

## 論文内容の要旨

申請者氏名 土屋 秋穂

HtrA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つセリンプロテアーゼのファミリーであり、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、互いに高い相同性を示す。申請者らは既に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、胎生期の発現パターンを詳細に解析している。胎生期では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、関節領域に発現しており、TGF- $\beta$ シグナルを阻害して間葉系細胞の分化を制御していることが示唆されている。また、HtrA1は変形性関節炎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。そこで、本論文では正常の骨形成や関節炎を起こした軟骨におけるHtrA1の役割を解明するために以下の実験を行った。

まず、出生後のマウスの骨や軟骨でのHtrA1の発現をin situ hybridizationと免疫染色によって調べた。その結果、将来骨を形成する軟骨凝集部では、血管が侵入し骨化が始まると、骨化部位周辺の肥大化した軟骨細胞がHtrA1を発現しはじめた。また、成体の骨の中で軟骨組織が残る成長板においても肥大化した軟骨細胞がHtrA1を発現していた。いずれの場合もHtrA1タンパク質は軟骨基質に蓄積していた。

抗コラーゲン抗体を注入してリウマチ性関節炎様症状を誘導したマウスの関節では肥大軟骨細胞が増えるとともに、肥大軟骨細胞がHtrA1を大量に発現し始めた。

一方、成体の骨においては、HtrA1は成熟した扁平な骨芽細胞や骨基質に埋まった骨細胞で発現しており、HtrA1タンパク質は骨基質に大量に蓄積されていた。

肥大軟骨細胞や扁平な骨芽細胞、あるいは骨細胞に共通した特徴は、これらの細胞がMMP13をはじめとする種々のマトリックスメタロプロテアーゼを産生し、軟骨基質の分解や骨基質の吸収を促進して、軟骨の骨組織への置換や骨のリモデリングの過程に関与していることである。実際、抗MMP13抗体で免疫染色すると、HtrA1産生細胞とMMP13産生細胞は多くの場合一致していた。以上のことから、正常の骨組織では、HtrA1は軟骨や骨の基質を吸収して骨への置換やリモデリングを促進し、一方、関節炎においては、過剰発現したHtrA1は軟骨基質を分解して関節炎を悪化させる因子であることが示唆された。

そこで、HtrA1遺伝子破壊マウスを作成し、関節炎を誘導して、正常マウスの関節炎と比較した。その結果KOマウスでは、関節炎の腫脹などの症状もまた組織学的な関節の破壊像も、正常に比べると弱いものであった。また、実際にHtrA1タンパク質には、軟骨基質の主成分であるタイプIIコラーゲンの可溶化された分子や、アグリカンやデコリンなどのプロテオグリカンを組織内あるいは試験管内で分解する活性があることを証明した。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 土屋 秋穂

## 要旨

哺乳類の HtrA 1 遺伝子は細胞外に分泌されるセリンプロテアーゼであり、分子中にプロテアーゼドメインの他に、IGFBP ドメイン、Kazal type protease inhibitor ドメイン、PDZ ドメインなど多彩な機能的ドメインを持つ。HtrA1 はこれまで、癌の悪性化や転移を抑制する癌抑制遺伝子の候補として報告され、また、ヒトの変形性関節炎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。しかし、HtrA1 プロテアーゼの生理的な基質や生理機能は不明であった。申請者は、胎児期の HtrA1 は主に骨格系組織に発現することと、HtrA1 が TGF- $\beta$  ファミリーのシグナル伝達を阻害することに注目し、TGF- $\beta$  ファミリーが発生制御に大きくかかわる骨と軟骨における HtrA1 の機能を検討した。

まず、出生後の軟骨組織での HtrA1 の発現を *in situ hybridization* と免疫染色によって調べた。その結果、将来骨に置換される新生児期の軟骨凝集部あるいは成体の成長板においては肥大化した軟骨が HtrA1 を産生していることを明らかにした。また、リウマチ性関節炎のモデルマウスにおいてもヒトの変形性関節炎と同様に、HtrA1 タンパク質が著明に増加しており、肥大化した軟骨細胞が HtrA1 を産生していることを証明した。肥大軟骨細胞とは最終分化した軟骨細胞であり、MMP13 をはじめとする種々のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を産生し、周囲の軟骨基質を分解して骨組織への置換を促進する機能を持っている。したがって、HtrA1 は正常の組織では軟骨組織の骨への置換を促進し、また関節炎の病的組織では、基質を分解して、関節炎を悪化させる因子であると推察された。これを証明するために、申請者は HtrA1 遺伝子破壊マウスを作成し、関節炎を誘導した。その結果、予想通り KO マウスでは関節炎の症状も組織的な軟骨破壊像も正常マウスに比べ、弱いものであった。

一方、骨組織においては、HtrA1 は扁平な骨芽細胞と骨細胞により産生され骨基質中に多量に蓄積していた。この2種の骨の細胞も MMP を産生し、骨のリモデリングにかかわっていることが知られている。これらの結果から、申請者は、HtrA1 が軟骨や骨の吸収に働くセリンプロテアーゼであることを明らかにした。

以上のように、本論文はこれまで MMP が重要な役割を果たすと考えられていた軟骨の骨への置換や骨のリモデリングに、セリンプロテアーゼも関わることを明らかにし、また、別個の病気と考えられていた変形性関節炎とリウマチ性関節炎における軟骨破壊に共通の機構が存在することを明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。