

別記様式第 6 号 (第 16 条第 3 項, 第 25 条第 3 項関係)

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	高田 剛志
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Bach1 deficiency reduces severity of osteoarthritis through upregulation of heme oxygenase-1 (Bach1 ノックアウトマウスは加齢性および実験的変形性関節症の症状を軽減する)			
論文審査担当者			
主査	教授 青山 裕彦	印	
審査委員	教授 杉山 英二		
審査委員	教授 本田 浩章		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>変形性関節症 (OA) は日常診療において, 最もよくみられる疾患の一つである. OA の発症には, 加齢, メカニカルストレス, 酸化ストレスなど様々な因子による軟骨恒常性の破綻が関与していると考えられている. 酸化ストレスは過剰に産生された活性酸素種 (ROS) により生じると言われており, その抑制が OA の予防や治療に繋がるのではないかと期待される. 本研究は, 抗酸化酵素として知られる heme oxygenase-1 (HO-1) を恒常的に発現している BTB and CNC homology 1 (Bach1) 欠損マウスを用いて, OA の病態における HO-1 の役割について解析した.</p> <p>HO-1 は, ヘムの分解を介して抗酸化や抗炎症といった細胞保護作用に働くことが知られており, これまでに様々な疾患における病態の進行に対する予防効果が示されてきたが, OA におけるその役割は明らかになっていない. また, Bach1 は HO-1 遺伝子の転写抑制因子である.</p> <p>Bach1 ノックアウト (Bach1^{-/-}) マウスの HO-1 の発現を DNA マイクロアレイ, リアルタイム PCR, ウェスタンブロッティング, 免疫染色で評価した. 1 ヶ月齢 Bach1^{-/-}の軟骨細胞では, 野生型と比較して HO-1 の発現が増加していた. しかし, <i>Col2a1</i>, <i>Acan</i>, <i>Mmp13</i> などの軟骨関連遺伝子の発現に変化は認めなかった. 22 ヶ月齢野生型マウスの関節軟骨では, HO-1 は加齢に伴い有意に減少していた. 一方, Bach1^{-/-}マウスでは野生型マウスと比較して有意に HO-1 が高発現していた.</p> <p>Bach1^{-/-}マウス膝関節の組織学的変化を 6, 12, 22 ヶ月齢の加齢モデルおよび内側脛骨半月靭帯と内側側副靭帯を切除して作成した OA 誘導モデルを用いて, サフラニン O 染色を行い OA スコアにより評価した. Bach1^{-/-}マウスの加齢モデルでは, 12 ヶ月齢以降, 野生型に比べ OA の重症度が低下していた. 22 ヶ月齢では, 滑膜炎, 半月板の変性などのス</p>			

コアが有意に低く、関節軟骨以外の OA 変化の進行も抑制されていた。一方、OA 誘導モデルでは、Bach1^{-/-}マウスの OA の重症度は、野生型に対して、有意に低下していたが、その他の関節内組織のスコアについては、半月板を除いて、有意差は認めなかった。

つぎに HO-1 の下流で働くものの候補として、HO-1 と同様、ROS を介する細胞障害を抑制するとされる superoxide dismutase 2 (SOD2)、およびオートファジーのマーカーである microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) について検証した。その発現を免疫染色により評価したところ、Bach1^{-/-}マウスでは、野生型マウスと比較して有意に増加していた。HO-1 とこれらの関連を調べるため、関節軟骨に small interfering RNA (siRNA) 導入し HO-1 をノックダウンした。リアルタイム PCR、ウエスタンブロッティングを用いて発現を評価したところ、SOD2 のタンパクの発現は有意に低下していたが、LC3 の低下は見られなかった。

最後に、アポトーシスアッセイを行い軟骨細胞における HO-1 のアポトーシスとの関係性を評価した。tert-butyl hydroperoxide によりアポトーシスを誘導したところ、Bach1^{-/-}マウスの軟骨細胞ではアポトーシス誘導が抑制された。一方、HO-1 のノックダウンにより有意にアポトーシスが誘導された。

以上のように、Bach1^{-/-}マウスでは OA の進行が抑制されており、その抑制は、関節軟骨における、HO-1 の発現上昇、SOD2 発現の亢進、オートファジーの活性化およびアポトーシスの抑制によるものであり、また HO-1 の siRNA によるノックアウト実験から、これらの現象が HO-1 を介したものであることが示唆された。この結果から、HO-1 の発現をコントロールすることにより、関節の恒常性維持や関節破壊の予防に寄与する可能性があると考えられる。

以上の結果から、本論文は HO-1 研究が OA の病態の解明および新規治療薬の開発の一助となる可能性を示しており、整形外科の発展に貢献することが大きい。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するのに十分な価値があると認めた。