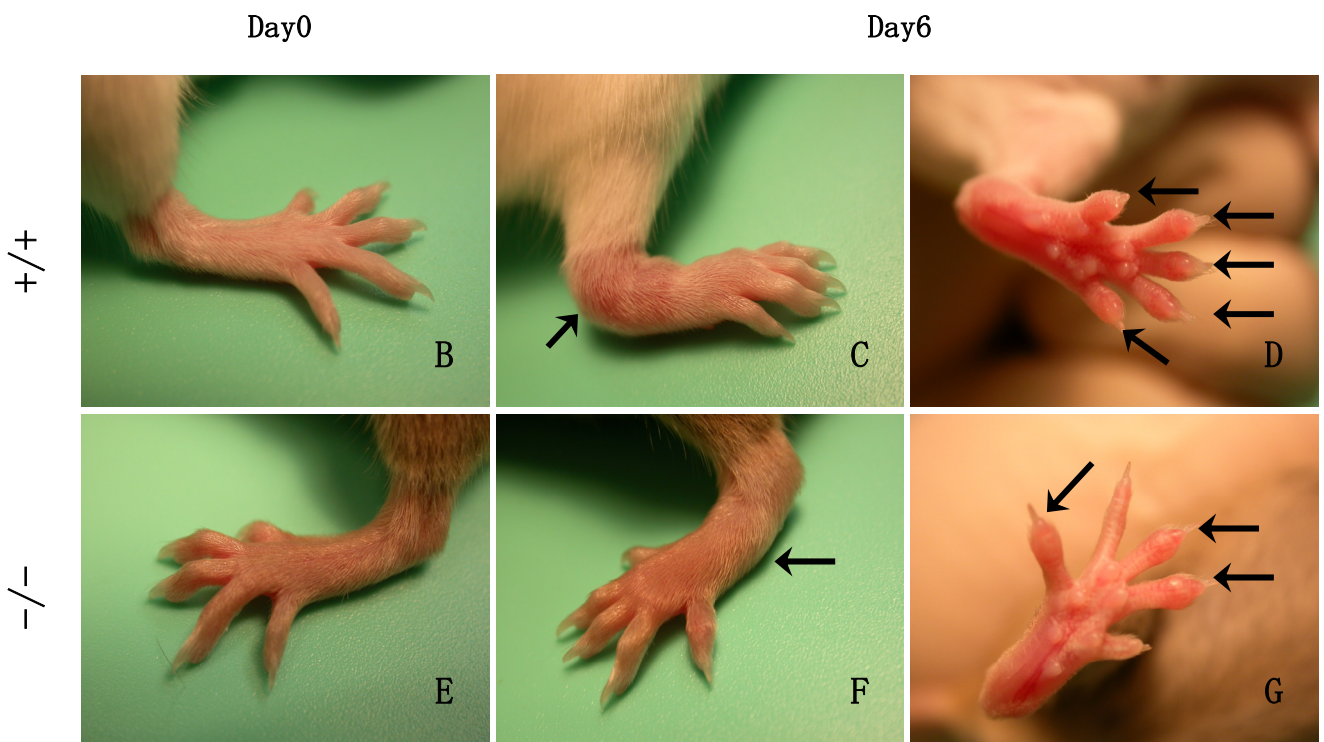
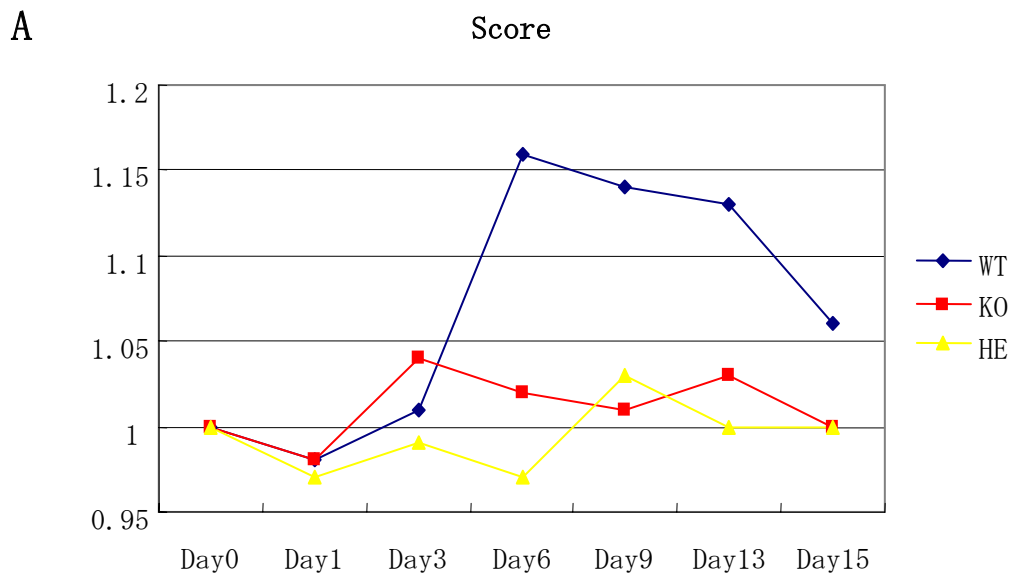


図3-4 HtrA1遺伝子欠損マウスを用いた関節炎誘導

A: 野生型と欠損型関節炎マウスの関節炎スコア

両手首の幅、両足首の前後、左右の幅、足の厚さ、幅をノギスで測定し、LPSを投与した日の数値を1としたときの比をすべて足し、10で割った数値。青：野生型関節炎マウス(WT)、赤：欠損型関節炎マウス(KO)、黄：コントロールマウス(ヘテロマウス、HE)

