

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2013～2014  
課題番号：25870202  
研究課題名(和文) 肢芽の中で関節の位置はどのように決まるのか？

研究課題名(英文) The mechanisms of joint site determination

## 研究代表者

原田 理代 (HARADA, MASAYO)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：80555756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Fgf9のミスセンス変異マウスEksは、長管骨が大きく短く、肘・膝関節形成不全を示す。Eksマウスの骨格異常がどのような細胞、分子メカニズムで発症するのかを解明することで、FGFシグナルが関与する骨・関節形成機構を明らかにすることを目的とした。この研究により次のことを明らかにした。正常な肘・膝関節形成には、関節予定部位でのFGFシグナル抑制によるSfrp2とNogginの発現誘導が必要である可能性が示唆された。膝関節形成初期におけるFGFシグナル抑制は、関節腔と十字靭帯の区分化に必要である可能性が示唆された。FGFシグナルが軟骨形成に寄与し骨の太さを制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The goal of this research was to explore the developmental mechanisms of bone and joint formation related to FGF signaling utilizing Elbow knee synostosis (Eks) mutant mice. We identified a missense mutation in the Fgf9 gene that is responsible for the Eks mutant phenotype, which includes elbow and knee joint synostosis and a thick and short long bones. This research suggested that 1)The expression of Sfrp2 and Noggin induced by suppression of FGF signaling at the prospective elbow and knee joints is required for joint development. 2)Suppression of FGF signaling at the prospective knee joint is required for compartmentalization of articular cavity and crucial ligament in knee joint. 3)FGF signaling is required for the perichondrium formation and might regulate thickness of long bones.

研究分野：発生生物学

キーワード：関節 骨 FGF

## 1. 研究開始当初の背景

骨・関節疾患は、罹患者の行動を著しく制限し生活の質を低下させるので、早急な原因究明と治療法の開発が望まれている。近年、間葉系幹細胞等を用いた、骨や関節軟骨の再生医療が目覚ましい進歩を遂げている。しかしながら、意外にも、胎生期に骨や関節がどのようなメカニズムで形成されるのかについては、未だ不明な点が多い。骨・関節疾患の根治は、骨・関節の構造を正確に再構築することにあるので、個体発生における骨・関節形成機構を詳細に理解することは、根本的な治療法の開発につながる。

## 2. 研究の目的

私はこれまでに、長管骨が太く短く、肘・膝関節形成不全を示す自然発生突然変異マウス Eks の原因遺伝子が線維芽細胞増殖因子 9 (Fgf9) のミスセンス変異であることを同定した。本研究は、Eks マウスの骨格異常がどのような細胞、分子メカニズムで発症するのかを解明することで、FGF シグナルが関与する骨・関節形成機構を明らかにすることを目的とした。

### (1) 肘・膝関節位置決定機構の解明

肘・膝関節の発生は、肢芽内部の様な間葉系細胞凝集から、軟骨分化部位と関節分化部位を区別することから始まる。この関節位置決定は、関節形成に必要な最初のプロセスであり、関節発生機構を理解するうえで極めて重要であるが、未解明なままである。私は、これまでに、正常な肘・膝関節が形成されるためには、肢芽の関節予定部位で、FGF シグナルが抑制されることが必要であることを明らかにした。Eks ホモマウスの関節形成異常が発症する時期を検証し、肘関節発生のごく初期段階(胎齢 10.0 日)ですでに異常が検出されることがわかっていった。よって、Eks マウスは関節位置決定機構を解明するために非常に良いモデルである。そこで、本研究では、Eks ホモマウスの肘・膝関節表現型解析により、関節位置決定機構にどのような細胞、分子メカニズムが関与しているのか明らかにすることを目的とした。

### (2) 膝関節内構成体(半月板・十字靭帯)形成機構の解明

半月板と十字靭帯は、関節の中でも膝関節内のみ形成される特異な構造物である。運動や加齢で半月板及び十字靭帯を損傷すると変形性膝関節症を引き起こす可能性が高まり、実験動物でも半月板及び十字靭帯を切断すると変形性膝関節症を発症することが示されている。このように、半月板と十字靭帯は、膝関節発生機構を理解するうえでも、膝関節の機能や疾患を理解するうえでも、鍵となる重要な組織であるにもかかわらず、その発生学的知見は少ない。私はこれまでに、骨格標本により、Eks ヘテロマウスが胎生期から Eks ホモマウスよりも軽微な肘・膝関節形

態異常を示すことを確認している。Eks ホモマウスの膝関節は、胎生期に、軟骨になるべき部分が硬骨に変化し、半月板及び十字靭帯は形成されないが、Eks ヘテロマウスの膝関節は軟骨が残存しており、膝関節腔狭窄と半月板及び十字靭帯の形成異常が予想された。そこで、本研究では、Eks ヘテロマウスの胎生中後期における膝関節表現型解析を通して、膝関節内構成体がどのような細胞、分子メカニズムで形成されるのか明らかにすることを目的とした。

### (3) 長管骨の長さ、太さの制御機構の解明

長管骨の長さの制御機構に関しては比較的に知見が蓄積されつつあるが、骨の太さの制御機構に着目した研究は少ない。私は、これまでに、Eks ホモマウスの長管骨が短く太くなることを確認していた。そこで、本研究では、Eks ホモマウスの長管骨表現型解析を通して、長管骨の長さ太さの制御に FGF シグナルがどのように関与しているのか明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 肘関節位置決定機構の解析

Eks ホモマウスの前肢芽において、肘関節形成不全を誘導する異所的な FGF9 シグナルが、作用を及ぼしている分子を解析した。すなわち、FGF シグナル抑制の後にどのような分子機構が関節発生に必要なのか、解析した。具体的には、肘関節異常発症時期の Eks ホモマウス前肢芽と正常マウス前肢芽について、関節予定部位を DNA マイクロアレイに供し、遺伝子発現を比較することで、肘関節位置決定に関わると予測される分子を探索した。更に、候補分子について、Eks ホモマウスと正常マウスの肢芽組織内での発現を RNA *in situ* hybridization 法で比較した。

### (2) 膝関節内構成体(半月板・十字靭帯)形成機構の解析

Eks ヘテロマウスの膝関節形態異常の解析のために、成体ではマイクロ CT にて膝関節腔の観察を行い、胎生期では骨格標本にて観察を行った。更に、Eks ヘテロマウスの半月板及び十字靭帯の形態形成異常発症機構を明らかにするために、胎生期の組織切片を用い、免疫組織学的解析及び細胞死解析を行った。

### (3) 長管骨の長さ、太さの制御機構の解析

Eks ホモマウスの長管骨短縮の原因を明らかにするために、胎生期の橈骨について、組織切片を用い細胞増殖を解析した。また、Eks ホモマウスの長管骨が太くなる原因を明らかにするために、胎生期の上腕骨について、組織学的解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 肘・膝関節位置決定機構の解明

肘関節位置決定に関与する分子の探索を目的とし、肘関節異常発症時期の Eks ホモマウス前肢芽について、肘関節予定部位を DNA マイクロアレイに供し、正常マウスと遺伝子発現を比較することで、肘関節位置決定に関わると予想される候補分子を抽出した。発現が減少し、肘関節形成に貢献していると考えられる分子の他、軟骨膜及び筋肉での発現が報告されている分子についても発現が低下しているものが抽出された。

更に、候補分子の中からいくつかを抽出し、組織切片を用いて発現を解析したところ、Eks ホモマウスでは Sfrp2 と Noggin の発現が顕著に低下していた。Sfrp2 は Wnt 阻害分子であり、Noggin は BMP 阻害分子であることから、Eks ホモマウスでは異所的な FGF シグナルにより、Wnt/ $\beta$ -Catenin シグナル及び BMP シグナルの亢進が誘導されることで、関節形成が阻害されている可能性が考えられた。この結果から、正常な関節形成には、関節予定部位での FGF シグナル抑制による Sfrp2 と Noggin の発現誘導が必要である可能性が示唆された。

## (2) 膝関節内構成体（半月板・十字靭帯）形成機構の解明

2 か月齢の Eks ヘテロマウスの膝関節についてマイクロ CT で解析した。正常マウスと比較して大腿骨と脛骨の間の関節腔が狭窄していた。

膝関節内構成体形成機構に関して、正常マウスの膝関節は、胎齢 14.5 日頃に、大腿骨と脛骨の間の細胞群から半月板と十字靭帯の分化が始まり、十字靭帯の分化形成が進んだ後、胎齢 16.5 日頃に、細胞死により関節腔が形成されることがわかった。

胎齢 16.5 日胚について組織学的解析を行ったところ、Eks ヘテロマウスの膝関節は、半月板は形成されていたが、十字靭帯は靭帯様の細胞集団は認められたものの十字の正しい形状を形成していなかった。また、関節腔予定領域の狭窄が観察された。胎齢 16.5 日 Eks ヘテロマウスは、関節腔予定領域における細胞死が著しく減少しており、この細胞死の減少が、関節腔狭窄の原因ではないかと考えられた。更に、胎齢 16.5 日 Eks ヘテロマウスでは、関節腔予定領域で高発現する CD44 の発現が低下していた。胎齢 17.5 日の正常マウスでは、十字靭帯で Lubricin の強い発現が検出されたが、Eks ヘテロマウスでは膝関節領域全体で低レベルで発現し、特に発現が強い部位は無かった。Eks ヘテロマウスは、関節腔領域と十字靭帯領域の区画化が不明瞭になり、各々の分化も障害されていることが分かった。これらの結果から、膝関節形成初期における FGF シグナル抑制は、関節腔と十字靭帯の区分化に必要であることが示唆された。今後は、関節腔領域と十字靭帯領域を区分する分子機構の更なる解析と、関節腔予定領域で細胞死を誘導する分子機構

の解析が課題となった。

## (3) 長管骨の長さ、太さの制御機構の解析

Eks マウスの長管骨短縮の原因について、細胞増殖に着目して橈骨を解析した。胎齢 13.5 日で、Eks ホモマウスは橈骨の近位骨端において軟骨細胞の細胞増殖が低下していた。Eks ホモマウスでは、橈骨の近位骨端予定部位で異所的な FGF シグナルが検出されることから、骨端軟骨の細胞増殖維持には、FGF シグナルの抑制が必要である可能性が考えられた。

Eks マウスの骨が太くなる原因について、Eks マウスの原因遺伝子である Fgf9 は、軟骨膜と軟骨を取り囲む骨格筋において強く発現していることから、Eks マウスの長管骨の肥厚は、軟骨膜あるいはその周辺部の機能変化に原因があるかもしれないと仮説を立て、軟骨膜に着目して上腕骨の組織学的解析を行った。胎齢 12.5 日では、正常マウスの軟骨膜細胞は細長いのに対し、Eks ホモマウスの軟骨膜細胞はより円形に近い形をしていた。胎齢 13.5 日では、Eks ホモマウスは正常マウスと比較して軟骨膜細胞層が肥厚していた。この結果から、Eks マウスの骨が太くなる症状は軟骨膜細胞層の肥厚と関係している可能性が考えられた。FGF シグナルが軟骨膜形成に寄与し骨の太さを制御している可能性が推察された。

## 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5件)

Harada M, Omori A, Nakahara C, Nakagata N, Akita K, Yamada G. Tissue-specific roles of FGF signaling in external genitalia development. *Dev Dyn*. 2015; 244:759-773. 査読有 doi: 10.1002/dvdy.24277.

Okazawa M, Murashima A, Harada M, Nakagata N, Noguchi M, Morimoto M, Kimura T, Ornitz DM, Yamada G. Region-specific regulation of cell proliferation by FGF receptor signaling during the Wolffian duct development. *Dev Biol*. 2015; 400:139-147. 査読有 doi: 10.1016/j.ydbio.2015.01.023.

Omori A, Miyagawa S, Ogino Y, Harada M, Ishii K, Sugimura Y, Ogino H, Nakagata N, Yamada G. Essential roles of epithelial bone morphogenetic protein signaling during prostatic development. *Endocrinology*. 2014; 155:2534-2544. 査読有 doi: 10.1210/en.2013-2054.

Miyagawa S, Harada M, Matsumaru D,

Tanaka K, Inoue C, Nakahara C, Haraguchi R, Matsushita S, Suzuki K, Nakagata N, Ng RC, Akita K, Lui VC, Yamada G. Disruption of the temporally regulated cloaca endodermal -catenin signaling causes anorectal malformations. Cell Death Differ. 2014 21:990-997. 査読有 doi: 10.1038/cdd.2014.21.

Muro S, Yamaguchi K, Nakajima Y, Watanabe K, Harada M, Nimura A, Akita K. Dynamic intersection of the longitudinal muscle and external anal sphincter in the layered structure of the anal canal posterior wall. Surg Radiol Anat. 2014 36:551-559. 査読有 doi: 10.1007/s00276-013-1228-8.

〔学会発表〕(計2件)

岡澤美桂、村嶋亜紀、原田理代、木村正、山田源、繊維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)シグナリングによる領域特異的なウォルフ管上皮細胞増殖の調節について、第37回日本分子生物学会、2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

大森晶子、宮川信一、荻野由紀子、原田理代、石井健一郎、杉村芳樹、山田源、Bone morphogenetic protein (Bmp)シグナルは前立腺上皮細胞分化に必須である、第36回日本分子生物学会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 理代 (HARADA, Masayo)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80555756

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし