

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11030

研究課題名(和文) 軟骨石灰化不全ラットの形態異常を規定する分子の解明：頭蓋底軟骨と下顎頭軟骨

研究課題名(英文) Cranial base synchondrosis and condylar cartilage of temporo-mandibular joint in Cartilage Calcification Insufficient rat

研究代表者

永山 元彦 (Nagayama, Motohiko)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：50298436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：SD系列ラット由来の軟骨石灰化不全ラット(Cartilage Calcification Insufficient rat, CCIラット)は全身性軟骨石灰化遅延を示し軟骨の肥大化が特徴で、一方骨には影響しない軟骨内石灰化制御不全である。本研究では、形成された軟骨と、軟骨の吸収不全による骨化の遅れの二面性があり、軟骨から採取したcDNAマイクロアレイでインディアンヘッジホッグシグナル関連するGli1遺伝子の亢進がreal time PCRとin situ hybridization法のいずれでも明らかとなった。すなわち、BrdU取込み軟骨細胞数からみても軟骨増生の亢進が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The cartilage calcification insufficient (CCI) rat derived from Sprague-Dawley (SD) rat (permeability=25%), show spontaneous skeletal dwarfism associated with delay of endochondral ossification including craniofacial development, limbs pseudoarticulation and excurvature. In this study, CCI rats (2 weeks after birth) showed abnormal endochondral ossification including longitudinally wider length of intra-sphenoidal and spheno-occipital synchondrosis, and exhibited morphological hypertrophic cartilage of mandibular condyle compared to the normal SD rats. Real time PCR for Gli1 gene showed prominent relative increasing of transcription in CCI rats. This dwarf is up-regulated BrdU incorporation, over expression of Ihh, Smo and Gli1 mRNA. The data demonstrate that CCI rats affect their endochondral ossification due to excessive Ihh signaling, which results in hyper proliferating but feed-back arrest of chondrocyte differentiation to remain the layer of chondrocytes in post-natal development.

研究分野：口腔病理学

キーワード：軟骨内骨化 インディアンヘッジホッグ 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

SD 系列ラットの自然交配から、軟骨石灰化不全ラット (Cartilage Calcification Insufficient rat, 以下 CCI ラット) が自然発症型で全身性軟骨石灰化遅延を示す (自然発症頻度約 25% の浸透率) ことが聖マリアンナ医科大学で確立された。この形質発現の原因となる責任遺伝子は常染色体劣性遺伝形式に表現されている可能性が示唆されている。一方、この形態異常は、形成される骨の石灰化や形態には影響することなく、関節軟骨等軟骨の成長異常を含む全身性の骨格異常を示すことから、全身性に軟骨幅が増大し、さらに軟骨内石灰化制御の不全と骨化遅延であることがわかった (図1)。

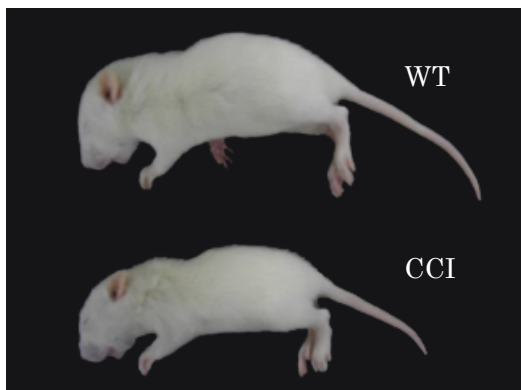


図1 SD ラット (WT、上) と CCI ラット (下) 生後2週齢 (雌)

この形質発現は生後数週間もすると明らかでないが出るものの、発症メカニズムについては責任遺伝子を始め明らかにされていない。また軟骨の分化や成長はまだ未知が多く、将来的な関節軟骨再生を考えた場合、軟骨組織とその制御メカニズムの解明は、これからの高齢者社会においても極めて重要になる。

2. 研究の目的

CCI ラットの全身性の軟骨石灰化不全による骨格異常は四肢を始め、脊椎、頭部の全てで異常がみられるが、頭部は骨の形成を線維芽細胞からの骨芽細胞分化による膜性骨化と、骨の基盤となる部分に軟骨形成が先行し、破骨細胞による軟骨の吸収過程を踏んで骨化を起こすという軟骨内骨化がある。齧歯類の場合は、頭蓋底軟骨は篩骨、蝶形骨、後頭骨がほぼ水平に並ぶため、その間に介する軟骨結合は軟骨内骨化の重要な要素を占める (図2)。

一方、顎関節に存在する下顎頭は関節頭に一層の軟骨層が形成され、これが関節円板を介して上顎関節結節と関節を形成する軟骨内骨化の一例として捉えることができる (図3)。このように頭蓋底軟骨や下顎頭軟骨は、これらの異常や原因遺伝子の様相を形態的に知る上でも絶好の組織モデルとなり得ること、また研究代表者はこれまでにインディアンヘッジホッグ分子を中心にこれら軟骨細胞の分化と成熟について研究してきた (図4)。本研究では形成される軟骨幅の増大が軟骨細胞の増殖制御の異常による肥大や増生で、腫瘍性の増殖ではな

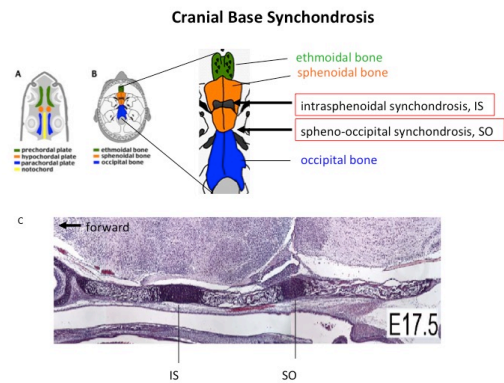


図2 頭蓋底軟骨結合の模式図と組織像
正常な頭蓋底軟骨結合では、頭蓋底を構成する篩骨、蝶形骨、後頭骨の骨間に一層の軟骨層 (軟骨結合) が介在して中顔面の前後方向の成長に影響する。写真はマウス (胎生 17.5 日) の頭蓋底矢状断を示す。

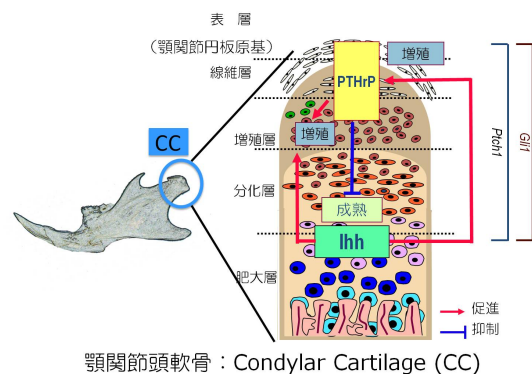


図3 下顎頭軟骨の模式図
下顎頭を構成する軟骨は軟骨成長板が介在して下顎の上下前後方向の成長に影響する。

Ihh signaling pathway

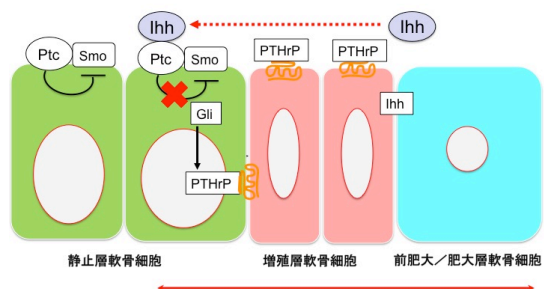


図4 Ihh 分子による軟骨細胞の分化と成熟
成長板軟骨の前肥大軟骨細胞から分泌したインディアンヘッジホッグ (Ihh) は Gli 転写因子を介して PTHrP の産生を促し、増殖の促進と分化の抑制を行うネガティブフィードバック作用により骨の成長に合わせた軟骨細胞層の成熟を行う。

いこと、また、軟骨の石灰化不全を起因として破骨細胞の吸収不全による骨化の遅れの面からも、CCI ラットにおける軟骨石灰化不全の発症メカニズムと原因遺伝子の検索を行うことを目的とし、頭部の頭蓋底軟骨と下顎頭軟骨を検索対象として、以下の研究目的を掲げた。

- (1) CCI ラットの原因遺伝子の解明
- (2) CCI ラットの形態学的・分子生物学的検索

(3) CCI ラットとヒトの発育異常疾患との関連

3. 研究の方法

(1) CCI ラットの原因遺伝子の解明

自然発症型の軟骨石灰化不全を示す CCI ラットの奇形発症は、ホモで形質発現することから、ダブルヘテロの CCI ラットによる常染色体劣性遺伝による形質発現であることが予想された。そこで CCI ラットの繁殖と交配実験から、原因遺伝子の同定と遺伝子の機能解明を以下の手順で行った。

① CCI ラット遺伝型と表現型の確認と戻し交配

CCI ラットが劣性遺伝で発現することから、親がヘテロの場合、常染色体に責任遺伝子が存在すると仮定すると、Wild type の近交系 SD ラットと CCI ラットとの F1 世代を作成して、表現型を確認する。つぎに、この F1 ラットと SD ラットによる戻し交配ラット作成、同時に F1 ラットと CCI ラットによる戻し交配ラットを作成して、それぞれの表現型の比が 3:1 か 1:3 を確認する。さらに、F1 同士を交配させた F2 世代を作成して、遺伝型と表現型の比を確認する。

② 連鎖解析による遺伝子地図の作成

CCI ラットの原因遺伝子座における原因遺伝子の種類を限定するために連鎖解析を行い、軟骨石灰化異常が単一遺伝子の異常で生じるかを以下の方法で調べる。

F1 ラットに戻し交配させたラット2系と F2 ラットを用いて、Rat genome Database に紹介されている遺伝子位置情報を元に原因遺伝子をマップする。マッピングの方法は、個々のラットの腎臓(耳・尾)から DNA を抽出して、マイクロサテライトマーカーによる PCR を行い、タイピングで連鎖解析や QTL 解析(Quantitative trait loci:量的形質遺伝子座)で遺伝子座が 0.1cM 以内に確定でき、候補遺伝子を決定する。

(2) CCI ラットの形態・分子生物学的検索

交配、繁殖中に得られた CCI ラットを胎生中、生後~4ヶ月齢までの各時期における軟骨性成長の様子を同腹の Wild type の SD ラットと形態学的、分子生物学的に比較した。

① マイクロ CT によるエックス線の検索

屠殺後、頭部を4%パラホルムアルデヒドで固定後マイクロ CT 撮影し、頭蓋底や下顎頭の軟骨部を含めて3次元解析ソフトで Bone Mineral Density (BMD)から骨化状態を観察した。これまでに石灰化した骨は正常であるが、同じ週齢では下顎頭よりも頭蓋底の軟骨性成長が悪く、軟骨内骨化のみならず、泉門開存など膜性骨化や歯の萌出も遅れ、結果として上顎劣成長による切端咬合や下顎前突を示すことが確認されている。本研究では、軟骨成長の過程のどの部位の軟骨内骨化が最も影響を受けるのかを追求した。

② 組織学および分子生物学的検索

頭蓋底軟骨結合部や下顎頭軟骨部のパラフィン切片を作製後、各軟骨細胞層における mRNA ならびにタンパクの部位特異性を検索した。検索する分子群は軟骨の成長に合わせて各軟骨

細胞層に発現される分子で、静止層: PTHrP, Collagen type IIA ; 増殖層: Histon H4C, PTHrP receptor, 前肥大層: Ihh, osterix, 肥大層: Gli1, type X collagen, osteopontin, MMP 9 and 13, osteocalcin, DMP1 について各 mRNA の局在を in situ hybridization 法で、また cDNA マイクロアレイによる網羅的分子間関連を検索するために、新鮮な頭蓋底軟骨や膝軟骨を採取して total RNA を cDNA マイクロアレイ解析依頼を行った。軟骨細胞の増殖は BrdU 取り込みによる特異抗体を用いた免疫組織化学的手法でも調べた。

これら軟骨細胞の分化・成長が抑制されていると考えられる CCI ラットでは、未知の原因遺伝子と絡み、分子間の均衡が崩れていることが予想された。特に、Ihh は産生されると細胞外基質のヘパラン硫酸にトラップされ、その標的細胞に対して作用を発揮するので、これらヘパラン硫酸の検索が重要となる。そこで、主要なヘパラン硫酸であるアグリカンの発現異常も検索の対象とした。

③ 原因遺伝子レスキューによる形態機能回復

単一遺伝子の欠損が原因として解明された場合、その分子の形質発現タンパク等を胎児の CCI ラット肋軟骨から取り出した軟骨細胞を培養し、これに発現タンパクを加えてその刺激作用に対する応答で産生する分子を real time PCR で検出して、その分子が軟骨の成熟ならびに内軟骨性骨化に必須分子を検索した。また、siRNA 法などによるノックダウンのみならず、分化獲得と回復を含めた in vivo 実験の可能性を考慮した。

(3) ヒトの発育異常疾患との関連

CCI ラットの軟骨石灰化不全の原因遺伝子が解明できた場合、ヒトの軟骨内骨化過程における成長発育不全で同様の症状を示す疾患を探る。頭頸部における骨系統疾患で軟骨内骨化の遅延を示す代表的な発育異常には、Crouzon 症候群、Apert 症候群、軟骨無形成症、軟骨低形成症等があるが、いずれも FGF レセプターの異常による軟骨結合や縫合における早期骨化が病態として知られている。そこで、CCI ラットがヒトのいずれの発育異常に相当するのかを分子生物学的な背景に基づく結果から原因遺伝子が明らかにできれば、これらの gain of function や loss of function から、さらにヒトの発育異常への適応と治療を含めたビジョンで研究が展開できると考えた。

4. 研究成果

(1) CCI ラットの原因遺伝子の解明

マイクロサテライトプライマーを用いて CCI ラットと SD 系列とは異なる Fischer 系統ラットとの F1 の軟骨による PCR で多形性を調べたところ、いくつかのサテライトマーカーで多形性が存在することがわかり、これらの付近に原因遺伝子の存在があることが示唆された。しかし、ばらつきも多く、また現在進行中のため、遺伝子地図作成にまでは至らなかった(図5)。

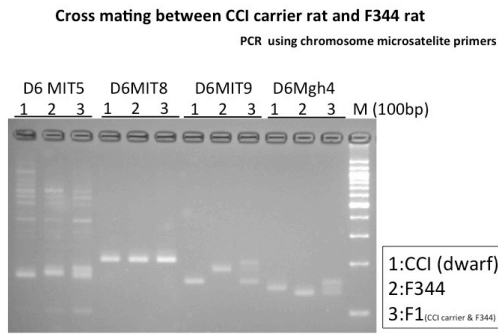


図5 マイクロサテライトマーカーによる多形性解析

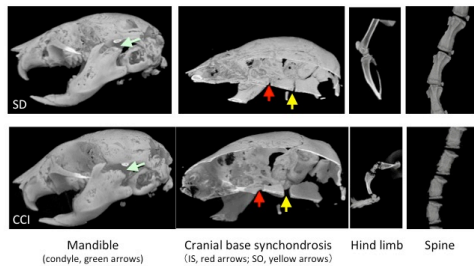
F1 交配による CCI ラットにおける多形性の解析
CCI:CCI rat; F344: Fischer rat

(2) CCI ラットの形態・分子生物学的検索

① マイクロ CT によるエクソ線の検索

CCI ラットでは頭蓋底や下顎頭の軟骨部で SD ラットに比べて顕著な形態差を示した。下顎頭では、軟骨の増大による下顎頭の扁平化を、頭蓋底軟骨結合部ではいずれの軟骨結合においても軟骨幅の増大を示した。加えて、後肢の関節には偽関節が生じ、脊椎の湾曲も強かった(図6)。

Phenotypical Dwarfism Accompanied by Skeletal Abnormality (μ CT)



IS: intrasphenoidal synchondrosis
SO: spheno-occipital synchondrosis
CCI: cartilage calcification insufficient

2 weeks

図6 マイクロ CT による SD ラットと CCI ラットの骨格比較

生後2週で比較した場合、SD ラットに比べて、CCI ラットでは、下顎頭の扁平化、頭蓋底軟骨の幅の増大、後肢の偽関節、脊椎湾曲が顕著になる。左から順に下顎頭、頭蓋底軟骨、後肢、脊椎を示す。

緑矢印は下顎頭軟骨を、赤矢印は蝶形骨内軟骨結合を、黄矢印は蝶形後頭軟骨結合をそれぞれ示す。

次に骨の石灰化の状態を調べるため3次元解析 Bone Mineral Density (BMD)から骨化状態を観察したところ、S ラットと

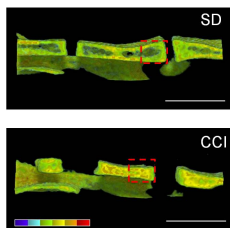


図7 BMD 解析による SD ラットと CCI ラットの石灰化密度比較

頭蓋底軟骨結合が介在する各骨におけるBMDを比較したところ、SD ラットと CCI ラットの両者には差がなかった。

CCIラットで骨の石灰化には差がないことが明らかとなった(図7)。

② 組織学および分子生物学的検索

頭蓋底軟骨と下顎頭軟骨を生後2週齢の雌ラットで比較したところ、CCI ラットでは軟骨層の幅

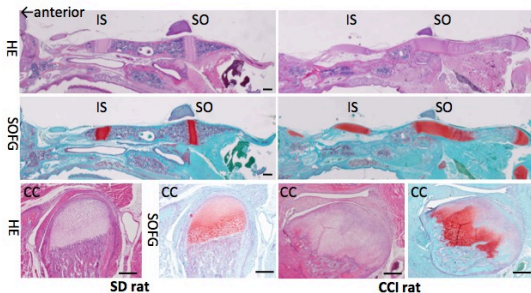


図8 SD ラットと CCI ラットの頭蓋底と下顎頭の組織像(生後2週)

が増加して、軟骨細胞の配列の乱れを確認した(図8)。

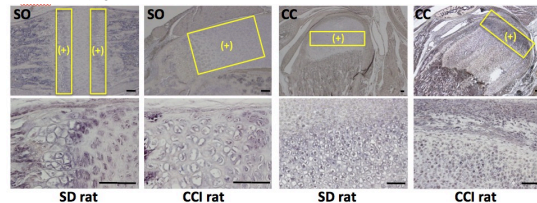


図9 Ihh mRNA の局在(生後2週)

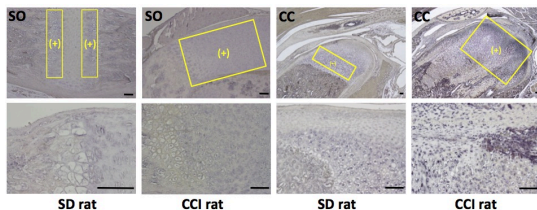


図10 Gli1 mRNA の局在(生後2週)

また、軟骨から採取した cDNA マイクロアレイでインディアンヘッジホッグシグナル関連する Ihh, Gli1 と Smo 遺伝子の亢進が real time PCR と in situ hybridization 法でも一致した(図9-11)。これらの結果、軟骨細胞の増殖が亢進して、分化が抑制されている結果、軟骨幅の増大することが明らかとなり、これを証明すべく、BrdU 取込み軟骨細胞数も多い軟骨増生の亢進がみられた(図12)。

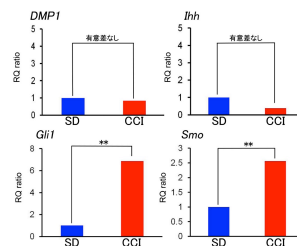


図11 Ihh 関連分子(Gli1, Smo)mRNA の異常発現

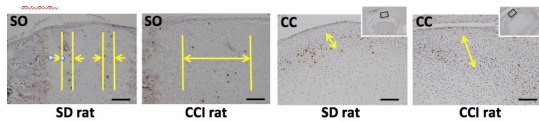


図 12 BrdU 免疫染色(SO, 蝶形後頭軟骨結合; CC, 下顎頭軟骨)

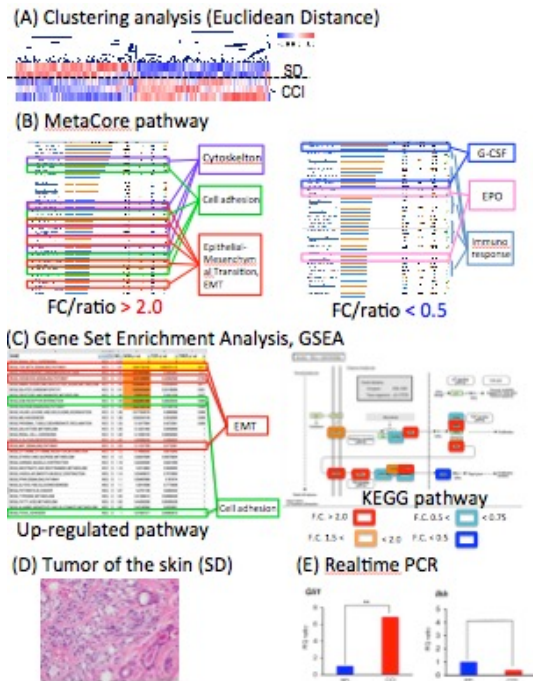


図 13 遺伝子発現プロファイルとシグナル伝達経路との関係

腫瘍発現性関連分子(A-D)

CCI ラットは Gli1 mRNA の高発現がみられたが、Ihh mRNA の発現は低かった(E)ことから、Ihh シグナルとは独立した Gli1 転写の活性化が細胞増殖に関わっていることが考えられた。

- ③原因遺伝子レスキューによる形態機能回復
研究期間内での実施にまでは至らなかったため、今後の課題としたい。
- (3)ヒトの発育異常疾患との関連
研究期間内での実施にまでは至らなかったため、今後の課題としたい。

<引用文献>

M. Nagayama et.al. Wnt-beta catenin signaling regulates cranial base development and growth, J Dent Res, 2008, 87: 244-249

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 1 件)

- ① Tanaka M, Watanabe M, Yokomi I, Matsumoto N, Sudo K, Satoh H, Igarashi T, Seki A, Amano H, Ohura K, Ryu K, Shibata S, Nagayama M, Tanuma J. Establishment of a novel dwarf rat strain: cartilage calcification insufficient (CCI) rats. Exp Anim. 査読有, 2015, 64:121-8. DOI: 10.1538/expanim.14-0072

[学会発表] (計 7 件)

- ① M.Nagayama et al. Abnormal Chondrocyte Differentiation in Post-natal Cartilage Calcification Insufficient Rat. 93rd General Session & Exhibition of the IADR/44th Annual Meeting of the AADR/39th Annual Meeting of the CADR, 2015/03/13, Boston (US)
- ② 竹内 綾他. 軟骨石灰化不全ラット(CCI ラット)における頭蓋底軟骨結合と顎関節頭軟骨の変化, 第 73 回日本矯正歯科学会, 2014/10/20-22, 幕張メッセ(千葉県幕張)
- ③ A. Takeuchi et al. Abnormal cranial base synchondrosis development and growth in cartilage calcification in sufficient rat. 17th IAOP International Congress on Oral Pathology and Medicine, 2014/05/25-30, Istanbul (Turkey)
- ④ M. Nagayama et al. Morphological Study of Cranial Base Synchondrosis in Cartilage Calcification Insufficient rat. 第 24 回日本臨床口腔病理学会, 2013/08/28-30, 日本大学理工学部 1 号館 CST ホール(東京)
- ⑤ 竹内 綾他. 軟骨石灰化不全ラット(CCI ラット)における頭蓋底軟骨結合の変化. 第 103 回日本病理学会総会. 2014/04/24-26, 広島国際会議場(広島)
- ⑥ 竹内 綾他. 軟骨石灰化不全ラット(CCI ラット)における頭蓋底軟骨結合の形態学的解析. 第 55 回歯科基礎医学会, 2013/09/20-22, 岡山コンベンションセンター(岡山)
- ⑦ K.Kuzushima, A.Takeuchi, M.Nagayama, M.Tanaka, M.Watanabe, H.Amano, J.Tanuma, N.Kitai, Study of Cartilage Calcification Insufficient (CCI) Rat., 45th Annual Meeting of the AADR, March 18th, Los Angeles, US, 2016

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://scw.asahi-u.ac.jp/~patho/staff/index.html#staff02>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永山 元彦 (NAGAYAMA, Motohiko)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：50298436

(2) 研究分担者

田沼 順一 (TANUMA, Jun-ichi)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：20305139