B, C, D: 野生型関節炎マウス、E, F, G: 欠損型関節炎マウス

B, E: LPS投与前、C, D, F, G: LPS投与後6日目の関節炎マウス

野生型マウス(C, D、矢印)同様に欠損型マウスでも足や指に関節炎による腫れが見られた(F, G、矢印)。

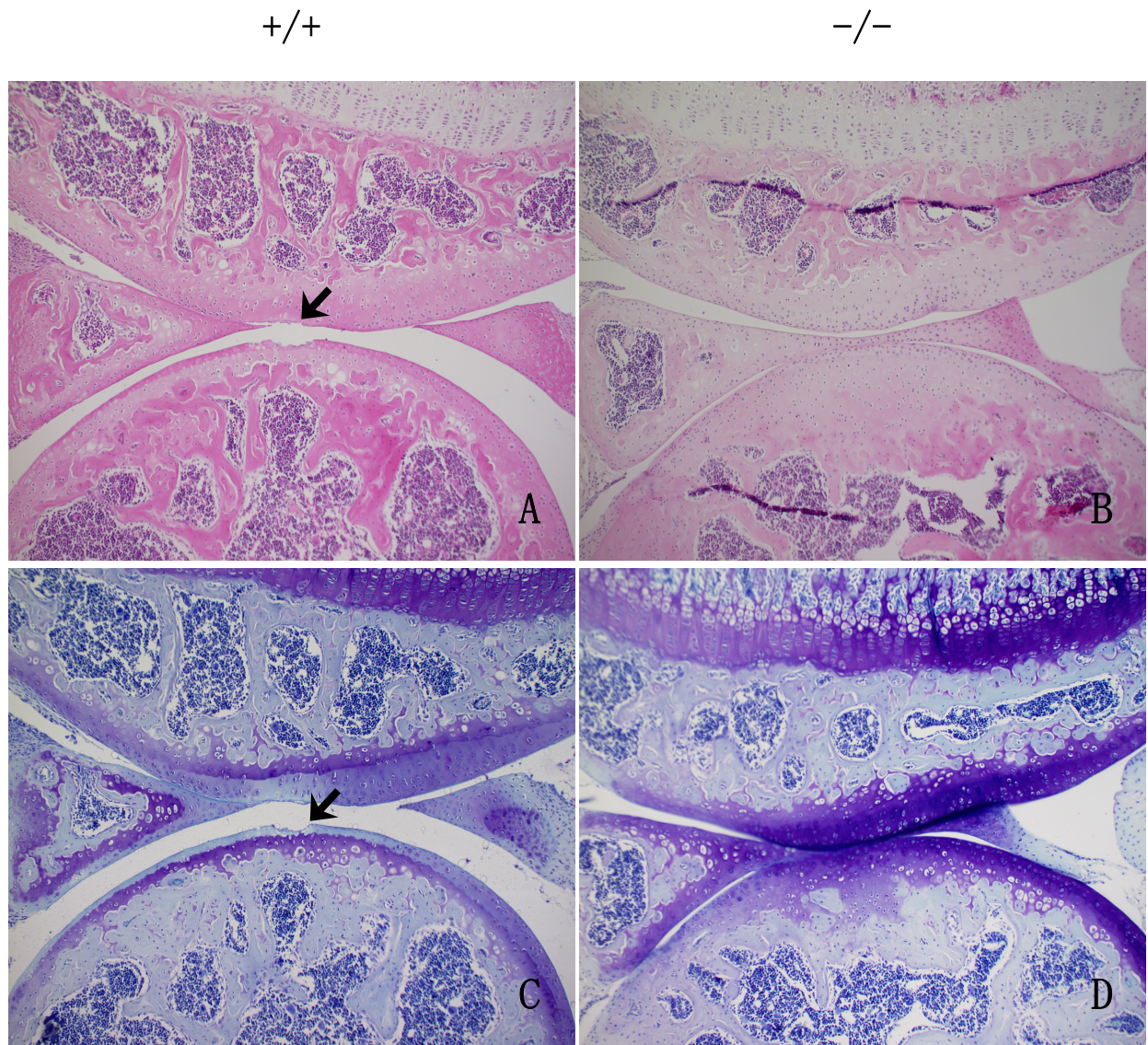


図3-5 HtrA1遺伝子欠損マウスを用いた関節炎誘導後の膝関節

A, C: 野生型マウス, B, D: HtrA1遺伝子欠損マウス, A, B: HE染色, C, D: Toluidine blue染色  
 野生型マウスでは関節炎の破壊 (A, 矢印) や関節軟骨表面でのプロテオグリカンの消失が観察された (C, 矢印)。欠損型マウスでは関節軟骨の破壊がほとんど観察されなかった (B, D)。

#### 第 4 章

II型コラーゲンのプロモーターの下流でHtrA1を軟骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスの作製および、

I型コラーゲンのプロモーターの下流でHtrA1を骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスの作製

## 結果

これまでに HtrA1 が軟骨や骨で特徴的な発現を示すこと、また、関節炎の関節軟骨で HtrA1 の発現が上昇することを報告してきた。そこで、さらに詳細に HtrA1 の軟骨や骨での機能を調べることを試みた。そこで、HtrA1 を軟骨や骨で過剰発現させたときに軟骨や骨の形成にどのような変化が見られるのか軟骨で特異的には発現する II 型コラーゲンのプロモーターを用いたトランスジェニックマウスと、骨で特異的に発現する I 型コラーゲンのプロモーターを用いて HtrA1 を骨や軟骨で過剰発現させたマウスを作製した。

### II 型コラーゲンのプロモーターの下流で HtrA1 を軟骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス (Col II-HtrA1 TG) の作製

II 型コラーゲンのプロモーター (1.0 kb) (Ueta et al., 2001) の下流に rabbit  $\beta$  globlin intron cassette, HtrA1 全長の cDNA、SV40 polyA, enhancer を持つプラスミドを作製し、軟骨で HtrA1 を過剰発現するトランスジェニックマウスのプラスミドを作製した (図 4-1A)。

プラスミドを C3H/He と C57BL/6J の F1 マウスの受精卵へのインジェクションし、42 匹のマウスが生まれた。それらのマウスのうち、12 匹がゲノム DNA 中に Col II-HtrA1 のプラスミドが挿入されたトランスジェニックマウスであった。それらのトランスジェニックマウスは C57BL/6J マウスへのバッククロスを行なっている。発現量の変化を調べるために、生後 0 日目のマウスの骨端軟骨からタンパク質を抽出し、Western blotting を行なった (図 4-1B)。現在、平均して約 3 倍の HtrA1 タンパク質の発現の上昇が見られる 4 ラインのマウスを維持している。

生後 0 日目のマウスの脛骨の免疫染色を行ない、組織内での HtrA1 タンパク質の分布を調べたところ、Col III-HtrA1 TG マウスでは、野生型マウスでは発現が見られない (図 4-2A、C)、骨端の軟骨凝集部の中心部に HtrA1 タンパク質が存在していた (図 4-2B、D)。Col III-HtrA1 TG マウスで HtrA1 タンパク質が見られた部分は、軟骨細胞の数が少なく、軟骨基質が多くなっているようであった (図 4-2F)。

生後 2 ヶ月の成体マウスでは成長軟骨板で HtrA1 のタンパク質量の増加が確認できたが、関節軟骨ではあまり増加していなかった (図 4-3B、D)。このトランスジェニックマウスは通常 HtrA1 タンパク質が見られ

ない軟骨の基質に HtrA1 が蓄積しているマウスであることが確認された。

4 ライン中 1 ラインのトランスジェニックマウスの後ろ足の踵骨と立方骨の間の関節形成に異常が見られるマウスがいた (図 4-4、4-5)。軟骨とその他の組織を染め分けるためにサフラニン 0-ファストグリーン染色を行なった。サフラニン 0 は軟骨を赤く染色し、その他の組織はファストグリーンによって緑色に染色される。サフラニン 0 で染色すると野生型マウスは踵骨と立方骨が靭帯でつながれ、関節が見られるが (図 4-4A、B)、トランスジェニックマウスでは踵骨の軟骨の真ん中に丸い軟骨ではない組織が見られた (図 4-4C、D)。その部分は HtrA1 タンパク質が蓄積していた (図 4-4E、F)。同腹子の連続切片では踵骨と立方骨の間に軟骨とは異なる組織があり、それは徐々に大きくなり、靭帯を形成しているが (図 4-5F)、この部分に野生型マウスのような (図 4-4A、B) 正常な関節は形成されていなかった (図 4-5)。この部分以外の関節は正常に形成されていた。

この現象は HtrA1 を軟骨で過剰発現させたことにより、関節形成を制御している TGF- $\beta$  ファミリーのサイトカインとのバランスが崩れたために踵骨での関節軟骨の形成に異常が起きたと示唆される。しかし、このライン以外にはこの異常が見られないことから、このプラスミドが挿入された場所にある遺伝子に変異が起きたために関節の形成に異常が起きたことも考えられる。

## 考察

軟骨細胞で特異的に発現する II 型コラーゲンのプロモーターを用いたトランスジェニックマウスの軟骨における HtrA1 タンパク質の発現は平均して 3 倍上昇しており (図 4-1)、生後 0 日目のマウスの骨端軟骨や 2 ヶ月齢のマウスの成長軟骨板に HtrA1 タンパク質が蓄積していることが確認された (図 4-2)。このトランスジェニックマウスは外見上、異常は見られなかった。

Col II-HtrA1 TG マウスにおいて、骨端軟骨で HtrA1 が発現している部分は、野生型の同じ部分に比べ、軟骨細胞の数が少なく、基質が多かった。正常なマウスで、HtrA1 は肥大軟骨細胞で発現が見られる。そのことから、HtrA1 を発現している軟骨細胞は肥大軟骨細胞へと分化が進み、細胞が吸収され、細胞の密度が減ったため、その周りの基質の量が増えたことが考えられる。

トランスジェニックマウスのうち、1 ラインの生後 0 日目のマウスの踵骨と立方骨の分離ができず、関節ができていないマウスが見られた (図 4-3、4)。このラインのマウスの中には軟骨の中に軟骨以外の組織があり、その部分には HtrA1 タンパク質が存在していた (図 4-3)。踵骨部分以外の関節は正常に形成されているようであった。TGF- $\beta$  ファミリーの GDF5 は関節の形成部位に発現しており、ノックアウトマウスは関節形成に異常が見られる (Francis-West et al., 1999、Settle et al., 2003)。また、TGF- $\beta$  ファミリーの BMP のアンタゴニストである Noggin の遺伝子欠損マウスは関節の形成されないマウスである (Brunet et al., 1998)。関節形成には TGF- $\beta$  ファミリーとそのアンタゴニストのバランスが重要であると考えられている。HtrA1 も TGF- $\beta$  のシグナルを阻害することから、この踵骨の関節形成の異常は軟骨で過剰発現した HtrA1 により TGF- $\beta$  のシグナルが阻害されたことによる異常かもしれない。

異常が見られたのは踵骨部分のみで、今回使用したプロモーターが踵骨で特に発現が多いという報告はなく、なぜ踵骨部分にだけ影響が出たのかはよく分からない。しかし、この異常はこのラインのマウスでしか観察されないことから、このプラスミドが、関節形成などに関わる遺伝子の中に挿入され、そのために関節が正常に形成されなかった可能性も考えられる。

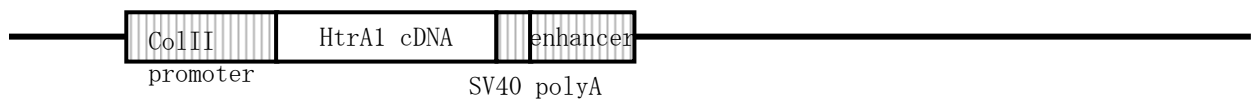
Col II-HtrA1 TG は現在バッククロス中で、詳しい解析はこれからである。今後、Col II-HtrA1 TG の関節形成などに注目して解析を行なっていく必要がある。

また、正常では発現していない軟骨細胞で発現することから、関節炎誘導を行ない、どのような変化が見られるか調べることで、さらに HtrA1 と関節炎との関係が明らかになると期待される。



A

Type II collagen promoter-HtrA1 transgenic mouse vector



B

ColIII-HtrA1 TG

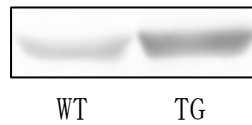


図4-1 軟骨でHtrA1を過剰発現させるトランスジェニックベクターと  
HtrA1タンパク質の発現量

A: トランスジェニックマウス作製用ベクター、

B: 各トランスジェニックマウス中のHtrA1タンパク質の発現量

A、軟骨発現用ベクター、II型コラーゲン(ColII)プロモーターの下流にHtrA1 cDNAを組み込んだ。

B、生後0日目の軟骨中のHtrA1タンパク質量。約3倍上昇している。

wild type

Col II-HtrA1 TG

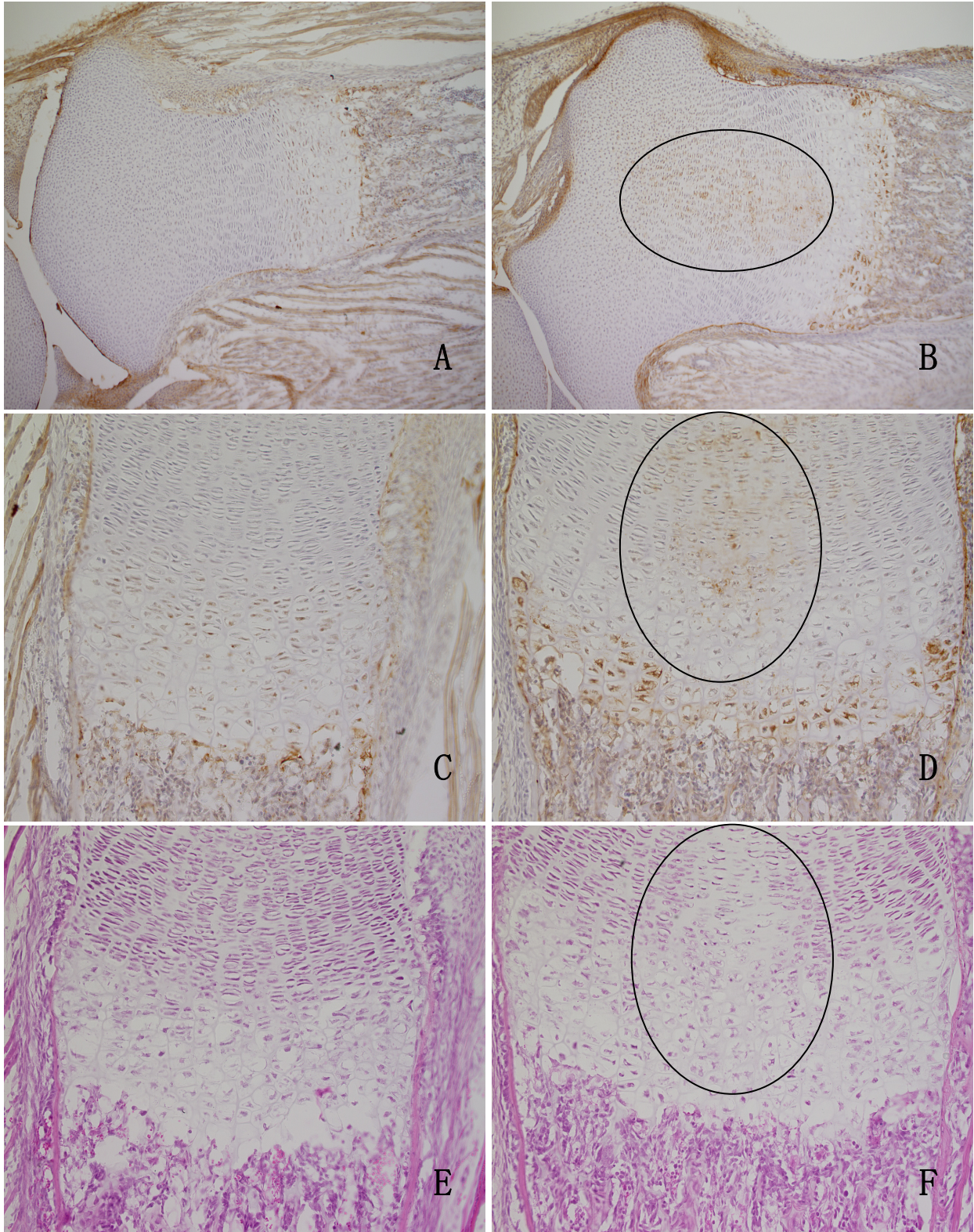


図4-2 生後0日目のType II collagen-HtrA1トランスジェニックマウス (Col II-HtrA1 TG)の軟骨でのHtrA1タンパク質の発現の変化

A, C, E: 野生型、B, D, F: Col II-HtrA1トランスジェニックマウス、C, DはA, Bの拡大図  
A, B, C, D: 抗HtrA1抗体による免疫染色、E, F: HE染色

トランスジェニックマウスの丸で囲った部分でHtrA1タンパク質の蓄積が見られ(B, D)、軟骨細胞の数が減り、基質が増えているように見える。

wild type

Col II-HtrA1 TG

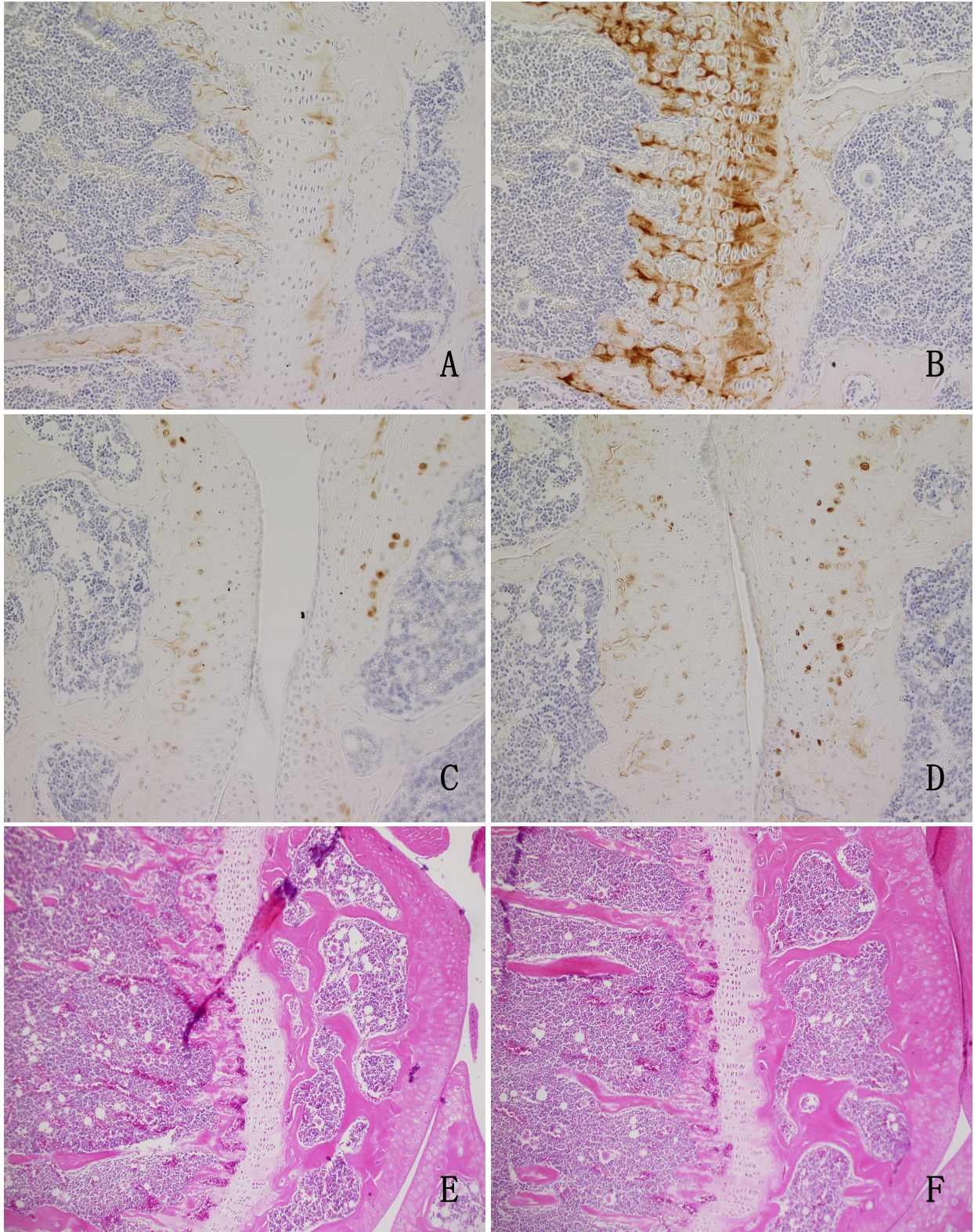


図4-3 2ヶ月齢のType II collagen-HtrA1トランスジェニックマウスの軟骨でのHtrA1タンパク質の存在部位

A, C, E: 野生型、B, D, F: Col II-HtrA1トランスジェニックマウス

A, B, C, D: 抗HtrA1抗体による免疫染色、E, F: HE染色

トランスジェニックマウスで、成長軟骨板でもHtrA1タンパク質量が増加している(B)。関節軟骨ではあまり増加は見られない(D)。

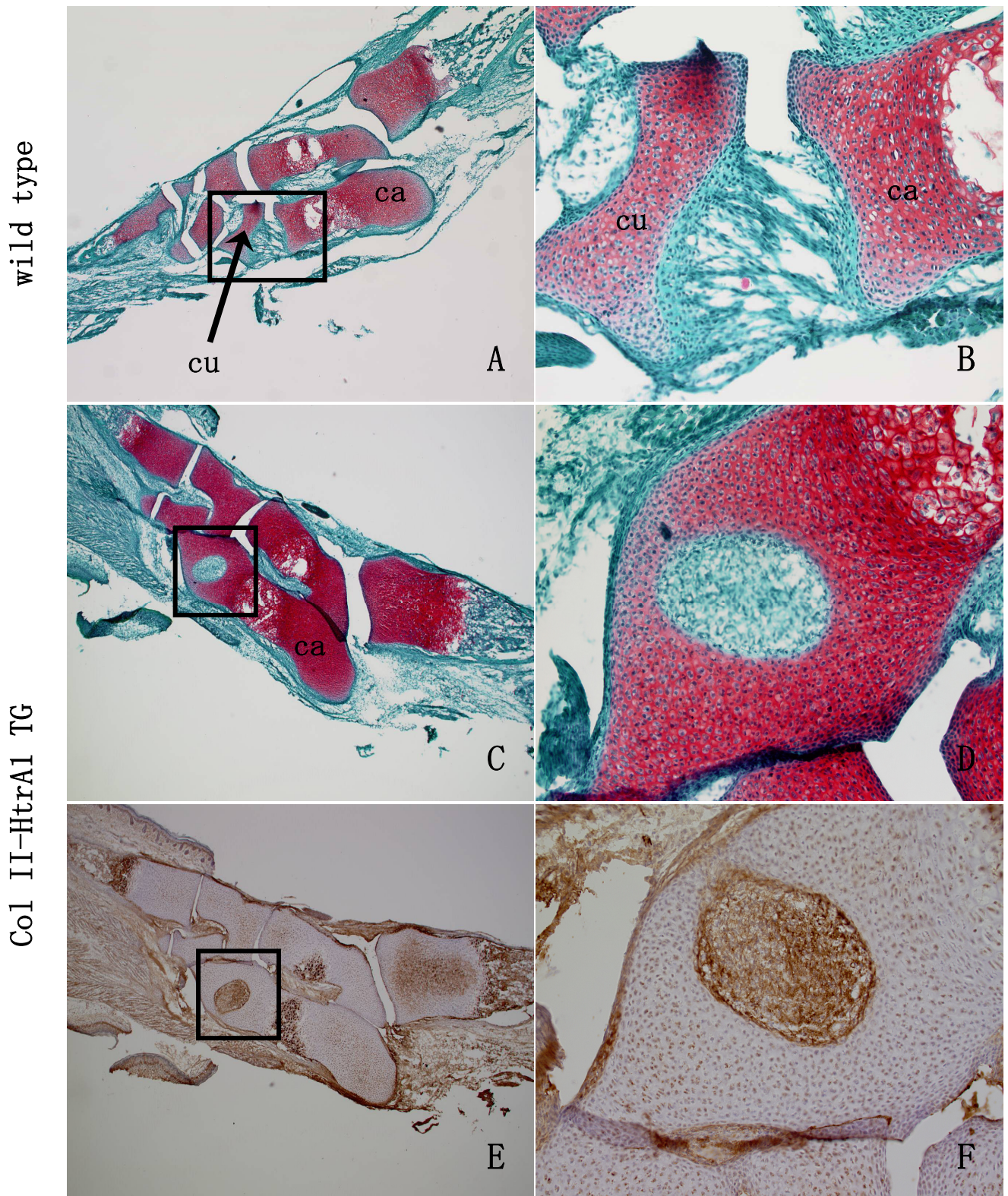


図4-4 Type II collagen-HtrA1トランスジェニックマウス(Col II-HtrA1 TG)の後ろ足の踵骨部分

A, B: 野生型マウスの踵骨、C, D, E, F: Col II-HtrA1 TGマウスの踵骨、B, D, FはA, C, Eの拡大図  
A, B, C, D: サフラニンO染色(軟骨細胞が赤色に染色される)、E, F: 抗HtrA1抗体による免疫染色

ca: 踵骨、cu: 立方骨

野生型マウスの踵骨と立方骨は靭帯をはさんで、分離しているが、Col II-HtrA1 TGマウスの踵骨と立方骨は分離されておらず、踵骨の中に軟骨以外の組織が見られ(C, D)、その部分にHtrA1タンパク質は蓄積していた(E, F)。

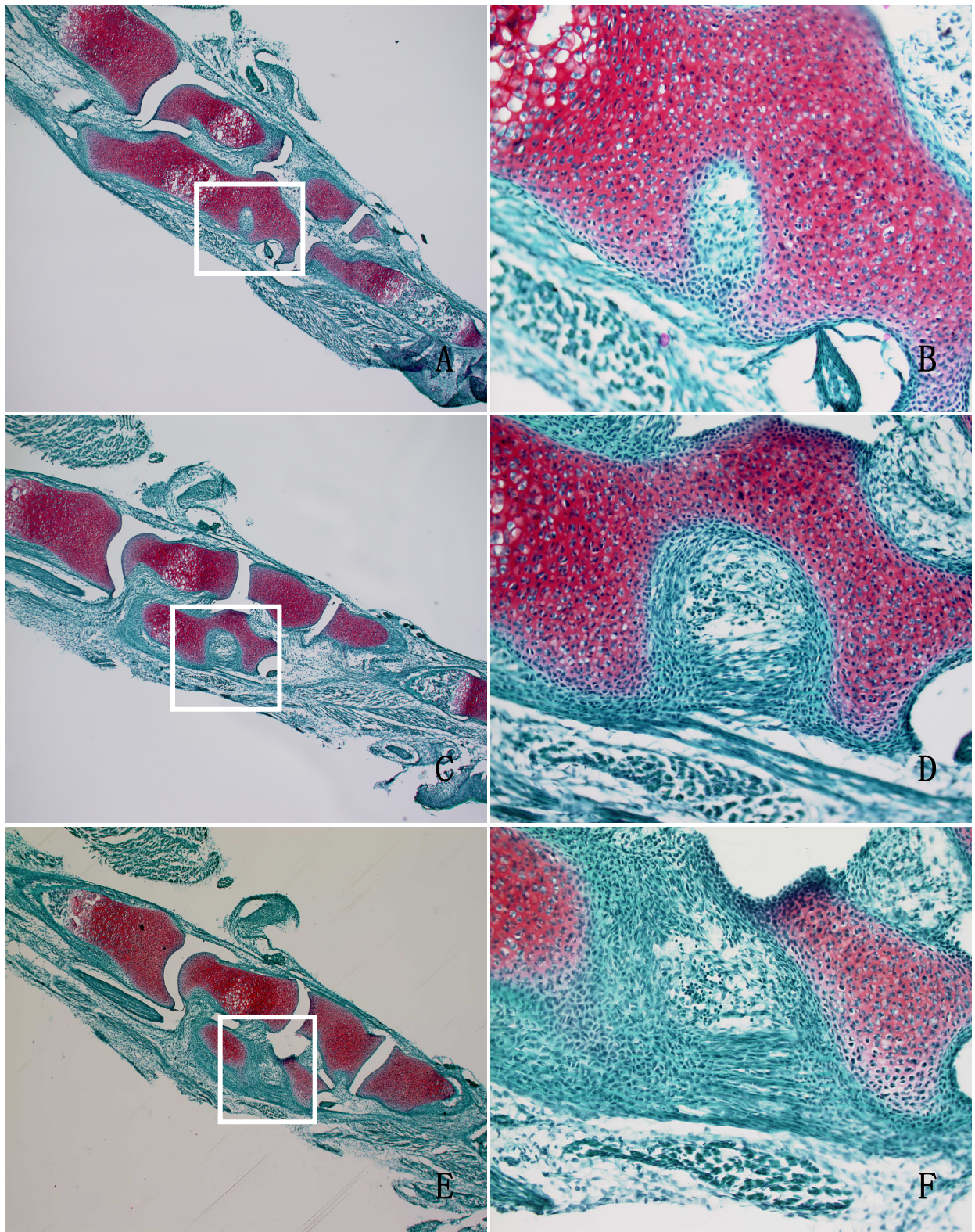


図4-5 Type II collagen-HtrA1 トランスジェニックマウス (Col II-HtrA1 TG)の後ろ足の  
踵骨部分

サフラニンOにより、軟骨が赤く染色されている。

A, C, Eは連続切片で、踵骨内の軟骨外組織が徐々に大きくなり、最終的に靭帯になっていた。

## 結果

### I 型コラーゲンのプロモーターの下流で HtrA1 を骨特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス (Col I-HtrA1 TG) の作製

骨で HtrA1 を特異的に過剰発現させるために骨芽細胞が発現している I 型コラーゲンのプロモーター (Rossert et al., 1995、Liu et al., 2001) を用いてトランスジェニックマウスの作製を行なった。

I 型コラーゲンのプロモーター (2.3 kb) の下流に HtrA1 全長の cDNA (2.0 kb)、SV40 polyA を持つプラスミドを作製し、骨で HtrA1 を過剰発現するトランスジェニックマウスのプラスミドを作製した (図 4-6A)。

プラスミドを C3H/He と C57BL/6J の F1 マウスの受精卵へのインジェクションし、26 匹のマウスが生まれた。それらのマウスのうち、5 匹がゲノム DNA 中に Col II-HtrA1 のプラスミドが挿入されたトランスジェニックマウスであった。それらのマウスと C57BL/6 マウスとのバッククロスを行なっている。発現量を調べるために、生後 2 日目のマウスの骨からタンパク質を抽出し、Western blotting を行なった (図 4-6B)。現在、平均して約 4 倍に HtrA1 の発現が上昇している 3 ラインのマウスを維持している、

1 ラインの生後 2 日目のマウスの大腿骨を用いて抗 HtrA1 抗体で免疫染色を行い、組織での HtrA1 の発現を調べた (図 4-7)。Col I-HtrA1 TG マウスの長幹骨では、野生型 (図 4-7A、C) よりも多くの HtrA1 タンパク質が存在していた (図 4-7B、D)。特に骨芽細胞が活発に働き、骨基質を形成している海綿骨の周囲に多くの HtrA1 タンパク質が蓄積していた (図 4-7D、矢印)。Col I-HtrA1 TG マウスの骨は野生型マウスに比べて、骨幹の骨基質が多く存在し (図 4-7A、B)、特に成長軟骨板の下の海綿骨が多く形成されていた (図 4-7E、F)。

## 考察

I 型コラーゲンのプロモーターを用いたトランスジェニックマウスは、生後 2 日目の長管骨での HtrA1 タンパク質の発現量が約 4 倍に上昇していたが（図 4-6）、外見上の異常は見られなかった。長幹骨の組織を観察すると、野生型に比べ、骨に HtrA1 タンパク質が多く蓄積していた。また、Col I-HtrA1 TG では骨基質の量が野生型に比べ多かった（図 4-7F）。

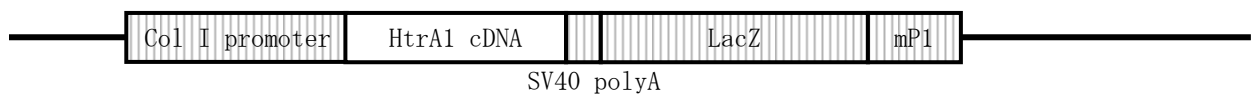
これまで、MMP13 タンパク質の存在部位と HtrA1 が軟骨成分を分解することなどから、HtrA1 は骨基質を分解して骨の再吸収のために働いていると考えてきた。しかし、HtrA1 を骨で過剰発現させると、骨基質量は増加していた。HtrA1 が骨で過剰発現した結果、MMP の活性が阻害され骨吸収の速度が遅くなり、骨基質の量が増加した可能性が示唆された。HtrA1 が MMP13 と同様な領域で発現しているのは、MMP の働きを阻害して、骨代謝の調節をしている可能性が示唆された。

今後は HtrA1 を過剰発現するトランスジェニックマウスの骨芽細胞を用いて、培養細胞や組織培養 (organ culture) の系で、TGF- $\beta$  シグナルとの関係などを調べる材料として役立つマウスだと期待される。

HtrA1 は骨置換の軟骨基質や関節炎の関節軟骨では MMP と同様に軟骨基質の分解を行ない、骨では MMP を阻害して、骨基質の分解を調節していることが示唆された。

