

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591683

研究課題名（和文）Ⅱ型コラーゲン異常による骨系統疾患をモデルとした変形性関節症の病態解析

研究課題名（英文）Analysis of osteoarthritis: skeletal dysplasia due to type II collagen deficiency as a model

研究代表者

松井 好人（MATSUI YOSHITO）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教

研究者番号：80335348

研究成果の概要（和文）：早期発症の変形性関節症を主要症状とする骨系統疾患であるCzech dysplasiaは、Ⅱ型コラーゲンのArg275Cys変異を原因とする単一遺伝子病である。研究代表者は変形性関節症の病態をその中心病変分子であるⅡ型コラーゲンとマトリックスの超分子構造の観点から明らかにするため、マウスⅡ型コラーゲン遺伝子のプロモーターとエンハンサーによりArg275Cys変異を導入したⅡ型コラーゲンを過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、継代可能な独立した2系統が樹立された。

研究成果の概要（英文）：Czech dysplasia, showing early-onset osteoarthritis, is a skeletal dysplasia caused by a specific Arg275Cys mutation of the type II collagen. In order to investigate the pathomechanisms of osteoarthritis, focusing on the metabolism of type II collagen molecule and supramolecular structure of the collagen matrix, the principal investigator generated transgenic mice bearing type II collagen with Arg275Cys mutation overexpressed by the mouse type II collagen gene promoter and enhancer. Two independent inbred lines of transgenic mice were established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：関節病学、コラーゲン、骨系統疾患

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢社会を迎えたわが国において、老化を基盤として発症する運動器疾患の制圧は重要な課題である。国民生活基礎調査の概況（厚生労働省）によると、運動器疾患は介護が必要となった主な原因の2割以上を占め、経年的に増加傾向を示している。変形性関節症は最も頻度の高い運動器疾患のひとつで、身

体の立位保持や移動を担う膝関節や股関節の機能障害を通じて廃用症候群や寝たきりの増加に深刻な影響を及ぼしている。本症の多くは特発性で、その発症には老化に伴う運動器構成要素の変化に加えて、食事や運動などの生活環境要因と種々の遺伝的な素因が関与する多因子遺伝病と考えられている。国内外において変形性関節症の研究は精力的

に進められてきたが、その病態は本症の根本に内在する多様性ゆえに不明な点が多く残されている。

(2) 軟骨特異的に存在するコラーゲンと運動器疾患、とくに骨系統疾患との関係をテーマに基礎および臨床の両面から研究を展開してきた研究代表者は、変形性関節症を主要症状とする骨系統疾患の存在に着目するに至った。同じ変形性関節症であっても、発症年齢や罹患部位など、個々の症例にみられる形質には一定の相違があることが知られている。このことは単一遺伝子病である骨系統疾患においても該当する。例えば、多発性骨端異形成症は変形性関節症を主要症状とするが、IX型コラーゲンの異常によるものは比較的遅発性で、主に膝関節の変形性関節症を罹患するが、COMPの異常によるものは早期発症、股関節の罹患を主徴とする。そこで、研究代表者は変形性関節症における病態の多様性の一因は疾患感受性遺伝子がコードする軟骨特異的なたんぱく質の構造的相違にあると着想した。

(3) 本研究で着目した Czech dysplasia は、II型コラーゲンの Arg275Cys 変異を原因として、股関節と膝関節に早期発症の変形性関節症を起こす骨系統疾患で、2007年に独立した疾患単位として確立された。当初は欧州における一部の地域に由来した家系例のみが報告されていたため、共通の始祖を起源とする特定の人種に固有の病気であると認識されていたが、研究代表者が日本人家系の自験例において Czech dysplasia を臨床診断し、II型コラーゲンの Arg275Cys 変異を同定しゴードンカンファレンス(コラーゲン)にて報告して以降、この疾患は人種を超えて比較的高い頻度で存在する可能性があることと認識されるようになった(OMIM #609162)。Czech dysplasia は低身長を呈さず、典型的な変形性関節症以外には目立つ症候がないため、この疾患はある種の変形性関節症のモデルであると考えられた。そこで、II型コラーゲン代謝の側面から変形性関節症の病態を解析するために、II型コラーゲンの Arg275Cys 変異を導入したトランスジェニックマウスの作製を計画した。

## 2. 研究の目的

変形性関節症の多くは特発性で、複数の要因が相互作用して発症する多因子遺伝病であると考えられているが、早期発症の典型的な変形性関節症を主要症状とする骨系統疾患である Czech dysplasia は、II型コラーゲンの Arg275Cys 変異を原因とする単一遺伝子病である(Matsui et al., Am J Med Genet Part A 149A: 2285-2289, 2009)。本研究の目的は変形性関節症の病態を、その中心病変分子であるII型コラーゲンとマトリックスの超分

子構造の観点から明らかにすることである。具体的な目標は、Czech dysplasia を変形性関節症のモデル疾患としてとらえ、II型コラーゲンの Arg275Cys 変異を導入したトランスジェニックマウスを変形性関節症の動物モデルとして確立し、II型コラーゲン代謝の側面から変形性関節症の病態を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) Arg275Cys 変異(c. 823C>T)を導入したマウスII型コラーゲン遺伝子をマウスII型コラーゲン遺伝子のプロモーターとエンハンサー:pKN185(Nakata et al., J Biol Chem, 1996)を有するベクターに挿入して導入遺伝子を作製する。

(2) 増幅、精製した導入遺伝子を前核期受精卵にインジェクションし、誕生した産仔の耳部からDNAを抽出して遺伝子型の解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) マウスII型コラーゲン遺伝子のトランスジェニックマウスを作製するに当たり、野生型とトランスジェニックマウスを判別するスクリーニング方法が必要となった。導入遺伝子であるII型コラーゲン遺伝子のcDNAのみをPCR法で検出するため、イントロンの存在に着目してcDNAの上流と下流に2組のPCRプライマーを設計した。条件を検討した結果、内在性のII型コラーゲン遺伝子を増幅せず、導入したcDNAのみを増幅するスクリーニング方法が確立された。

(2) II型コラーゲン遺伝子のプロモーターとエンハンサー:pKN185(Nakata et al., J Biol Chem, 1996)に Arg275Cys 変異(c. 823C>T)を導入したII型コラーゲン遺伝子を挿入した導入遺伝子を注入した前核期受精卵(C57BL/6系統)を偽妊娠雌マウスに移植して得られ、離乳に至った11匹のF0ファウンダーマウスのうち4匹がトランスジェニックマウスであった(図1)。

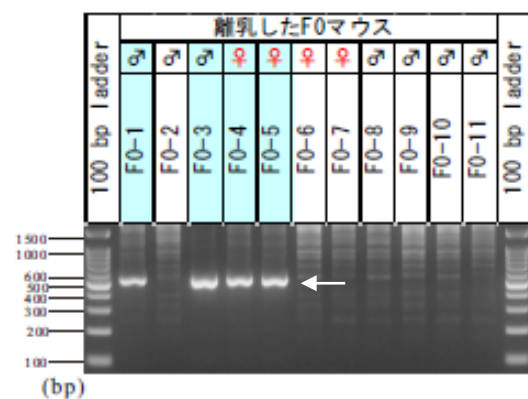


図1:F0マウスのPCR解析 バンドが検出されたF0-1、F0-3、F0-4、F0-5をトランスジェニックマウスと判断した(矢印)。

(3) 各 F0 個体を野生型 C57BL/6 系統のマウスと交配して得られた F1 産仔から組織を採取し、DNA を抽出して、PCR 法により変異遺伝子が染色体に取り込まれた個体を選別した。その結果、継代可能な独立した 2 系統が樹立された。これらの交配をさらに独立して進め、変形性関節症の初期兆候を注意深く観察しながら多数の個体を飼育している。

(4) 引き続き、樹立された継代可能な独立した 2 系統のトランスジェニックマウスについて、表現型を X 線および組織学的、生化学的に解析して、重症度の異なる変形性関節症のモデルとして確立する。軟骨コラーゲンの解析は、ペプシン消化産物に対しては塩析を行い、0.8 M 分画 (II 型コラーゲン) を精製する。これを還元または非還元の状態での SDS-PAGE に展開し、抗 II 型コラーゲン抗体を用いたウェスタンブロットにて同定する。野生型と変異型を比較することにより、変異によって新たに導入される Cys 残基が及ぼすコラーゲンフィブリルの形成やクロスリンクへの影響を解析する。CNBr 消化産物に対しては、Arg275 (変異アレルでは Cys) を含む CB12 を標的としてマッピングを行う。

(5) 今後、トランスジェニックマウスの軟骨コラーゲン解析を進めるために、その超分子構造の安定性を担う II 型コラーゲンと IX 型コラーゲンのクロスリンクを検出する方法を確立した (発表準備中、図 2)。

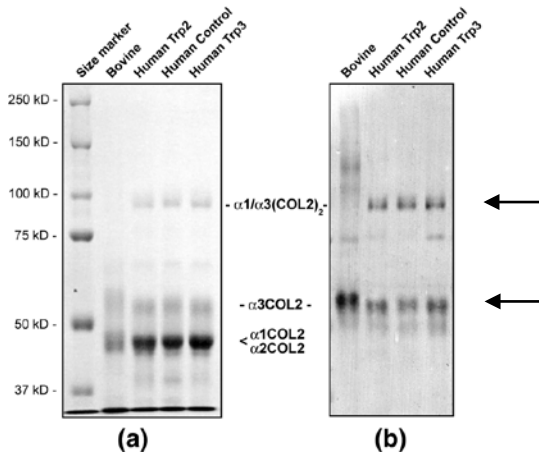


図 2 : II 型コラーゲン C-telopeptide と IX 型コラーゲン COL2 ドメインのクロスリンク解析 (a) IX 型コラーゲン COL2 ドメインの SDS-PAGE (クマシー染色)。 (b) II 型コラーゲン C-telopeptide に対する抗体 (10F2) を用いたウェスタンブロット。II 型コラーゲン C-telopeptide に対する抗体に反応するバンド (矢印) は IX 型コラーゲン  $\alpha 3$  鎖の COL2 ドメイン ( $\alpha 3$ COL2) を含んでおり、これは両者がクロスリンクしていることを示す。

