

# 先天性股関節脱臼の病態解析による関節メカニカルストレス応答機構の分子生物学的解析

岐阜大学 整形外科  
河村真吾

## 【緒言】

関節にかかるメカニカルストレスは関節形成において重要であり、成長段階においてその構造・構成が破綻すると関節は形態形成異常をきたすことが知られている。発育性股関節形成不全症 (developmental dysplasia of the hip, 以下 DDH) は幼少期に股関節が脱臼または亜脱臼することで、関節に適切なメカニカルストレスがかからないことにより関節形態形成に異常をきたす疾患であり、本邦における変形性股関節症の主な原因となっている。1990年代までに、いくつかの研究がなされたが、それらは形態変化の解析が中心であり、詳細な分子生物学的な解析は行われていなかった。DDHに関連するゲノムワイドな研究は未だ行われていないが、近年の候補遺伝子の関連マッピング研究で GDF5, UCC1, MMP24, RETSAT, PDRG1 等のいくつかの関連遺伝子が報告された [1]。この結果は、DDH 発症において胎内での肢位、生後の股関節肢位という既知の物理的原因がある一方で、その発症または進展において遺伝子レベルでの関与があることを示唆するものである。

Wang らは、ラット新生児の股関節および膝関節を伸展位で 10 日間固定する方法で、股関節脱臼モデルラットの作製方法を確立した [2]。我々は、DDH の進展に関わる遺伝子レベルでの分子生物学的変化に着目し、関節形態異常に伴うメカニカルストレス変化が関節軟骨形成や恒常性の維持に与える影響

を明らかにすることを試みた。本研究では、Wang らの方法を用いて股関節脱臼モデルラットを作製し、大腿骨頭および寛骨臼の形成異常についての組織学的評価、脱臼股関節から採取した関節軟骨の遺伝子発現変化の解析を行うことで、メカニカルストレス変化によって引き起こされる分子生物学的変化を明らかにした。本研究の成果は変形性股関節症の早期治療法の開発、そして軟骨の再生治療につながることを期待できると考える。

## 【研究目的】

- (1) ラット股関節脱臼モデルにおいて、大腿骨頭および寛骨臼の形態学的変化、免疫組織学的変化を明らかにする。
- (2) 同モデルラットから採取した軟骨の遺伝子学的解析を行い、関節軟骨形成や変性に関与するメカニカルストレス応答遺伝子を同定する。
- (3) (2) で同定されたメカニカルストレス応答遺伝子が軟骨細胞に与える影響について明らかにする。

## 【研究方法】

新生児ラットをランダムにコントロール群と DDH 群に分け、コントロール群には何も行わず、DDH 群には股関節および膝関節が伸展位となるよう骨盤と後肢にテープを巻きつけて 10 日間固定した。

### (1) 股関節脱臼モデルラットの解析

- ・形態学的解析：股関節脱臼モデルラット

の成長段階における形態変化を X 線，マイクロ CT にて解析した。

・組織学的解析：モデルラットの股関節組織を組織学的（ヘマトキシリン・エオジン染色，サフラニン 0-ファストグリーン染色），また免疫組織化学的（type I コラーゲン，type II コラーゲン，Sox9，Lubricin）手法を用いて解析した。

### (2) メカニカルストレス応答遺伝子の同定

脱臼によりメカニカルストレス負荷のない状態が関節軟骨形成にどのような影響を与えるかを明らかにするために，モデルラットおよびコントロールラットの股関節の関節軟骨を採取し，メカニカルストレス負荷のない状態における遺伝子発現プロファイリングを解析し，軟骨におけるメカニカルストレス応答遺伝子の同定を行った。

### (3) メカニカルストレス応答遺伝子負荷による軟骨細胞の遺伝子発現変化の解析

ラットの関節軟骨から軟骨細胞を採取し，(2)で同定した遺伝子をノックダウンあるいは過剰発現させて軟骨細胞を培養し，遺伝子発現量の変化について調査した。

### (4) メカニカルストレス変化に伴う培養軟骨細胞における遺伝子発現変化の解析

重力可変装置を用いてラット軟骨細胞を培養し，遺伝子発現の変化について調査した。

## 【結果】

(1) 股関節脱臼モデルラットの形態学的変化：生後 10 日，生後 4 週，生後 3 ヶ月においてモデルラットとコントロールラットを比較した。モデルラットでは大腿骨頭の扁平化，寛骨臼の形成不全，線維性組織の異常増殖による新臼蓋の形成を認めた（図 1）。