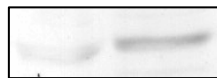
A

Type I collagen promoter-HtrA1 transgenic mouse vector



B

Col I-HtrA1 TG



WT TG

図4-6 骨でHtrA1を過剰発現させるトランスジェニックベクターと  
HtrA1タンパク質の発現量

A: トランスジェニックマウス作製用ベクター、

B: 各トランスジェニックマウス中のHtrA1タンパク質の発現量

A、骨発現用ベクター、I型コラーゲン(Co1II)のプロモーターの下流にHtrA1 cDNAを組み込んだ。  
LacZ遺伝子はプラスミド作製の都合上挿入されている。

B、生後2日目の骨中のHtrA1タンパク質量。約4倍上昇している。



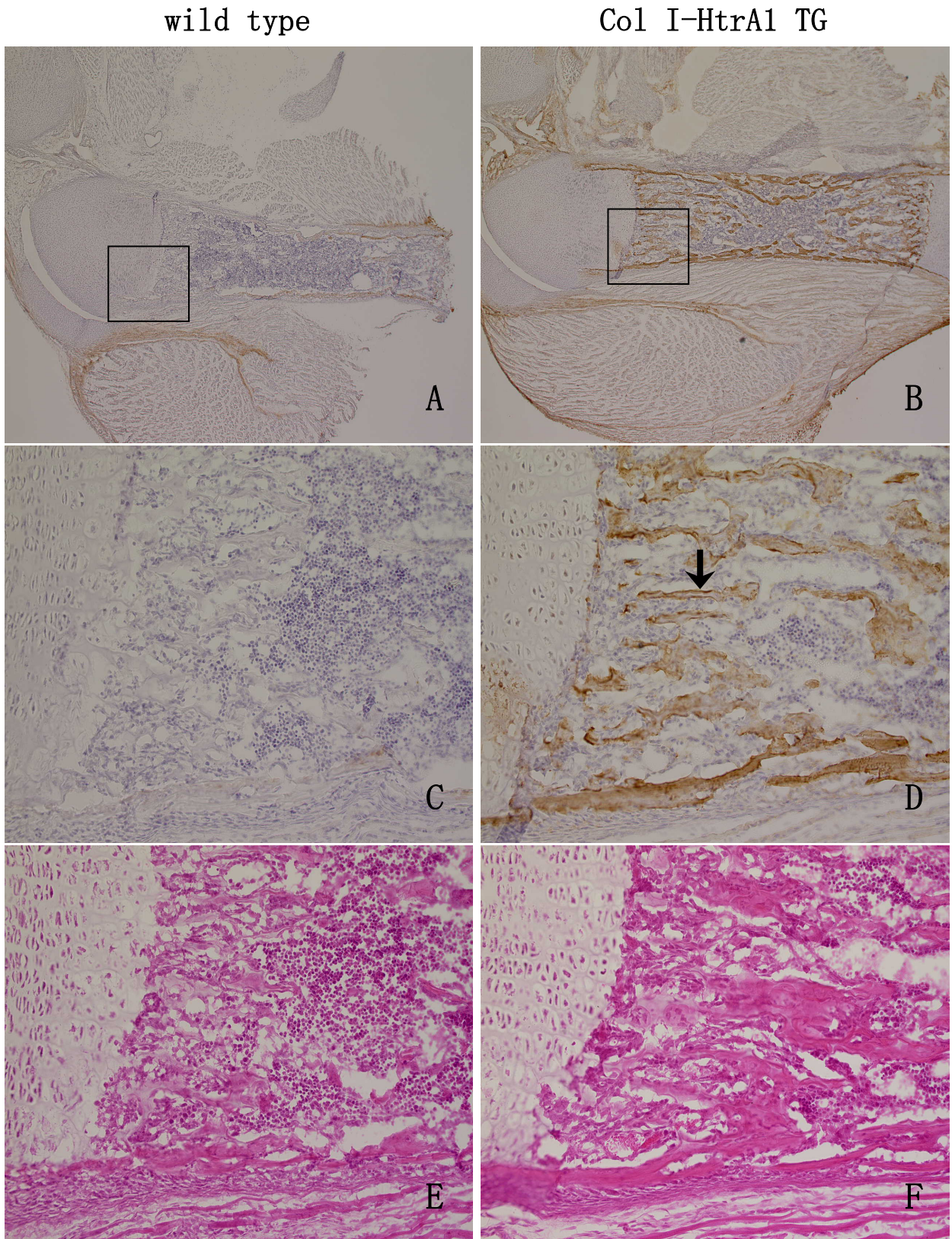


図4-6 生後2日目のType I collagen promoter-HtrA1トランスジェニックマウス

(Col I-HtrA1 TG)の大腿骨でのHtrA1タンパク質の存在部位

A, C: 野生型, B, D: Col I-HtrA1 TGマウス, C, DはA, Bの拡大図、

A, B, C, D: 抗HtrA1抗体による免疫染色, E, F: HE染色

Col I-HtrA1 TGマウスの骨は野生型マウスに比べ(A, C)、明らかなHtrA1タンパク質の増加が確認された(B, D)。Col I-HtrA1 TGマウスでのHtrA1タンパク質は骨の周囲に多く蓄積していた(D、矢印)。Col I-HtrA1 TGマウスでは骨基質が野生型に比べて多い(E, F)。

## 謝辞

本研究を行なうにあたり、動物遺伝子機能学講座、川市正史教授には快適な研究環境と懇切丁寧な御指導を賜りましたことを深く感謝申し上げます。岡千緒助手には組織のことなど全く分からない私に一から実験の技術的な御指導をいただきましたことを心から感謝申し上げます。また、石田靖雅助教授、松田永照助手には多くの有益なご助言をいただきました。ありがとうございました。

東北大学加齢医学研究所の福本学教授には病理標本を見ていただき、たくさんの御助言をいただきましたことを深く感謝申し上げます。東北大学歯学部 笹野泰之教授には骨に関する御助言や *in situ hybridization* の方法を教えていただき、骨での *in situ* がきれいにできるようになりました。心から感謝申し上げます。MCH-*lpr/lpr* マウスを提供してくださった東北大学の森士朗講師、トランスジェニックマウス用のプラスミドを提供いただきました大阪大学医学部の小守壽文先生、抗 Decorin 抗体、抗 Fibromodulin 抗体を提供いただきました NIH の Larry W. Fisher 博士に心から感謝申し上げます。

HtrA1 のノックアウトマウスとトランスジェニックマウスの作製の際に御指導、御協力いただきました遺伝子教育センター動物分子工学部門の山中伸弥教授、三井薫元助手、一阪朋子さん、飯田純子さんに心から感謝申し上げます。また、動物飼育実験施設の利用に当たり、技官の小澤珠代さん、元技官の池口由紀子さん、辰巳さんほか KAC の方のおかげで、快適に動物舎を利用することができました。ありがとうございました。

動物遺伝子機能学講座の先輩、同級生、後輩達のおかげで楽しい 5 年間の研究生活を送ることができました。ありがとうございました。特に、坂本さん、矢野さんには実験に関する多くのことを教えていただき、小島さんにはたくさんのマウスの世話を一緒にしてくれたことを心から感謝します。

最後に私を支えてくれた家族に感謝します。

## 参考文献

Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricala, C., Amantea, A., Noonan, D.M., Albini, A., Natali, P.G., Lombardi, D., and Paggi, M.G. (2002). The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene* 21, 6684-8.

Blanco, F.J., Guitian, R., Vazquez-Martul, E., de Toro, F.J., and Galdo, F. (1998). Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 41, 284-9.

Brandau, O., Aszodi, A., Hunziker, E.B., Neame, P.J., Vestweber, D., and Fassler, R. (2002). Chondromodulin I is dispensable during enchondral ossification and eye development. *Mol Cell Biol* 22, 6627-35.

Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P., and Harland, R.M. (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280, 1455-7.

Burton-Wurster, N., Liu, W., Matthews, G.L., Lust, G., Roughley, P.J., Glant, T.T., and Cs-Szabo, G. (2003). TGF beta 1 and biglycan, decorin, and fibromodulin metabolism in canine cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11, 167-76.