(6) 本研究は、多様な表現形質を示す変形性関節症の病態の一因を、疾患感受性遺伝子がコードする軟骨特異的なたんぱく質の構造

的相違に求めた所に独創的な特色がある。II 型コラーゲン遺伝子の異常による Czech dysplasia は股関節と膝関節に典型的な変形性関節症を早期発症するため、Czech dysplasia のモデルマウスを解析すれば、ある種の変形性関節症の病態は II 型コラーゲン代謝の側面から解明できることが十分に予想される。そもそも、II 型コラーゲンは変形性関節症の病巣となる関節軟骨の最も主要な有機構成成分であるから、中心病変分子としてその病態の形成に深く関わっているはずである。現在までの軟骨マトリックス研究は、そのほとんどが遺伝子レベルにとどまっていることをみると、本研究で解き明かされるたんぱく質レベルでの関節軟骨の病理は、コラーゲンを中心とするマトリックスの超分子構造と機能の変化の理解を大きく進めることになり、学術的に意義がある。他方、現在までに用いられてきた変形性関節症の動物モデルは、半月板の切除や靭帯の切断といった関節構成体の物理的破壊によるもの (外傷モデル) であり、多くは特発性で自然に発症する変形性関節症のモデルとしては必ずしも適切ではない。本研究を通じて新たに自然発症する動物モデルを確立することは、薬剤の効果判定をはじめとした新規治療方法の開発に向けても意義がある。

#### 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 6 件)

- ① 松井好人、長田龍介、箭原康人、松下功、川口善治、木村友厚、大腿骨頭骨端線損傷を (Salter-Harris II 型) を生じた骨形成不全症の 1 例、第 23 回日本整形外科学会骨系統疾患研究会記録集、査読無、2012、15-16
- ② 鈴木賀代、松井好人、東元真実、川口善治、関庄二、元村拓、堀岳史、箭原康人、金森昌彦、木村友厚、Myxoid liposarcoma-associated EWSR1-DDIT3 selectively represses osteoblastic and chondroblastic transcription in multipotent mesenchymal cells、PLoS ONE、査読有、7 巻、5 号、2012、e36682、DOI:10.1371/journal.pone.0036682
- ③ 鈴木賀代、松井好人、橋本伸之、中紀文、荒木信人、木村友厚、吉川秀樹、上田孝文、Variation of myxoid liposarcoma: Clinicopathologic examination of four cases with detectable *TLS-CHOP* or *EWS-CHOP* fusion transcript whose histopathologic diagnosis was other than myxoid liposarcoma、ONCOLOGY LETTERS、査読有、3 巻、2012、293-296、

DOI:10.3892/ol.2011.480

- ④ 松井好人、木村友厚、大谷修、西村玄、池川志郎、短い中手骨と長い指節骨を特徴とするDesbuquois dysplasiaの亜型、第22回日本整形外科学会骨系統疾患研究会記録集、査読無、2011、31-33
- ⑤ 鈴木賀代、松井好人、遠藤健二、久保貴博、長谷川匡、木村友厚、大谷修、安井夏生、Myxoid liposarcoma with EWS-CHOP type 1 fusion gene、ANTICANCER RESEARCH、査読有、30巻、2010、4679-4684
- ⑥ 松井好人、軟骨異形成症と遺伝子異常、CLINICAL CALCIUM、査読無、20巻、8号、2010、34-41

[学会発表] (計7件)

- ① 松井好人、粘液型脂肪肉腫における組織像の多様性：診断的融合遺伝子が検出された4例の検討、第45回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、24年7月14日、東京国際フォーラム (東京都)
- ② 松井好人、大腿骨頭骨端線損傷を生じた骨形成不全症の1例、第49回日本リハビリテーション医学会学術集会、24年6月2日、福岡サンパレス (福岡県)
- ③ 松井好人、Clinicopathologic examination of four liposarcomas with detectable TLS-CHOP or EWS-CHOP fusion transcript whose histopathologic diagnosis was other than myxoid liposarcoma、第85回日本整形外科学会学術総会、24年5月19日、京都国際会議場 (京都府)
- ④ 松井好人、大腿骨頭骨端線損傷の1例、第31回日本リハビリテーション医学会北陸地方会、24年3月24日、金沢大学十全会館 (石川県)
- ⑤ 松井好人、大腿骨頭骨端線損傷 (Salter-Harris II型) を生じた骨形成不全症の1例、第23回日本整形外科学会骨系統疾患研究会、23年12月9日、京都全日空ホテル (京都府)
- ⑥ 松井好人、短い中手骨と長い指節骨を特徴とするDesbuquois dysplasiaの亜型、第22回日本整形外科学会骨系統疾患研究会、22年11月27日、徳島県郷土文化会館 (徳島県)
- ⑦ 松井好人、Czech dysplasia occurring in a Japanese family、第83回日本整形外科学会学術総会、22年5月29日、東京国際フォーラム (東京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松井 好人 (MATSUI YOSHITO)  
富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学) ・  
助教

研究者番号 : 80335348

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :