

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791018
 研究課題名 (和文) 成長軟骨疾患の病因解明を目指した基礎的アプローチ
 研究課題名 (英文) Basic Approach for clarification of etiology of diseases of growth plate
 研究代表者
 今井 祐記 (IMAI YUUKI)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
 研究者番号：10423873

研究成果の概要：骨軟骨組織における核内受容体高次機能解明を目的として、軟骨組織特異的核内受容体遺伝子欠損マウス作出するために、9型コラーゲン (Col9) 遺伝子座にCreRecombinaseを挿入したCol9-Cre (CreERT²) ノックインマウス作出のためのTargeting Vectorを完成させた。ES細胞に遺伝子導入した結果、遺伝子組み換え効率が非常に悪く、Southern blotting法による確認により、組み換え体のES細胞を得られなかった。そこで、従来のエレクトロポレーション法ならびにREDシステムによる遺伝子組み換えによるTargeting Vectorの作成から、Invitrogen社製、BP recombinaseおよびLR recombinaseを用いたTargeting Vector作成に切り替え、Targeting Vectorが完成し、すべての塩基配列を確認後、現在ES細胞への遺伝子導入により、組み換え体の作出を行っている段階であり、残念ながら報告時点で、Col9-Creノックインマウスの作出には至っていない。また、PPAR γ floxマウスはバッククロスが進んでいる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,500,000	0	1,500,000
平成 20 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：核内受容体・軟骨・大腿骨頭すべり症

1. 研究開始当初の背景

小児整形外科疾患、特に成長軟骨における疾患は、現在装具療法や外科的治療などの従来通りの治療では十分な効果が得られず重篤な骨格変形を残存させる場合もあり、少子化が進む本邦において ADL を障害する残存変形を最小限に留めるための新たな治療法の開発が急務と言える。ところが、Blount 病や大腿骨頭すべり症等、その病態がまさに成長軟骨

での異常であるにもかかわらず、詳細な病因は (骨系統疾患などの一部を除いて) 大半の疾患で不明であり、最終的な予防・治療を考慮した上で、成長軟骨に由来する疾患群の正確かつ詳細な病態解明が最も重要な課題である。また、内服などの保存的治療により予防や病状の改善が図れば、治療中に伴う ADL 制限や外科的侵襲などの負担を患児に科す必要がなくなり、理想的な予防及び治療法と考えら

れる。特に、薬剤（リガンド）依存的に治療の効果が得られることが重要であり、選択的な核内受容体リガンドによる治療法が想起される。中でも、PPAR γ の合成リガンドは既に臨床でも用いられており、その応用も期待される。以上のことから、申請者は成長軟骨疾患の病態解明に向けて、分子生物学的手法を用いたアプローチにより軟骨組織における核内受容体（特に PPAR γ ）の機能を明らかにするため、本研究の着想に至った。成長軟骨を基盤にする小児整形外科疾患の中でも、適切な治療がなされなければ、将来的な変形性関節症や大腿骨頭壊死・軟骨融解症といった重篤な合併症を引き起こす可能性のある大腿骨頭すべり症は、肥満児に発症しやすいという臨床的特徴を示しながら、その病因は全く不明である。肥満につながる脂肪細胞分化異常と軟骨組織で起る形態学的な異常は一般に、別々の原因による事象と考えられているが、ともに間葉系幹細胞から分化する組織であり、ある種の共通した分子メカニズムの破綻による病態とも考えられる。間葉系幹細胞の分化（主に Commitment）は、様々な転写因子により制御されていることは、これまでの多くの研究により明らかとなってきた。更に骨芽細胞分化における Master Gene である RUNX2 が、軟骨細胞分化の後期に重要な役割を果たすなど、ある特定の細胞腫への分化を担うと考えられていた転写因子が、他の細胞腫への Lineage に関与する事が明らかとなりつつあるが、未だ不明な点が多いのが現状である。中でも、脂肪細胞分化の Master Gene として重要な役割を果たす PPAR γ は、ノックアウトマウスでは胎盤機能不全で胎生致死するため十分な機能解析がなされていない。ただ、ヘテロノックアウトマウスでは、高脂肪食栄養された場合に起こる肥満・インスリン抵抗性の増強を認めないなどの特徴を示し (Kubota et al. Mol Cell, 1999)、糖脂質代謝に関する研究が進んでいる。一方で骨組織については、一般に老化に伴い脂肪化する骨髄/海面骨において、骨髄内間葉系幹細胞が脂肪細胞分化せず Spontaneous に骨芽細胞分化をし、骨量の減少を認めないと報告されている (Akune et al. JCI, 2004)。ところが同じく間葉系幹細胞から分化する軟骨細胞分化及び軟骨組織における機能について十分には研究されていない。成長軟骨板においては、免疫染色にてほぼ全層（静止層・増殖層・肥大層）に存在していることが報告されているが、その他は In vitro の系で MMP-1 などの軟骨細胞外マトリクス分解酵素の発現抑制および機能阻害を担っているとされているとしか評価されておらず、実際の個体レベルでの軟骨組織における PPAR γ の機能は不明であるといえる。そこで本研究では間葉系幹細胞の脂肪細胞分化における Master Gene である PPAR γ の軟骨組織で

