

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791047  
 研究課題名（和文）  
 軟骨細胞外基質パールカンの椎体・椎間板形成における分子機構の解明  
 研究課題名（英文）  
 The role of perlecan, an extracellular matrix protein of the cartilage,  
 for the development of vertebral body and disc  
 研究代表者  
 石島 旨章 (ISHIJIMA MUNENAKI)  
 順天堂大学・医学部・助教  
 研究者番号：70365576

## 研究成果の概要：

へパラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンは、長管骨成長板における軟骨形成において必須の機能を担うことが、その欠損マウスとヒト遺伝性疾患の解析より明らかとなっていた。しかしパールカンの脊椎と椎間板発生における機能は不明であったため、今回この機能解析を行った。

パールカンが欠損したマウスでは、脊椎が曲がる側彎変形を呈した。組織学的検討より、椎体成長板肥大軟骨細胞層の発達遅延と層状構造消失を認めた。さらに、椎間板形成も遅延していた。以上より、パールカンは、椎体と椎間板の発達にも重要な機能を担うと考えた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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

キーワード：骨・軟骨代謝学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) へパラン硫酸プロテオグリカンであるパールカンは、すべての基底膜とともに基底膜のない軟骨や滑膜に発現する細胞外マトリックスである。

(2) 本研究の研究協力者である平澤恵理博士（順天堂大学大学院・老人性疾患病態治療研究センター）と山田吉彦（米国・国立衛生研究所(NIH)）が、パールカン欠損マウスを作成・解析し、パールカンが長管骨

の成長軟骨(成長板)の形成に必須の分子であることを 1999 年に初めて報告した(Nature Genetics 1999)。さらに両博士らはヒトでのパールカン遺伝子欠損病として周産期致死性の軟骨異形成症(Silverman-Handmarker 型 Dtssegmental Dysplasia: DDSG)と良性の経過をよる軟骨異栄養性筋強直症(Schwartz-Jampel 症候群: SJS)を同定した(Nature Genetics 2001, Nature Neuroscience 2002, Am. J. Hum. Genet 2002)。以上より、パールカンは、マウスのみならずヒトにおいても軟骨の発生に必須の分子であることが明らかとなっていた。

(3) パールカンの完全欠損である DDSH では病名に冠されるように椎体の分離不全が特徴であり、パールカンの機能部分欠損である SJS でも脊椎は四肢長管骨に比べて変形が強く、これはパールカンの椎体形成における重要性を示すものと考えられていた。また、パールカンは椎間板にも発現していることは報告されていた。しかし、椎体形成におけるパールカンの作用機序についての詳細な検討は行われていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、椎体形成におけるパールカンの作用機序を明らかにすることであった。また、特に以下の 2 つの課題について検討する予定とした。

- (1) 胎生早期の体節形成のシグナル制御におけるパールカンの機能解明
- (2) 胎生後期の骨化シグナルの制御におけるパールカンの機能解明

## 3. 研究の方法

- (1) 胎生 11.5 日のコントロール及びパールカン欠損マウスの脊索(notochord)形成について組織学的に検討した。
- (2) 胎生 16.5 日のコントロール及びパールカン欠損マウスの脊椎形成について組織学的に検討した。

## 4. 研究成果

- (1) パールカンは notochodal sheath にその発現が認められたことから、パールカン欠損マウスでは脊索形成に何らかの異常が認められることが予想された。しかし、胎生 11.5 日のパールカン欠損マウスにおける脊索形成は、コントロールマウスとの比較では、明らかな異常を認めなかった。
- (2) 胎生後期の脊椎形成におけるパールカンの機能については、長管骨の内軟骨性骨化と同様の役割を担う可能性があり、さらに椎間板にもパールカンが発現することから、パールカン欠損により何らかの異常を来す可能性が予想された。胎生 16.5 日のコントロールマウスの脊椎では、

椎体の成長板軟骨細胞層は、長管骨と同様に層状構造を示し、肥大軟骨の石灰化も認められた。また、椎間板の形成も髄核と繊維輪ともに確認できた。一方、パールカン欠損マウスの脊椎は、高度の側彎を呈した。組織学的には、椎体の発達遅延が認められた。10型コラーゲン陽性の肥大軟骨細胞は減少しており、von Kossa 染色陽性の石灰化軟骨は認められなかった。椎間板の形成も、髄核と繊維輪ともに認められなかった。

(3) 以上の結果より、パールカンの椎体形成における役割は次の可能性が考えられる。

- ① 脊椎の発生の過程の中で、体節と脊索形成に重要な役割を持つことが知られている因子のなかで、パールカンと結合するものとして、Wnt, Notch, Hedgehog (Shh, Ihh), FGF (FGF8, FGF18, FGFR3), Noggin, BMP, Sox (Sox5, Sox6) などが知られている (Development, 130, 1135-48, 2003)。パールカンが欠損しても脊索形成は認められたことから、ここまでのプロセスにおいてはこれらのシグナルはパールカン非依存的に機能するか、代償機能が働くことが示唆される。
- ② 椎体の内軟骨性骨化が始まる胎生 16.5 日においては、パールカンはこの過程を促進する機能があることが明らかとなった。パールカンはヒアルロン酸と同様椎体の成長板では最終分化段階の肥大軟骨細胞に強い発

現が認められる (Histochem Cell Biol 118, 269-80, 2002)。以上より、パールカンは長管骨の内軟骨性骨化と同様に、肥大軟骨、特に最終分化段階の肥大軟骨細胞層においては他のマトリックス蛋白には代償できない必須の役割を担うことが明らかとなった。その機序については不明であるが、FGF や VEGF といった最終分化段階の肥大軟骨において必須の役割を担うことが知られている因子のシグナル伝達に機能している可能性が考えられる。

- ③ 椎間板の発生には、やはり Hedgehog や BMP そして pax-1 や Sox (Sox5, Sox6) などの因子が重要な役割を担う (JOR 23, 1112-19, 2005)。パールカンはこれらの因子が機能する過程に重要な役割を担う可能性が示唆された。さらに、髄核の発生には、上記因子のほかに、sclerotome 由来の軟骨細胞から、notochord 由来の髄核前駆細胞への適度な力学的負荷が重要な役割を担うと考えられている (Development, 130, 1135-48, 2003)。パールカンはこの肥大軟骨細胞のもつ力学的負荷の保持に機能する可能性も考えられる。

## 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 0 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

- (1) 石島旨章、平澤恵理、鈴木喜晴、保住健太郎、小崎慶介、黒澤尚、山田吉彦、パールカンは内軟骨性骨化において FGF と VEGF シグナルを制御し血管侵入に必須の役割をする, 第 26 回日本骨代謝学会学術集会, 2008 年 10 月 29-31 日大阪
- (2) 石島旨章、平澤恵理、鈴木喜晴、保住健太郎、小崎慶介、黒澤尚、山田吉彦、パールカンは成長板軟骨において FGF と VEGF シグナルを制御し血管侵入と内軟骨性骨化 に必須の役割をする, 第 23 回日本整形外科学会基礎学術総会, 2008 年 10 月 22 日, 京都
- (3) M. Ishijima, E. Arikawa-Hirasawa, K. Hozumi, N. Suzuki, K. Kosaki, T. Matsunobu, Y. Yamada, Perlecan modulates FGF and VEGF signaling and is essential for vascularization in the development of the cartilage growth plate, 第 29 回米国骨代謝学会, September 16-19, 2007, Honolulu, HI, U. S. A.
- (4) M. Ishijima, E. Arikawa-Hirasawa, K. Hozumi, N. Suzuki, K. Kosaki, Y. Yamada, Perlecan modulates FGF and VEGF signaling and is essential for vascular invasion in the development of the cartilage growth plate, 第 59 回日本細胞生物学会, 2007 年 5 月 28 日 ~30 日, 福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石島 旨章 (ISHIJIMA MUNEAKI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号 : 70365576

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者