Chien, J., Staub, J., Hu, S.I., Erickson-Johnson, M.R., Couch, F.J., Smith, D.I., Crawl, R.M., Kaufmann, S.H., and Shridhar, V. (2004). A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene* 23, 1636-44.

Clausen, T., Southan, C., and Ehrmann, M. (2002). The HtrA Family of Proteases Implications for Protein Composition and Cell Fate. *Mol Cell* 10, 443-55.

Chubinskaya, S., and Kuettner, K.E. (2003). Regulation of osteogenic proteins by chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1323-40.

Davoli, M.A., Lamplugh, L., Beauchemin, A., Chan, K., Mordier, S., Mort, J.S., Murphy, G., Docherty, A.J., Leblond, C.P., and Lee, E.R. (2001). Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats aged 0-21 days: II. Two proteinases, gelatinase B and collagenase-3, are implicated in the lysis of collagen fibrils. *Dev Dyn* 222, 71-88.

Demoor-Fossard, M., Redini, F., Boittin, M., and Pujol, J.P. (1998). Expression of decorin and biglycan by rabbit articular chondrocytes. Effects of cytokines and phenotypic modulation. *Biochim Biophys Acta* 1398, 179-91.

Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-84.

Dourado, G.S., Adams, M.E., Matyas, J.R., and Huang, D. (1996). Expression of biglycan, decorin and fibromodulin in the hypertrophic phase of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 4, 187-96.

Dreier, R., Grassel, S., Fuchs, S., Schaumburger, J., and Bruckner, P. (2004). Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Exp Cell Res* 297, 303-12.

Francis-West, P.H., Abdelfattah, A., Chen, P., Allen, C., Parish, J., Ladher, R., Allen, S., MacPherson, S., Luyten, F.P., and Archer, C.W. (1999). Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* 126, 1305-15.

Gupta, S., Singh, R., Datta, P., Zhang, Z., Orr, C., Lu, Z., Dubois, G., Zervos, A.S., Meisler, M.H., Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (2004). The C-terminal tail of presenilin regulates Omi/HtrA2 protease activity. *J Biol Chem* 279, 45844-54.

Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L.M., Heinegard, D., Twardzik, D.R., Border, W.A., and Ruoslahti, E. (1994). Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 302, 527-34.

Hill, P.A. (1998). Bone remodelling. *Br J Orthod* 25, 101-7.

Hu, S.I., Carozza, M., Klein, M., Nantermet, P., Luk, D., and Crowl, R.M. (1998). Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 273, 34406-12.

Inada, M., Wang, Y., Byrne, M.H., Rahman, M.U., Miyaura, C., Lopez-Otin, C., and Krane, S.M. (2004). Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci* 101, 17192-7.

Itoh, T., Matsuda, H., Tanioka, M., Kuwabara, K., Itohara, S., and Suzuki, R. (2002). The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol* 169, 2643-7.

Jones, J.M., Datta, P., Srinivasula, S.M., Ji, W., Gupta, S., Zhang, Z., Davies, E., Hajnoczky, G., Saunders, T.L., Van Keuren, M.L., Fernandes-Alnemri, T., Meisler, M.H., and Alnemri, E.S. (2003). Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature* 425, 721-7.

Kingsley, D. M. (1994). The TGF- $\beta$  superfamily : new members, new receptors, and genetic tests of function in different organisms. *Gene&Development* 8, 133-146.

Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M., and Clausen, T. (2002). Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature* 416, 455-9.

Lee, E.R., Lamplugh, L., Davoli, M.A., Beauchemin, A., Chan, K., Mort, J.S., and Leblond, C.P. (2001). Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats ages 0-21 days: I. Two groups of proteinases cleave the core protein of aggrecan. *Dev Dyn* 222, 52-70.

Liu, W., Toyosawa, S., Furuichi, T., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Himeno, M., Narai, S., Yamaguchi, A., and Komori, T. (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol* 155, 157-66.

Martins, L.M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N.F., Lemoine, N.R., Savopoulos, J., Gray, C.W., Creasy, C.L., Dingwall, C., and Downward, J. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 277, 439-44.

Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-91.

Massague, J., and Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14, 627-44.

Mitchell, P.G., Magna, H.A., Reeves, L.M., Lopresti-Morrow, L.L., Yocum, S.A., Rosner, P.J., Geoghegan, K.F., and Hambor, J.E. (1996).

Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 97, 761-8.

Murphy, G., Knauper, V., Atkinson, S., Butler, G., English, W., Hutton, M., Stracke, J., and Clark, I. (2002). Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 4, S39-49.

Murwantoko, Yano, M., Ueta, Y., Murasaki, A., Kanda, H., Oka, C., and Kawaichi, M. (2004). Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. *Biochem J* 381, 895-904.

Neuhold, L.A., Killar, L., Zhao, W., Sung, M.L., Warner, L., Kulik, J., Turner, J., Wu, W., Billingham, C., Meijers, T., Poole, A.R., Babij, P., and DeGennaro, L.J. (2001). Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 107, 35-44.

Nie, G.Y., Hampton, A., Li, Y., Findlay, J.K., and Salamonsen, L.A. (2003). Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2. *Biochem J* 371, 39-48.

Ohtani, H., Kuroiwa, A., Obinata, M., Ooshima, A., and Nagura, H. (1992). Identification of type I collagen-producing cells in human gastrointestinal carcinomas by non-radioactive in situ hybridization and immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 40, 1139-46.

Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiba-Takeuchi, K., Ina, J., Yano, M., Tsuchiya, A., Ueta, Y., Soma, A., Kanda, H., Matsumoto, M., and Kawaichi, M. (2004). HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development*

131,1041-53.

Ortega, N., Behonick, D.J., and Werb, Z. (2004). Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 14, 86-93.

Park, H.J., Seong, Y.M., Choi, J.Y., Kang, S., and Rhim, H. (2004). Alzheimer's disease-associated amyloid beta interacts with the human serine protease HtrA2/Omi. *Neurosci Lett* 357, 63-7.

Rossert, J., Eberspaecher, H., and de Crombrughe, B. (1995). Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J Cell Biol* 129, 1421-32.

Sasano, Y., Furusawa, M., Ohtani, H., Mizoguchi, I., Takahashi, I., and Kagayama, M. (1996). Chondrocytes synthesize type I collagen and accumulate the protein in the matrix during development of rat tibial articular cartilage. *Anat Embryol* 194, 247-52.

Sasano, Y., Zhu, J.X., Tsubota, M., Takahashi, I., Onodera, K., Mizoguchi, I., and Kagayama, M. (2002). Gene expression of MMP8 and MMP13 during embryonic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb. *J Histochem Cytochem* 50, 325-32.

Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E.H., LaBorde, J., Sheehan, D.M., Derynck, R., and Moses, H.L. (1997). Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *J Cell Biol* 139, 541-52.

Settle, S.H. Jr., Rountree, R.B., Sinha, A., Thacker, A., Higgins, K., and Kingsley, D.M. (2003). Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. *Dev Biol* 254, 116-30.



Shridhar, V., Sen, A., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Kovats, S., Lee, J., Lillie, J., and Smith, D.I. (2002). Identification of underexpressed genes in early- and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization. *Cancer Res* 62, 262-70.

Spiess, C., Beil, A., and Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339-47.

Stickens, D., Behonick, D.J., Ortega, N., Heyer, B., Hartenstein, B., Yu, Y., Fosang, A.J., Schorpp-Kistner, M., Angel, P., and Werb, Z. (2004). Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 131, 5883-95.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8, 613-21.

ten Dijke, P., and Hill, C.S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 29, 265-73.

Tocharus, J., Tsuchiya, A., Kajikawa, M., Ueta, Y., Oka, C., and Kawaichi, M. (2004). Developmentally regulated expression of mouse HtrA3 and its role as an inhibitor of TGF-beta signaling. *Dev Growth Differ* 46, 257-74.

Toda, Y., Kono, K., Abiru, H., Kokuryo, K., Endo, M., Yaegashi, H., and Fukumoto, M. (1999). Application of tyramide signal amplification system to immunohistochemistry: a potent method to localize antigens that are not detectable by ordinary method. *Pathol Int* 49, 479-83.

Ueta, C., Iwamoto, M., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Ohmori, T., Enomoto, H., Nakata, K., Takada, K., Kurisu,

K., and Komori, T. (2001). Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol* 153, 87-100.

Vu, T.H., Shipley, J.M., Bergers, G., Berger, J.E., Helms, J.A., Hanahan, D., Shapiro, S.D., Senior, R.M., and Werb, Z. (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-22.

Yang, X., Chen, L., Xu, X., Li, C., Huang, C., and Deng, C.X. (2001). TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol* 153, 35-46.

Zumbrunn, J., and Trueb, B. (1996). Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett* 398, 187-92.

Zumbrunn, J., and Trueb, B. (1997). Localization of the gene for a serine protease with IGF-binding domain (PRSS11) to human chromosome 10q25.3-q26.2. *Genomics* 45, 461-2.

藤井克之、井上一 編集 (2002). 骨と軟骨のバイオロジー 基礎から臨床への展開 金原出版

加藤光保 (2003). トランスフォーミング増殖因子  $\beta$  による転写制御蛋白質核酸酵素 48, 2247-2253.

村上雅人、澁谷正史 (2004). リウマチモデルの新局面 細胞工学 23, 362-365

米田俊之 (2002). 新しい骨のバイオサイエンス 羊土社

所属 (主指導教員)	動物遺伝子機能学講座 (川市 正史教授)		
氏名	土屋 秋穂	提出	平成 17 年 1 月 6 日
題目	セリンプロテアーゼ HtrA1 の軟骨と骨における機能解析		

要旨

HtrA ファミリーは中央にセリンプロテアーゼドメインとその C 末端側に PDZ ドメインを共通して持ち、バクテリアからヒトまで広く分布する。哺乳類には 4 つの HtrA 遺伝子が存在し、このうち HtrA1, 3, 4 は N 末端側に分泌シグナル、IGFBP ドメイン、kazal type protease inhibitor ドメインを持ち、互いに高い相同性を示す。我々は HtrA1 および 3 が広範な TGF- $\beta$  ファミリータンパク質によるシグナル伝達を阻害することを報告した。胎生期において HtrA1 は将来骨を形成する軟骨細胞凝集部周囲の間葉系細胞や腱、靭帯などに発現している。TGF- $\beta$  シグナルは間葉系細胞を軟骨細胞へと分化誘導する。HtrA1 は TGF- $\beta$  シグナルを阻害することから、間葉系細胞を腱や靭帯の細胞へと分化誘導していると示唆している。また、変形性関節炎患者の関節軟骨で HtrA1 の発現が上昇することが報告されている。そこで、出生後の骨形成や関節炎における HtrA1 の役割を解明するために以下の実験を行った。

まず、出生後の長管骨骨端での HtrA1 の発現を *in situ* hybridization と免疫染色によって調べた。この時期、長管骨の骨端に凝集している軟骨細胞は肥大軟骨細胞へ分化して、アポトーシスを起こし、軟骨基質が分解される。これと同時に軟骨凝集部の中央部へ向けて血管が侵入して骨芽細胞が運ばれる。骨芽細胞によって分泌された骨基質は石灰化して骨を形成する (二次骨化中心)。骨化が始まる前の軟骨細胞は HtrA1 を発現していないが、血管の侵入とともに HtrA1 mRNA は二次骨化中心周辺の肥大化した軟骨細胞で発現しはじめる。HtrA1 タンパク質は肥大軟骨細胞周辺や血管が侵入してできた骨組織と接する軟骨基質部分に蓄積しているのが観察された。この部分では活発な軟骨基質の分解が行われている。

抗コラーゲン抗体で誘導したリウマチ性関節炎モデルマウスを作製し、免疫染色によって HtrA1 タンパク質の分布を調べた。その結果、正常マウスでは関節軟骨深層だけに存在する肥大軟骨細胞の周囲に HtrA1 タンパク質が検出された。一方、関節炎マウスの関節では、抗 Type X collagen 抗体で染色される肥大軟骨細胞が関節軟骨層全体に増える。HtrA1 タンパク質は増加した肥大軟骨細胞周囲の基質に蓄積し、関節軟骨全体に広がっていた。関節炎マウスの関節軟骨から抽出したタンパク質中の HtrA1 の発現量は、正常マウスの約 5 倍に上昇していた。さらに、関節軟骨表面が激しく破壊された部分に HtrA1 タンパク質が

大量に蓄積しており、この部分では軟骨成分であるプロテオグリカンの著しい消失が観察された。これらの結果から HtrA1 がプロテアーゼとして軟骨基質を分解している可能性が考えられた。そこで、N 末端側を欠損させた活性型 HtrA1 を大腸菌で発現させ、軟骨から抽出したタンパク質と反応させた。その結果、HtrA1 はプロテオグリカンの Decorin や Aggrecan を分解した。

肥大軟骨細胞での HtrA1 の発現はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 13 の発現と類似している。MMP13 のノックアウトマウスは成長軟骨板の肥大軟骨層が正常のマウスに比べ厚く、骨への置換が遅れる。このことから MMP13 による軟骨基質分解がその後の血管新生や基質の石灰化などの骨形成に影響を与えることが示唆されている。また、MMP13 は関節炎の軟骨でも発現量が増加し、関節軟骨を分解する。HtrA1 が MMP13 と同様の発現パターンを持つことから、HtrA1 が MMP13 と共同して軟骨基質を分解することにより、正常の軟骨分化過程の骨置換を促進させ、関節炎では軟骨破壊を悪化させる可能性が示された。

関節の軟骨細胞は肥大軟骨細胞への最終分化が停止した状態で保たれている特殊な軟骨細胞で、TGF- $\beta$  シグナルが軟骨細胞の分化を抑えている。関節炎により発現量が増加した HtrA1 が TGF- $\beta$  のシグナルを阻害し、関節軟骨細胞の最終分化を促進させ、関節炎をさらに悪化させる可能性が示唆された。

自然発症のリウマチ性関節炎マウス (MCH-1pr/1pr) でも関節軟骨層で HtrA1 タンパク質が増加していた。HtrA1 は病因に関わらず、関節炎を起こした関節軟骨でタンパク質量が増えることから、関節炎の軟骨破壊が共通の機構で進行する可能性が考えられた。

一方、骨において HtrA1 は骨幹の海綿骨や緻密骨あるいは下顎骨で、成熟した扁平な骨芽細胞や骨細胞で発現して分泌され、骨基質に蓄積されているが、特に石灰化していない未熟な骨基質にタンパク質が多く蓄積していた。骨基質は破骨細胞の骨吸収と骨芽細胞の骨形成により維持されている。TGF- $\beta$  は破骨細胞による骨吸収を抑制し、骨形成を促進する。また、MMP13 も扁平な骨芽細胞や骨細胞で発現し、骨基質を分解して、骨基質の代謝を行う。HtrA1 が TGF- $\beta$  シグナルを阻害する働きを持ち、MMP13 の発現パターンと類似していることから、TGF- $\beta$  シグナルの調整役として、また、骨基質の分解酵素として骨の恒常性維持に働いていると考えられる。

HtrA1 の生体内での働きを調べるために、HtrA1 遺伝子欠損マウスを作製したが、顕著な異常は観察されなかった。HtrA3 や 4 が HtrA1 の働きを補っているのかもしれない。また、HtrA1 ノックアウトマウスでも関節炎の誘導を行い、HtrA1 と関節炎との関係を調べた結果、関節の腫れに差は見られなかったが、野生型に比べて、関節軟骨の破壊が弱いようであった。

以上のことから、HtrA1 は骨形成において、TGF- $\beta$  阻害活性により軟骨細胞の分化制御およびプロテアーゼ活性により軟骨基質の分解と骨基質の恒常性維持、関節炎では関節軟骨の分解を行っていると示唆された。