の機能解明を目指し、軟骨組織/細胞腫および時期特異的な PPAR γ の機能を個体レベルで明確にすることを目標とする。

2. 研究の目的

PPAR γ ノックアウトマウスは胎生致死のため、Cre-loxP システムを応用した時期・組織特異的な PPAR γ 遺伝子破壊を行う。既に floxed PPAR γ マウスは、仏国 IGBMC、Pierre Chambon 博士から分与されており、PPAR γ 遺伝子を組織特異的に破壊する準備状況は整っている。そのため、まずは軟骨細胞に特異的に CreRecombinase を発現するノックインマウスを作出する。当研究室ではこれまでに数多くの遺伝子改変マウスの作出に成功しており、また破骨細胞特異的に Cre を発現するマウスの作出にも世界に先駆けて成功し、骨芽細胞でも試みているところであり、上記マウス作出に関し技術及び実験環境に問題はないと考えられる。現在までに、軟骨組織特異的な Cre 発現マウス作出のための Targeting Vector はほぼ完成しているため、即座に ES 細胞を用いたキメラマウス作製に取り掛かることが出来、研究期間内には作出されたこれらの遺伝子改変マウスを掛け合わせることで、軟骨組織特異的な PPAR γ 遺伝子破壊動物を作成し、PPAR γ の軟骨組織特異的なおよび直接的な機能を、軟 X 線やマイクロ CT などを用いた形態学的手法及び分子細胞生物学的手法を用いて検索することが可能と考える。更に In vitro の系を用いて、この遺伝子破壊マウス由来の初代培養軟骨細胞で PPAR γ の軟骨細胞内情報伝達経路における役割を解明する。

小児整形外科領域疾患に対する病因の究明は、ペルテス病に関してイヌ・ブタなどの大型動物に対する機械的（もしくは手術的）アプローチにより作成されたモデル動物を用いて研究されてきた経緯はある。ところが、主に軟骨無形成症 (FGFR3) やくる病 (PHEX) などの骨系統疾患を除いて、本研究の対象である大腿骨頭すべり症などの一般小児整形外科疾患に関しては、遺伝子改変動物を用いて探索するといった研究例は今までに報告はなく、本研究は整形外科領域疾患の病因究明に関して先導的研究となると共に、核内受容体領域では軟骨組織特異的な機能の解明という点で国際的にもインパクトの高い研究になるものと期待される。また、予想される結果としては大きく以下の2点が考えられる。1) 軟骨組織特異的な PPAR γ 遺伝子破壊マウスにて、間葉系幹細胞から脂肪細胞分化への Master Gene である PPAR γ の軟骨組

織における役割を明らかにする事ができる。2) 成長軟骨脆弱性の出現やすべり様変化を認める事が出来れば、世界に先駆けて遺伝子改変による大腿骨頭すべり症モデル動物を作出する事となる。更に現在外科的治療のみに依存しており、適切な治療がなされなければ将来的な変形性股関節症発症に繋がる本疾患であるが、実際に PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン誘導体は糖尿病治療薬として臨床応用されており、その予防や治療が内服などによる新たな治療法開発の一助となる事が予測される。

3. 研究の方法

軟骨組織特異的 Cre 発現マウスの作出

これまでに、軟骨組織特異的 Cre 発現マウスは、Type2 および Type11 コラーゲンプロモーターを用いたトランスジェニックマウスの報告があるが、トランスジェニックマウスの場合、ゲノム上にランダムにインテグレートされてしまい他の遺伝子に何らかの影響を与えてしまう可能性があり、組織特異性を得ると同時に他の遺伝子の欠損を引き起こしてしまうことが否定できない。そこで、ヘテロ遺伝子欠損では表現型を示さない遺伝子を用いたノックインマウスの作出を行う。具体的には、軟骨組織特異的にかつ広範に発現する Type2 コラーゲンの架橋分子である Type9 コラーゲン (Col9) のプロモーターを利用する。Col9 は、成長軟骨全域及び関節軟骨・内耳・角膜に発現しており、ホモノックアウトマウスでは、成体後期に関節軟骨の変性・難聴をきたすが、ヘテロノックアウトマウスでは、表現型を認めないことは報告されておりノックインマウス作出に適切であると理解できる (Fassler R et al. PNAS, 1994)。Col9 には 2 つの Splicing variant があるが、軟骨に発現しているのは Long form (Exon 1-39) であることが報告されているため (Ting K et al. AJP, 1999)、こちらのプロモーターを用いる。同時に、組織/時期特異的に遺伝子破壊を行うためにタモキシフェン投与により核内に Cre が移行しゲノムの組み換えを行う CreER^{T2} (エストロゲン受容体変異型との Fusion 蛋白) 発現マウスの作出も行う。現在、それぞれの Targeting Vector はほぼ完成しており (下図)、平成 19 年度内に ES 細胞を用いたゲノムへのノックインによりキメラマウスを作出し、Flipase 発現マウスとのかけあわせによりネオマイシン耐性遺伝子を除いた後、テスターマウス (CAT-Z) とのかけ合わせにより Cre 発

現部位を確認する。

軟骨組織特異的 PPAR γ 遺伝子破壊マウス作出及び表現型解析

前年度に作出した軟骨組織特異的 Cre 発現マウスと、すでに仏国 IGBMC、Pierre Chambon 博士から分与されている floxed PPAR γ マウスをかけ合わせる事により、軟骨組織特異的 PPAR γ 遺伝子破壊マウス (PPAR $\gamma^{\Delta Ch/\Delta Ch}$) を作出し、以下の実験を遂行する。

- ・ 同マウスが軟骨組織でのみ PPAR γ の欠損をきたしていることを、全身の各組織から抽出した mRNA 及び蛋白を用いて、Northern blotting および Western blotting にて確認する。
- ・ 全身的な PPAR γ ヘテロ遺伝子欠損により現れる内分泌や糖・脂質代謝異常を示さないことを、血清中の Insulin や Leptin 濃度計測するなど以前の報告に従って確認する。
- ・ 経時的に、身長・体重を計測し、PPAR $\gamma^{\Delta Ch/\Delta Ch}$ と PPAR $\gamma^{+/+}$ との成長曲線を比較する。
- ・ 出生直後から成長終了 (約 12 週を目処) までの、主に大腿骨近位部および脛骨近位部における成長軟骨層の異常の有無を評価する。実際には全成長軟骨層の幅のみならず、静止層・増殖層・肥大層の各層毎の分布比率を各々のマーカーを用いた In situ hybridization や免疫染色法 (特殊染色を含む) を用いて評価する。
- ・ 上述の成長期における経時的な骨軟骨組織の形態学的変化を捉えるため、主に長管骨を採取し各々の骨についてまずは軟 X 線による多方向撮影を行った後、もっとも顕著な形態学的変化を示す部位 (申請者の予測では上腕骨・大腿骨・脛骨の近位部) のマイクロ CT 撮影を行う。
現在、糖尿病治療薬として臨床的に使用されている PPAR γ アゴニストであるチアゾリジン誘導体を投与した際の軟骨細胞における時間・容量依存的な遺伝子発現の変化を、in vivo 及び PPAR $\gamma^{\Delta Ch/\Delta Ch}$ と PPAR $\gamma^{+/+}$ 由来軟骨細胞初代培養細胞を用いて in vitro にて解析する。

4. 研究成果

9 型コラーゲン (Col9) 遺伝子座に CreRecombinase を挿入した Col9-Cre (CreERT²) ノックインマウス作出のための Targeting Vector を完成させたが、ES 細胞に遺伝子導入した結果、遺伝子組み換え効率が非常に悪く、Southern blotting 法による確認により、組み換え体の ES 細胞を得られなかった。そこで、従来のエレクトロポレーション法ならびに RED システムによる遺伝子組み換えによる Targeting Vector の作成から、Invitrogen 社製、BP recombinase およ

び LR recombinase を用いた Targeting Vector 作成に切り替え、Targeting Vector が完成し、すべての塩基配列を確認後、現在 ES 細胞への遺伝子導入により、組み換え体の作出を行っている

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

以下はすべて査読有の論文である。

① Nakao S, Koike T, Ohta Y, Manaka T, Imai Y, Takaoka K

Parathyroid hormone enhances bone morphogenetic protein activity by increasing intracellular 3', 5' -cyclic adenosine monophosphate accumulation in osteoblastic MC3T3-E1 cells

Bone 2009 (in press)

② Takayama K, Suzuki A, Manaka T, Taguchi S, Hashimoto Y, Imai Y, Wakitani S, Takaoka K

RNA Interference for Noggin Enhances the Biological Activity of Bone Morphogenetic Proteins *in vivo* and *in vitro*

J Bone Miner Metab. 2009 (in press)

③ Yano K, Hoshino M, Ohta Y, Manaka T, Naka Y, Imai Y, Sebald W, Takaoka K

Osteoinductive Capacity and Heat Stability of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Produced by *Escherichia coli* and Dimerized by Biochemical Processing

J Bone Miner Metab. 2009 (in press)

④ Imai Y, Nakamura T, Matsumoto T, Takaoka K, Kato S

Molecular Mechanisms Underlying the Effects of Sex Steroids on Bone and Mineral Metabolism

J Bone Miner Metab. 2009 (in press)

⑤ Imai Y, Youn MY, Kondoh S, Nakamura T, Kouzmenko A, Matsumoto T, Takada I, Takaoka K, Kato S

Estrogens Maintain Bone Mass by Regulating Expression of Genes Controlling Function and Life Span in Mature Osteoclasts

Annals of New York Academy of Sciences 2008 (in press)

⑥ Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S
Regulation of Bone Metabolism by Nuclear Receptors

Mol Cell Endocrinol. 2008 (in press)

⑦ Ohta Y, Nakagawa K, Imai Y, Katagiri T, Koike T, Takaoka K

Cyclic AMP enhances Smad-mediated BMP signaling through PKA-CREB

J Bone Miner Metab. 2008;26(5):478-84.

⑧ Oshimo T, Fukai K, Higashi N, Kitano T, Imai Y, Shintaku H, Ishii M.

A novel LMX1B nonsense mutation in a family with nail-patella syndrome.

J Dermatol Sci. 2008 Oct;52(1):57-60.

⑨ Asagiri M, Hirai T, Kunigami T, Kamano S, Gober HJ, Okamoto K, Nishikawa K, Latz E, Golenbock DT, Aoki K, Ohya K, Imai Y, Morishita Y, Miyazono K, Kato S, Saftig P, Takayanagi H.

Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis.

Science. 2008 Feb 1;319(5863):624-7.

⑩ Nakamura T*, Imai Y*, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S. (*; These authors equally contributed to this work)

Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts.

Cell. 2007 Sep 7;130(5):811-23.

⑪ Nakagawa K, Imai Y, Ohta Y, Takaoka K.
Prostaglandin E2 EP4 agonist (ONO-4819) accelerates BMP-induced osteoblastic differentiation.

Bone. 2007 Oct;41(4):543-8.

⑫ Imai Y, Kitano T, Nakagawa K, Takaoka K.
Calcaneal apophyseal avulsion fracture.

Arch Orthop Trauma Surg. 2007 Jul;127(5):331-3

[学会発表] (計 25 件)

① 金藤紫乃, 今井祐記, 高田伊知郎, 中村貴, 松本高広, 加藤茂明 08.12.09-14

神戸 BMB2008 骨芽細胞におけるエストロゲンの作用の解明—骨芽細胞特異的エストロゲン受容体欠損マウスを用いて

② 今井祐記 江口佳孝 高岡邦夫 北野利夫 中川敬介 08.12.05-06 大阪 日本股関節学会 思春期大腿骨頭変形に対する骨頭回転骨切り術

③ 延 珉榮 高田伊知郎 金藤紫乃 今井祐記 加藤茂明 08.10.29-31 大阪 日本骨代謝学会 成熟破骨細胞におけるエストロゲン受容体 ER α の発現解析

④ 金藤紫乃, 今井祐記, 高田伊知郎, 中村貴, 松本高広, 加藤茂明 08.10.29-31 大阪 日本骨代謝学会 骨芽細胞におけるエストロゲンの直接作用—骨芽細胞特異的エストロゲン受容体欠損マウスの作

