

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13601

研究種目：奨励研究

研究期間：2023～2023

課題番号：23H05319

研究課題名 骨損傷モデルを用いたChst14欠損マウスの骨代謝異常メカニズムの解明

## 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） 480,000円

研究成果の概要：本研究では、デルマタン硫酸(DS)欠損を有する疾患である筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群(mcEDS)の骨病態の解明を目的に、疾患モデルマウスを用いて骨損傷モデルを作製し、骨修復過程におけるDS欠乏の影響を解析した。その結果、 $\mu$ CT画像による経時的な骨孔の修復過程の観察では、骨孔閉鎖期間に有意な差は認められなかった。一方、摘出骨における骨孔部分を含む皮質骨の体積の計測では、野生型マウスよりも疾患モデルマウスの体積の増加が緩やかであり、仮骨様構造の吸収の時期も遅れる傾向が認められた。以上から、DS欠乏は骨の修復を遅らせることが示唆された。

## 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)患者類似の進行性の脊椎変形等の骨病変を有する疾患モデルマウスにおいて、骨の修復過程の遅延が認められた。このことから、骨の形成や吸収といった骨代謝のバランスが乱れることが骨病変の発症や進行に関与することが示唆された。

本研究成果は、患者の運動機能障害によるQOL低下を引き起こすmcEDSの骨病変の発症機序解明の一助となり、将来的な治療法開発につながることを期待できる。

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 Chst14 KOマウス 骨病変 骨代謝 骨損傷モデル

## 1. 研究の目的

筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群(mcEDS)は、結合組織の脆弱性による骨・関節病変を認める<sup>1)</sup>。特に、進行性の脊椎変形による運動機能障害は、QOL低下の最大の原因であるが、その発症機序や病態の進行を抑える方法は明らかでない<sup>2)</sup>。mcEDSでは、*CHST14*の病的バリエーションによる硫酸基転移酵素D4ST1の活性消失の結果、デルマタン硫酸(DS)欠乏が生じ、コラーゲン細線維の会合不全が認められる<sup>3)</sup>。また、疾患モデル動物として*Chst14*欠損マウス(*Chst14*<sup>-/-</sup>)を用いた解析が進められており、これまでに、皮膚ではコラーゲン細線維の会合不全や脆弱性等の患者類似の表現型が報告されている<sup>4)</sup>。一方で、骨・関節病変に関する疾患モデル動物での詳細な報告はない。

申請者らは*Chst14*<sup>-/-</sup>で骨・関節病変の解析に取組み、これまでに野生型(WT)と比較し大腿骨の骨密度と骨強度の低下、進行性の脊椎変形など、患者類似の表現型を発見した。また上記のような骨の表現型に関わる因子を解明するため、大腿骨のRNAを用いて遺伝子発現解析を実施したところ、*Chst14*<sup>-/-</sup>で加齢による*Bglap*(骨形成因子)の低下と*Acp5*(骨吸収因子)の増加がWTよりも顕著であった。そこで、本研究では、DSが骨代謝バランスの維持に関与している可能性を考え、骨損傷モデルを用いて*Chst14*<sup>-/-</sup>での骨再生過程に関連する因子の変動を解析し、骨変形や骨密度・骨強度の低下の要因を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究成果

本研究では、12週齢のWTと*Chst14*<sup>-/-</sup>の右大腿骨骨幹部に直径0.8mmの骨孔を形成した骨損傷モデルを作製し、骨再生過程に関連する因子の変動の解析に先立ち、以下の解析を実施した。

### (1) 骨孔閉鎖の様子の経時的観察

手術日をday0とし、day0, 3, 7, 10, 14, 21, 28の7ポイントで $\mu$ CT撮影を行い、骨孔の閉鎖の様子を経時的に観察した。 $\mu$ CT画像から3Dモデルを構築して骨孔部分の面積をImageJにて計測したところ、いずれのポイントにおいてもWTと*Chst14*<sup>-/-</sup>で骨孔部分の面積に有意な差は認められなかった。

### (2) 摘出骨の外観

day0, 3, 7, 10, 14, 21, 28の各ポイントで大腿骨を摘出し、外観の観察を行った。骨の修復過程で認められる仮骨様の構造がWTではday7と10、*Chst14*<sup>-/-</sup>ではday10と14で認められた。また、WTでは骨孔形成部位のほぼ反対側で骨の変形が認められ、骨孔形成時の周辺組織の損傷による異所性骨化が生じていると考えられた。

### (3) 骨孔周辺領域の体積の変動

day0, 3, 7, 10, 14, 21, 28の各ポイントで大腿骨を摘出し、骨孔を含む領域の皮質骨の体積を測定し、骨の修復過程を解析した。WT、*Chst14*<sup>-/-</sup>ともに外観写真で仮骨様構造が小さくなったタイミング(WT: day10-14、*Chst14*<sup>-/-</sup>: day14-21)で体積の一時的な減少が認められ、*Chst14*<sup>-/-</sup>の方が仮骨様構造の吸収のタイミングが遅いことが明らかとなった。また、WT、*Chst14*<sup>-/-</sup>それぞれについて、day0と他のポイントとの比較を行ったところ、WTではday10, 21, 28、*Chst14*<sup>-/-</sup>ではday14と28で体積の有意な増加が認められ、*Chst14*<sup>-/-</sup>は体積の増加がWTよりも緩やかであることが明らかとなった。

以上の結果をまとめると、 $\mu$ CT画像から構築した3Dモデルでは骨孔閉鎖期間に差が認められなかったのに対し、*Chst14*<sup>-/-</sup>では外観上の仮骨様構造形成時期や皮質骨体積の一時的な減少時期の遅れが認められたことから、骨内部での修復プロセスにDSが関わっており、*Chst14*欠損によるDS欠乏は骨の修復過程を遅らせることが示唆された。今後は本モデルを用いて*Chst14*<sup>-/-</sup>での骨修復過程に関連する因子の変動を解析し、mcEDSの骨病態の詳細な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.

- 3) Structural alteration of glycosaminoglycan side chains and spatial disorganization of collagen networks in the skin of patients with mcEDS-*CHST14*. Takuya Hirose, Naoki Takahashi, Prasarn Tangkawattana, Jun Minaguchi, Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada, Noriko Miyake, Shujiro Hayashi, Atsushi Hatamochi, Jun Nakayama, Tomomi Yamaguchi, Ayana Hashimoto, Yoshihiro Nomura, Kazushige Takehana, Tomoki Kosho, Takafumi Watanabe. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1863(3): 623-631 2019.
- 4) Systematic investigation of the skin in *Chst14*<sup>-/-</sup> mice: A model for skin fragility in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by *CHST14* variants (mcEDS-*CHST14*). Takuya Hirose, Shuji Mizumoto, Ayana Hashimoto, Yuki Takahashi, Takahiro Yoshizawa, Yuko Nitahara-Kasahara, Naoki Takahashi, Jun Nakayama, Kazushige Takehana, Takashi Okada, Yoshihiro Nomura, Shuhei Yamada, Tomoki Kosho, Takafumi Watanabe. *Glycobiology*, 31(2): 137-150 2021.

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋有希、吉沢隆浩、水本秀二、小野史子、嶋田新、上原将志、渡邊敬文、山田修平、高橋淳、古庄知己
2. 発表標題 筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群（mcEDS）の疾患モデルマウスを用いた包括的骨病態解析
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Takahashi, Takahiro Yoshizawa, Fumiko Ono, Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada, Tomoki Kosho
2. 発表標題 Pathophysiological investigation on skeletal manifestations of Musculocontractural Ehlers Danlos Syndrome
3. 学会等名 Human Genetics Asia 2023 (HGA2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋有希、吉沢隆浩、小野史子、岳鳳鳴、古庄知己
2. 発表標題 筋拘縮型EDSのモデルマウスによる破骨細胞分化誘導解析：骨病変の全容解明を目指して
3. 学会等名 第4回 日本エーラス・ダンロス症候群（EDS）研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学医学部ホームページ

<https://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/topics/2023/12/26182904.php>

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	(YOSHIZAWA Takahiro)