

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601  
研究種目：奨励研究  
研究期間：2021～2021  
課題番号：21H04238  
研究課題名 モデル動物を用いた筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群の骨・関節病変発症機序の解明

## 研究代表者

高橋 有希 (TAKAHASHI, Yuki)

信州大学・医学部・研究支援推進員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 470,000円

研究成果の概要：本研究では、筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群の疾患モデル動物を用いて骨の表現型解析を行った。透過型電子顕微鏡で大腿骨皮質骨の微細構造を観察したところ、コラーゲン細線維の会合不全が認められた。海綿骨部分の骨形態計測では、骨面と骨梁数の有意な低下が確認された。骨代謝マーカーの測定では、オステオカルシン（骨形成）で測定値が検出限界以下となり、Tracp-5b（骨吸収）では有意な差は認められなかった。これら骨代謝マーカーについては、今後遺伝子発現解析でも確認する予定である。以上の結果からコラーゲン細線維の会合不全や骨面、骨梁数の低下により骨質の変化や骨脆弱性が生じ、骨変形を引き起こすことが示唆された。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群（mcEDS）患者同様の表現型（脊椎後彎の増強等）を有する疾患モデルマウスを用いて、大腿骨皮質骨におけるコラーゲン細線維の会合不全や海綿骨部分の骨面、骨梁数の低下が認められたことから、それに伴う骨質の変化や骨脆弱性により脊椎後彎のような骨変形が生じることが示唆された。

本研究による骨表現型の解明は、運動機能障害によるQOL低下の最大の要因となる進行性の骨・関節病変（変形・弛緩・脱臼）で苦しむmcEDS患者の病状緩和や治療法開発に必要な不可欠であると考えられる。

研究分野：実験動物学（疾患モデル動物）

キーワード：筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群 Chst14KOマウス 骨病変 コラーゲン 透過型電子顕微鏡 骨代謝

1. 研究の目的

筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群 (mcEDS) は当教室で発見された疾患で、患者では進行性の骨・関節病変(変形、弛緩、脱臼)、皮膚脆弱性、巨大皮下血腫等の重篤な症状が認められる<sup>1)</sup>。特に骨・関節病変は運動機能障害による患者の QOL 低下の最大の原因であり、発症機序の解明と治療法の開発は急務である<sup>2)</sup>。

本症では、*CHST14* 遺伝子の病的変異による D4ST1 の活性消失に基づき、全身性のデルマトン硫酸欠乏を生じる。疾患モデル動物として、*Chst14* 欠損マウスの解析が進められているが、現在のところ骨・関節の表現型に関する報告はない。

申請者らは、これまでに *Chst14* 欠損マウスを用いた  $\mu$  CT 撮影と大腿骨 3 点曲げ試験を行い、脊椎後彎の増強と大腿骨の骨密度、剛性の有意な低下を突き止めた。本研究では、疾患モデルとして *Chst14* 欠損マウスを用いて脊椎変形や骨密度・剛性低下の原因となる骨の表現型を解明することを目的とした。

2. 研究成果

本研究では *Chst14* 欠損マウスを用いて骨の表現型について、①透過型電子顕微鏡を用いた骨微細構造の観察、②ELISA 法による骨代謝マーカーの測定、③骨形態計測による骨代謝動態の解析を行った。

① 透過型電子顕微鏡による大腿骨皮質骨微細構造の観察

1 歳齢雌マウスに 2.5%グルタルアルデヒドを灌流した後、大腿骨を摘出し数日間 2.5%グルタルアルデヒドに浸漬し固定した。アルコール系列で脱脂し、EDTA で脱灰後に骨幹部を細切して透過型電子顕微鏡サンプルとした。透過型電子顕微鏡にて皮質骨コラーゲン線維の観察を行ったところ、*Chst14* 欠損マウスでコラーゲン細線維同士の会合不全が認められた (図 1)。

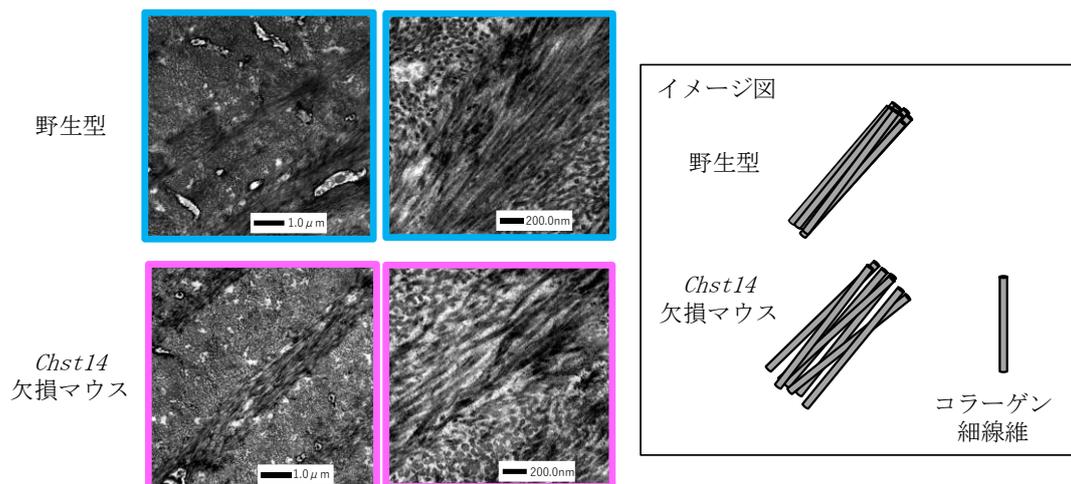


図 1. 大腿骨骨幹部皮質骨横断面の透過型電子顕微鏡写真

② ELISA 法による骨代謝マーカーの測定

12 週齢マウスと 1 歳齢マウスの血中オステオカルシン (骨形成マーカー) 濃度を ELISA 法で測定したが、測定値が検出限界以下となり測定不可であった。血中 Tracp-5b (骨吸収マーカー) の測定では、各週齢での野生型と *Chst14* 欠損マウスとの比較、野生型と *Chst14* 欠損マウスそれぞれの 12 週齢と 1 歳齢での比較のいずれも有意な差は認められなかった (図 2)。

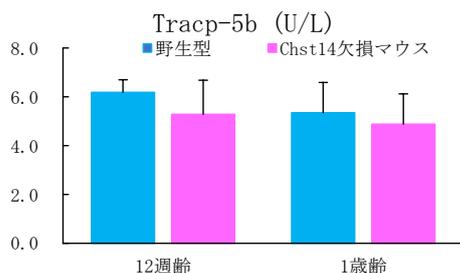


図2. 血中Tracp-5b (骨吸収マーカー) の測定

### ③ 骨形態計測による骨代謝動態の解析

12週齢マウス野生型5匹、*Chst14*欠損マウス5匹に骨標識剤のテトラサイクリンとカルセインを「01-03-01-01（テトラサイクリン投薬-3日休薬-カルセイン投薬-1日空けて骨採取）」の間隔で投与し、大腿骨海綿骨の骨形態計測を行った。*Chst14*欠損マウス3匹で標識剤が1種類しか観察されなかったため動的パラメータの比較は困難であった。静的パラメータの比較では*Chst14*欠損マウスで骨面と骨梁数の有意な低下が認められた（図3）。

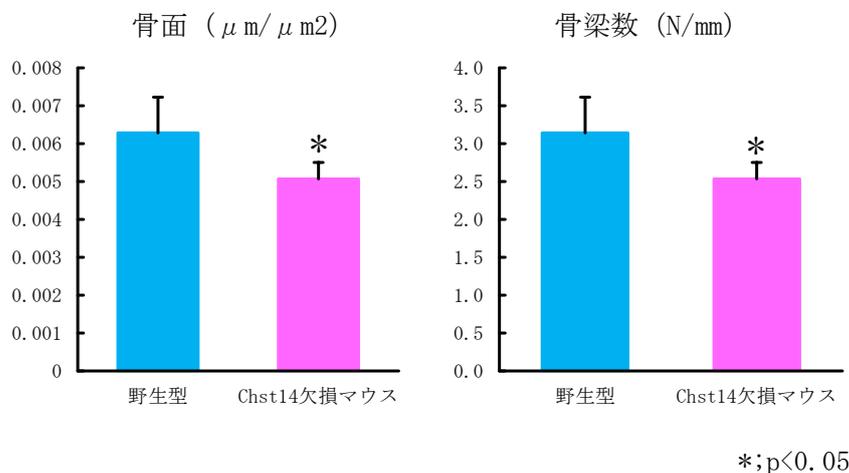


図3. 骨形態計測による海綿骨における骨面と骨梁数の比較

以上の結果から、*Chst14*欠損マウスにおいて皮質骨部分のコラーゲン細線維会合不全が生じること、海綿骨部分の骨面や骨梁数が低下することが明らかとなった。それにより、骨質の変化や骨脆弱性が誘発され、脊椎後彎の増強や大腿骨の骨密度、剛性低下の要因となる可能性が示唆された。骨代謝動態については、骨形成マーカーが測定不可だったことや、骨吸収マーカーについてもばらつきが大きかったことから、今後は遺伝子発現解析にて骨の表現型に関わる因子について確認し、より詳細な病態メカニズムの解明へと発展させていきたい。

#### <引用文献>

- 1) CHST14/D4ST1 deficiency: New form of Ehlers-Danlos syndrome. Kosho T. *Pediatr Int*, 58(2):88-99 2016.
- 2) Spinal manifestations in 12 patients with musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by CHST14/D4ST1 deficiency (mcEDS-CHST14). Uehara M, Kosho T, Yamamoto N, Takahashi HE, Shimakura T, Nakayama J, Kato H, Takahashi J. *Am J Med Genet A*, 176(11):2331-2341 2018.

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋有希、吉沢隆浩、嶋田新、古庄知己
2. 発表標題 筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群の疾患モデルマウス(Chst14-/-)の出生率に対するエンリッチメントの効果
3. 学会等名 第68回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋有希、吉沢隆浩、水本秀二、山田修平、古庄知己
2. 発表標題 1歳齢の疾患モデルマウス（Chst14-/-）を用いた筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群（mcEDS）の骨病変の解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋有希、吉沢隆浩、水本秀二、山田修平、古庄知己
2. 発表標題 疾患モデルマウスを用いた筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群（mcEDS）の骨病変解析
3. 学会等名 第2回日本エーラス・ダンロス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋有希、吉沢隆浩、嶋田新、古庄知己
2. 発表標題 筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群の疾患モデルマウス(Chst14-/-)の出生率に対するエンリッチメントの効果と繁殖用飼料の影響
3. 学会等名 信州実験動物研究会 第39回 研究発表会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
古庄 知己	(KOSHO Tomoki)
吉沢 隆浩	(YOSHIKAWA Takahiro)