- 出
- ⑤ 今井祐記 高岡邦夫 08.10.29-31 大阪 日本骨代謝学会 骨折後炎症期における骨折治癒のメカニズム
- ⑥ Kato S, Imai Y, Nakamura T 08.10.29-31 大阪 日本骨代謝学会 Estrogen Mediates Osteoprotective Effects by Controlling Osteoclast Life Cycle
- ⑦ 今井祐記中村 貴 金藤紫乃松本高広佐藤隆史脇谷滋之高岡邦夫加藤茂明 08.10.29-31 大阪 日本骨代謝学会 骨組織におけるアンドロゲン受容体機能解明
- ⑧ Takada I, Youn MY, Imai Y, Kato S 08.09.12-16 Montreal, CANADA, ASBMR Annual Meeting Biochemical Characterization of ER α Co-regulators in Multinucleated Mature Osteoclasts
- ⑨ Youn MY, Takada I, Kondoh S, Imai Y, Kato S 08.09.12-16 Montreal, CANADA, ASBMR Annual Meeting Multinuclear Expression of ER α in Mature Osteoclasts
- ⑩ Imai Y, Nakamura T, Matsumoto T, Inoue K, Kondoh S, Sato T, Takaoka K, Kato S 08.09.12-16 Montreal, CANADA, ASBMR Annual Meeting Osteoblastic Androgen Receptor Regulates Cortical Bone Mineral Density
- ⑪ 今井祐記 08.6.27-28 名古屋 日本小児股関節研究会 思春期臼蓋形成不全に対する治療法の選択
- ⑫ 今井祐記 中村 貴 高岡邦夫 加藤茂明 08.06.21 千葉 破骨細胞特異的 ER α -KO マウスにおける骨粗鬆症発症機構
- ⑬ 今井祐記 08.06.07 大阪 O2 カンファレンス 閉経後骨粗鬆症の新たな分子メカニズム解明
- ⑭ 今井祐記 中村 貴 松本高広 高岡邦夫 加藤茂明 08.05.18 青森 日本内分泌学会学術総会 エストロゲンによる骨量維持機構の分子基盤
- ⑮ 今井祐記 中村 貴 松本高広 高岡邦夫 加藤茂明 08.05.10 東京 SERM 学術研究会学術集会 閉経後骨粗鬆症の分子メカニズム
- ⑯ Imai Y, Nakamura T, Matsumoto T, Sato S, Takeda S, Igarashi K, Yamamoto Y, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S 08.03.09-14 Davos, Swiss, International Bone and Mineral Society Davos Workshop Sex Steroids Hormone Mediate Osteoprotective Effects by Controlling Osteoclast Life Cycle
- ⑰ 今井祐記 高岡邦夫 08.03.01 大阪 骨折治療を考える会 生物学的骨癒合促進法
- ⑱ 今井祐記 08.02.29 東京 Bone Research Seminar Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor Alpha and Induction of FasLigand in Osteoclasts
- ⑲ 今井祐記 中村 貴 松本高広 竹田秀 高岡邦夫 加藤茂明 07.12.14 横浜 BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会) 閉経後骨粗鬆症の分子基盤解明
- ⑳ 今井祐記 中村 貴 竹田秀 高岡邦夫 松本高広 加藤茂明 07.10.26 浜松 日本整形外科学会基礎学術集会 エストロゲンは FasLigand シグナルによる破骨細胞寿命の調節により骨量を維持する
- ㉑ 今井祐記 寺井秀富 高岡邦夫 07.10.25 浜松 日本整形外科学会基礎学術集会 骨折治癒における BMP の役割
- ㉒ Yuuki Imai, Takashi Nakamura, Takahiro Matsumoto, Shu Takeda, Katsuhide Igarashi, Toru Fukuda, Yoko Yamamoto, Jun Kanno, Kunio Takaoka, Pierre Chambon, Shigeaki Kato 07.9.19 Honolulu, USA, ASBMR Sex Steroids Hormone Receptors in Osteoclasts Mediate Osteoprotective Effects by Regulating Its Life Cycle
- ㉓ Yuuki Imai, Takashi Nakamura, Takahiro Matsumoto and Shigeaki Kato 07.8.25 Susono Bone Biology Forum Estrogen receptor α mediates the osteoprotective estrogen action by controlling the life cycle of osteoclast through Fasligand signaling
- ㉔ 今井祐記 中村 貴 松本高広 加藤茂明 07.7.21 大阪 日本骨代謝学会 核内受容体の破骨細胞特異的ノックアウトマウス
- ㉕ 今井祐記 中村 貴 竹田秀 福田亨 山本陽子 高岡邦夫 松本高広 加藤茂明 07.7.21 大阪 日本骨代謝学会 エストロゲンの骨量維持機構は FasLigand シグナルを介した破骨細胞寿命の調節である

〔図書〕(計1件)

加藤茂明, 高田伊知郎, 中村貴, 山本陽子, 今井祐記 建帛社 栄養学研究の最前線 2008 核内性受容体群による骨代謝制御の分子機構 45-55

[その他]

2009 IBMS-ANZBMS Young
Investigator Travelling
Award

2008 Young Investigator
Travelling Grant Award,
International Bone and
Mineral Society Davos
Workshop

2008 日本骨代謝学会
IBMS-ANZBMS 2009 Travel Award

2007 日本骨代謝学会 奨励賞
(Encouragement Award)

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/bnsikato/>

<http://medwebsv.med.osaka-cu.ac.jp/orthoped/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 祐記 (Imai Yuuki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
研究者番号：10423873

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし