

主論文の要旨

**Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  induces expression of  
type X collagen and matrix metalloproteinases 13  
in osteoarthritic meniscal cells**

〔 変形性関節症、膝半月板細胞において HIF-2 $\alpha$  は  
10 型コラーゲン、MMP-13 の発現を誘導する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻  
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

石塚 真哉

## 【目的】

変形性関節症(OA)は関節軟骨・半月板の変性・破壊や骨棘形成を特徴とする慢性関節疾患である。膝関節の安定性は靭帯、半月板や膝周囲筋によって得られており、その中でも半月板は関節の安定性だけでなく、荷重の分散、衝撃吸収や関節内の潤滑などの重要な役割を果たしている。半月板の断裂や変性は関節軟骨にかかる圧迫力、煎断力などのメカニカルストレスを上昇させ OA の発症、進行を引き起こすことが動物実験や多くの臨床研究によって示されており、膝関節における半月板の重要性は明らかである。OA 軟骨細胞における変化としては OA 変化によって肥大化分化のマーカである type X collagen (COL10) の発現が亢進し、小児の成長軟骨板において観察される軟骨細胞の肥大化分化に類似した変化が OA 変化の中においても生じていることがわかっている。また蛋白分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-13)、血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) などの軟骨内骨化に関連した分子の発現が亢進することがわかっていたが、最近の研究で転写因子 Hypoxia inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) がそれら分子の活性化において中心的役割を果たしているということが報告された。軟骨細胞では OA 変化の初期において HIF-2 $\alpha$  の発現が亢進することがわかっており、それにより COL10 や MMP-13、VEGF といった軟骨内骨化関連分子が直接誘導されることがノックアウトマウスを用いた基礎研究によって示されている。また、MMPs やアグリカネースなどの蛋白分解酵素の産生増加といった OA 関節軟骨でみられるような遺伝子発現の変化が OA の半月板でも観察されることは以前から報告されている。しかし半月板細胞における HIF-2 $\alpha$  と軟骨内骨化に関連した分子の発現変化に関する報告は我々が渉猟しうる限りない。今回の研究の目的は OA 半月板細胞における転写因子 HIF-2 $\alpha$  及び軟骨内骨化関連遺伝子の発現の変化についての評価を行うことである。

## 【方法】

OA 軟骨、半月板は当院で OA 膝に対して行った人工膝関節置換術患者から、nonOA 半月板は円板状半月の半月板切除術患者から採取し、組織の Alcian blue、safranin-0 染色を、また HIF-2 $\alpha$ 、MMP-13、COL10 に対する抗体を用いて免疫組織学的染色を行った。採取した組織から細胞を単離し、単離直後の細胞から mRNA を抽出し各遺伝子の発現量を解析した。半月板細胞を IL- $\beta$  で刺激し各遺伝子の発現量の変化を解析した。また HIF-2 $\alpha$  の発現変化を免疫蛍光染色で解析した。最後に siRNA を用いて HIF-2 $\alpha$  をノックダウンしたのちに COL10、MMP-13 の発現量を解析した。各遺伝子の発現量は RT-PCR、Western blotting、ELISA で評価を行った。統計学的解析として 2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定を行い、 $p < 0.05$  を統計学的に有意差ありとした。

## 【結果】

Non-OA、OA の半月板の alcian blue, Safranin-0 染色で OA 半月板表層での組織変性が観察された (Fig. 1)。OA 半月板の表層では non-OA における細胞と比較し

肥大軟骨層で見られるような大型で細胞質の大きい細胞が多数観察された。OA 半月板細胞における HIF-2 $\alpha$  及び MMP-13、COL10、VEGF の発現は non-OA 半月板に比し有意に高かった。また、OA 半月板細胞における HIF-2 $\alpha$ 、MMP-13、COL10 の mRNA の発現は OA 軟骨細胞と同程度であった (Fig. 2)。免疫組織化学染色で HIF-2 $\alpha$ 、MMP-13、COL10 は OA 半月板と OA 軟骨で類似した染色パターンを示した (Fig. 3)。培養半月板細胞における HIF-2 $\alpha$ 、MMP-13、COL10 の発現は IL- $\beta$  によって亢進することが確認された (Fig. 4)。また、HIF-2 $\alpha$  のノックダウンは IL- $\beta$  による MMP-13、COL10 の発現亢進を抑制し (Fig. 5)、また HIF-2 $\alpha$  の過剰発現により MMP-13、COL10 の発現は亢進した (Fig. 6)。

### 【考察】

今回の結果から関節軟骨細胞で発現が亢進し、軟骨内骨化関連分子を活性化することが報告されている転写因子 HIF-2 $\alpha$  が、半月板細胞でも発現しており、OA 変化によって亢進していることがわかった。OA 軟骨における関節軟骨での軟骨内骨化に関連した分子の発現は以前から報告されており、2010 年、斉藤らによって HIF-2 $\alpha$  が COL10 のプロモーターに対し強い転写活性を示し、更に MMP-13、VEGF といった他の軟骨内骨化関連分子のプロモーターの各応答配列にも直接結合して転写を誘導することが示された。また、Siyong Yang らによって軟骨細胞での HIF-2 $\alpha$  の発現亢進が MMP-1, -3, -13 や ADAMTS4 といった軟骨基質分解酵素の発現を誘導することが示された。一方、半月板細胞は形態や遺伝子発現パターンから 1 種類ではないと考えられており、その中には fibro-chondrocyte と呼ばれる軟骨細胞様の性質をもった細胞が存在していることが最近の研究で示されている。しかし、半月板細胞における HIF-2 $\alpha$  と軟骨内骨化関連分子の発現の変化に関する報告は現在までにない。今回の結果から OA 半月板細胞において HIF-2 $\alpha$  の発現が亢進し MMP-13、COL10 の発現を誘導していることが示唆された。半月板細胞における HIF-2 $\alpha$  の発現亢進によって、活性化された MMP-13 などの蛋白分解酵素を含む軟骨内骨化関連因子により半月板の変性が進行し、膝関節の力学的な安定化機構として重要な半月板組織の破綻に至り、関節軟骨に過度のメカニカルストレスがかかることで OA の進行に寄与すると考えられる。また半月板細胞で産生されたこれらの因子は、直接半月板に変性をもたらすだけでなく、関節液中に放出されることで間接的に関節軟骨の変性をも促す可能性もあるため、HIF-2 $\alpha$  は軟骨細胞と同様に半月板細胞でも治療標的となりうるということが今回の結果によって示唆された。

### 【結論】

転写因子 HIF-2 $\alpha$  は OA 軟骨細胞と同様に OA 半月板細胞でも発現が亢進しており、OA 半月板細胞において MMP-13、COL10 を誘導していることが示唆された。HIF-2 $\alpha$  は関節軟骨と同様に半月板においても OA 進行に対する治療標的となりうるということが今回の研究により示された。