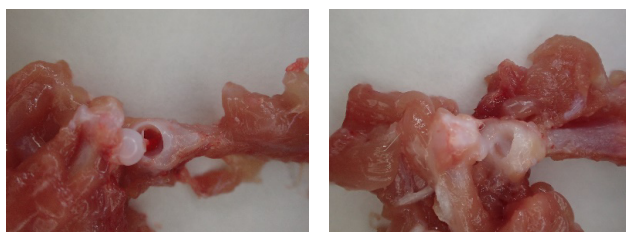


図 1. 股関節の形態変化

左；コントロールラット，右；脱臼モデルラット

(2) 股関節脱臼モデルラットの組織学的変化：ヘマトキシリン・エオジン染色では骨頭の扁平化と寛骨臼の形成不全が確認された（図 2）。さらに Y 軟骨および寛骨臼軟骨では軟骨細胞数の減少と軟骨細胞の配列異常を認めた。サフラニン 0-ファストグリーン染色では大腿骨頭の軟骨基質の染色性の低下を認めた（図 3）。

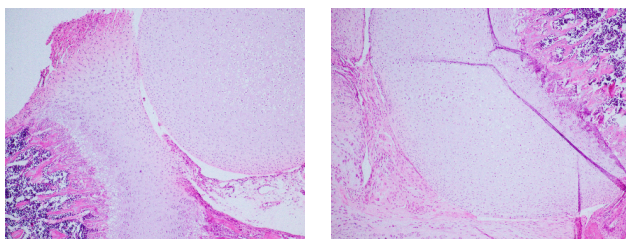


図 2. 股関節組織標本 ヘマトキシリン・エオジン染色

左；コントロールラット，右；脱臼モデルラット

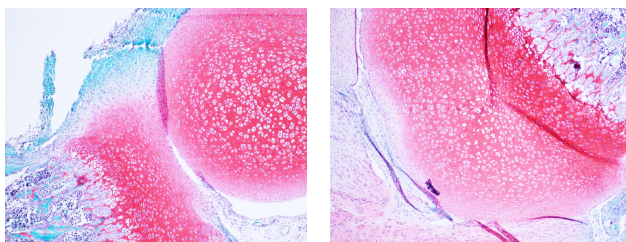


図 3. 股関節組織標本 サフラニン 0-ファストグリーン染色

左；コントロールラット，右；脱臼モデルラット

(3) 股関節脱臼モデルラットの免疫組織学的変化：関節軟骨の type II コラーゲン，type IX コラーゲンの染色性が低下し，type

I コラーゲンの染色性が亢進していた。

(4)EdU アッセイ (細胞増殖アッセイ) : モデルラットの寛骨臼関節軟骨と骨頭軟骨において, EdU 陽性細胞 (細胞増殖期) の減少を認めた。

(5)TUNEL 染色 (アポトーシスアッセイ) : モデルラットの大腿骨頭における TUNEL 陽性細胞 (細胞死) が増加していた。

(6)網羅的遺伝子発現解析 : 4 週齢のモデルラットとコントロールラットから寛骨臼関節軟骨を採取し, 次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現解析 (RNA シークエンス) を行った。コントロール群と比較し, DDH 群で 2 倍以上発現上昇した 21 遺伝子, 1/2 以下に発現低下した 60 遺伝子を同定した。それぞれについて Gene Ontology 解析を行った結果, 高値を示した 21 遺伝子群では cell adhesion に関する遺伝子が多く, 低値を示した 60 遺伝子群では cartilage development に関連した遺伝子 (Collagen type II, Aggrecan, Sox9 等) が多く存在することが示された。さらに, 股関節脱臼モデルラットの関節軟骨及び Y 軟骨では c-fos や FosB 遺伝子を始めとする最初期遺伝子群の発現が著明に低下していた。

### 【考察および今後の方針】

本各種解析の結果から, 寛骨臼関節軟骨と骨頭軟骨において DDH 群で Lubricin, type II コラーゲン, type IX コラーゲンの低下が明らかとなった。次世代シーケンスの結果で c-fos や FosB 遺伝子を始めとする最初期遺伝子群の発現が著明に低下していることから, 脱臼に伴うメカニカルストレス変化によっておこる変化と考えられた。今後は次世代シーケンスの結果の中で, メカニカル

ストレスに応答し, 軟骨形成の抑制あるいは関節軟骨の変性に関わる因子を同定する。DDH 進展における遺伝子の関与を証明することができれば, 新規治療ターゲットとなりうると考えている。

### 参考文献

1. Hatzikotoulas K, Roposch A, Shah KM, Clark MJ, Bratherton S, Limbani V, Steinberg J, Zengini E, Warsame K, Ratnayake M, Tselepi M, Schwartzentruber J, Loughlin J, Eastwood DM, Zeggini E, Wilkinson JM, Consortium DCC. Genome-wide association study of developmental dysplasia of the hip identifies an association with. *Commun Biol.* 2018;1:56.
2. Wang CL, Wang H, Xiao F, Wang CDHu GL, Zhu JF, Shen C, Zuo B, Cui YM, Li, Yuan-Gao, Zhang XL, Chen XD. Cyclic compressive stress-induced sclerodermin regulates progress of developmental dysplasia of the hip. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485:400-408