

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19791036

研究課題名 (和文) 関節発生におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割

研究課題名 (英文) Role of heparan sulfate proteoglycan in joint development

研究代表者

松本 嘉寛 (まつもと よしひろ)

九州大学・医学研究院・整形外科

研究者番号：10346794

研究成果の概要 (和文)：

関節疾患に対する病態解明のため、関節発生におけるヘパラン硫酸 (Heparan sulfate: HS) の役割について検討した。その結果、細胞表面での HS の欠失により Bone morphogenetic protein の生体内での分布が広範に広がり、関節発生に必須な関節凝集の形成が異常になることを見いだした。これらの成果は、HS の関節形成における役割を細胞生物学的に証明した画期的な成果である。

研究成果の概要 (英文)：

To elucidate the pathogenesis of joint diseases, the roles of heparan sulfate (HS) in the joint development was investigated. Loss of HS in the cell surface caused the diffuse distribution of bone morphogenetic protein and the abnormal formation of mesenchymal condensation that was critical for the joint development. These results clearly indicated the essential and cell biological roles of HS in the joint development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,000,000	600,000	3,600,000

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：ヘパラン硫酸、関節形成、Bone morphogenetic protein、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症などの関節疾患の罹患頻度は、高齢化に伴い増加を続け、その治療法の開発は臨床的に大きな意義を持つ。近年、関節軟骨分化、再生に関するメカニズムの理解がすすんでいるが、関節の発生そのものに対する

知見の集積は十分でない。

2. 研究の目的

遺伝性多発性外骨腫症 (Hereditary Multiple Exostoses; HME) は、多発性に発症する外骨腫を特徴とする、常染色体優性の疾

患である。HME 家系の連鎖解析により、がへパラン硫酸(Heparan Sulfate: HS)合成酵素である Exostosin(EXT)1 が、HME の原因遺伝子として同定された。

HME 患者では骨関節の変形が高い頻度で見られる。そこで、四肢における EXT1 コンディショナルノックアウトマウス(変異マウス)を作製した結果、変異マウスは(1)関節の消失、(2)長軸方向の成長障害、(3)合短指症、などの表現型を示した。このように、HS は四肢発生の様々な側面において、決定的な役割を果たしていることが予想される。そこで本研究においては、変異マウスの示した異常の中で、関節の消失という表現型に注目し、その詳細を解析し、HS による関節発生制御のメカニズムを検討することを目的とする

3. 研究の方法

この変異マウスの組織学的解析を、免疫染色、in situ hybridization (ISH) 法、Whole-mount ISH 法などを用いて詳細に行った。さらに、変異マウスから間葉系幹細胞を採取、Micromass culture などの手法を用いて関節発生を含む四肢発生の分子細胞生物学的メカニズムを解析した。

4. 研究成果

(1) 変異マウス肢芽の初期パターン形成の解析

肢芽の形成の後、肢芽の遠近(指~肩)、前後(母指~小指)、背腹軸にそってパターンが形成される。続いて、肢芽内では側板中胚葉由来の間充織細胞が集合して前軟骨性凝集(Precartilagenous Condensation; PCC)が形成される。一方、間充織細胞はHox 遺伝子によって位置指定が行われ、それぞれの細胞が最終的にどのような形状の骨を形成するかについてのアイデンティティが付与される。ついで、PCCは伸長した後、分枝、分節され四肢組織のテンプレートとなり、骨格構造が完成する。上記の各ステップの中で、関節発生には初期のパターン形成からPCCの分節化のステップが最も重要であると考えられる。

まず、変異マウスの初期パターン形成、およびPCC分節化に焦点を絞り解析を行った。肢芽の正常な遠近パターンの確立には肢芽形成初期に外胚葉性頂堤(Apical Epidermal Ridge; AER)が形成され、FGF-8、FGF-4などの増殖因子が産生される必要がある。変異マウスにおいては、AERの形成、FGF-8、FGF-4の発現はほぼ正常であった。このこと

は、変異マウスにおいては初期の遠近パターンは保たれていると考えられる。

引き続き、変異マウス肢芽の組織切片を用いて Alcian Blue 染色を行い、PCC の分節化が生じていないことを見いだした。このことは、肢芽における HS は PCC の形成に必須であることを示しており、さらにその詳細な分子メカニズムを検討した。

(2) 変異マウスにおける、PCC 分節化異常の解析

PCC の分節化、すなわち位置価の指定は Hox 遺伝子によって行われる。よって変異マウスにおける Hox 遺伝子の発現をホールマウント in situ hybridization 法 (ISH 法) で検討した。その結果、変異マウスにおいても Hox 遺伝子の発現は正常であることを確認した。また、初期の軟骨細胞のマーカーである Sox9 や ColII を用いて ISH 法を行い、変異マウスでは本来関節となるべき PCC 中央部の中間細胞層の部位でも Sox9, ColII の発現が消失していないことも見いだしている。

これらの結果は、変異マウスにおいては、PCC 内の位置価指定といった Cell autonomous な step ではなく、細胞表面での HS の欠失のため周辺環境から細胞への情報伝達に異常が生じるために中間細胞層の形成が生じていないと考えられた。

(3) 変異マウスにおける間葉凝集の形成異常

関節の形成においては、四肢発生時の間葉凝集: Mesenchymal condensation (MC) において、中央部での境界が指定、すなわち中間細胞層が形成されることが必須である。中間細胞層は、関節発生の進行に伴い MC 中央部の数層の細胞が扁平の細胞へと脱分化して生じる。この中間細胞層から様々な組織が形成され最終的な関節構造が完成すると考えられている。

近年、Transforming Growth Factor (TGF) ファミリーのひとつである Growth/Differentiation Factor 5 (GDF5) や、ヒアルロン酸のレセプターである CD44 が、中間細胞層のマーカーであることが明らかとなった。そこで、それらの発現を関節形成時(胎生 12.5-13.5 日)の組織標本を用いて解析し、変異マウスの MC における中間細胞層の形成について検討した。その結果、変異マウスにおいては、MC での GDF5 の発現がほとんど消失していること、すなわち変異マウスでは中間細胞層が形成されていないことを見

いだした。

これまでの報告より、中間細胞層の形成には MC 周囲の軟骨膜(pericondrium)からの骨形成蛋白質(Bone morphogenetic protein: BMP) 分布が正確に制御される必要があることが知られている。さらに、BMP はへパラン硫酸に強固に結合する分子であることより、変異マウスでは BMP の四肢における分布が異常となり、中間細胞層の正常な形成が阻害されている可能性が高いと予想された。

そこで、関節形成時(胎生 12.5-13.5 日)の肢芽を野生型、変異マウスから採取、細胞を単離し micromass culture を行い、軟骨分化、中間細胞層形成を細胞生物学的に解析した。その結果、変異マウスにおいては、細胞表面での HS の欠失のため BMP の生体内での分布が広範に広がり、その下流のエフェクター分子である Smad のリン酸化が障害されていることを、in vitro で明らかとした。さらに、関節形成に必須な要素のひとつである Wnt 情報伝達系の活性化が障害されていることを見いだしている。変異マウスの組織切片を用いた免疫染色法でも同様の結果が得られている。これらの成果は、HS の関節形成における役割を細胞生物学的に証明した画期的な成果である。

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 7 件)

1. Okada S, Maeda T, Ohkawa Y, Harimaya K, Saiwai H, Kumamaru H, Matsumoto Y, Doi T, Ueta T, Shiba K, Iwamoto Y. Does ossification of the posterior longitudinal ligament affect the neurological outcome after traumatic cervical cord injury? Spine. 2009; 34, 1148-1152. 査読有

2. Iwao K, Inatani M, Matsumoto Y, Ogata-Iwao M, Takihara Y, Irie F, Yamaguchi Y, Okinami S, Tanihara H. Heparan sulfate deficiency leads to Peters anomaly in mice by disturbing neural crest TGF-beta2 signaling. J Clin Invest. 2009; 119: 1997-2008. 査読有

3. Matsumoto Y, Matsuda S, Matono K, Oda Y, Tsuneyoshi M, Iwamoto Y. Intra-articular osteochondroma of the knee joint in a patient with hereditary multiple osteochondromatosis. Fukuoka Igaku Zasshi. 2007; 98, 425-430. 査読有

4. Matsumoto Y, Irie F, Inatani M, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y. Netrin-1/DCC

signaling in commissural axon guidance requires cell-autonomous expression of heparan sulfate. J Neurosci. 2007; 27: 4342-4350. 査読有

5. Kadoya K, Fukushi JI, Matsumoto Y, Yamaguchi Y, Stallcup WB. NG2 Proteoglycan Expression in Mouse Skin: Altered Postnatal Skin Development in the NG2 Null Mouse. J Histochem Cytochem. 2007; 56: 295-303. 査読有

6. Matsumoto Y, Matsumoto K, Irie F, Fukushi J, Stallcup WB, Yamaguchi Y. Conditional ablation of the heparan sulfate-synthesizing enzyme Ext1 leads to dysregulation of bone morphogenic protein signaling and severe skeletal defects. J Biol Chem. 2010;285(25):19227-34. 査読有

7. Yamaguchi Y, Inatani M, Matsumoto Y, Ogawa J, Irie F. Roles of heparan sulfate in mammalian brain development current views based on the findings from Ext1 conditional knockout studies. Prog Mol Biol Transl Sci. 2010;93:133-52. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

1. Y Matsumoto, et al.
Essential role of heparan sulfate on axon guidance in developmental spinal cord
The 53th annual meeting of the Orthopaedic Research Society 2007 年 2 月 11 日 San Diego, USA

2. Kamura, S; Matsumoto, Y; Fukushi, J; Fujiwara, T; Okada, Y; Iida, K; Matsuda, S; Harimaya, K; Yoshida, T; Matsunobu, T; Iwamoto, Y
Basic Fibroblast Growth Factor enhances invasive and metastatic phenotype of Ewing sarcoma cells by stimulating the cell migration
The 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (2010 年 2 月 20 日, New Orleans, USA)

3. Yoshihiro Matsumoto, Kazu Matsumoto, Yu Yamaguchi, Fumitoshi Irie, Yukihide Iwamoto
Conditional ablation of the heparan sulfate-synthesizing enzyme Ext1 leads to dysregulation of bone morphogenic protein signaling and severe skeletal defects
The 32nd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research(2010 年 10 月 15 日, Toronto, Canada)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

平成21年度
日本対がん協会福岡県支部がん研究助成金

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 嘉寛 (MATSUMOTO YOSHIHIRO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：10346794

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：