

機関番号：3 2 6 2 0

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791418

研究課題名（和文） パールカンの成長板軟骨への血管侵入における作用機序解明

研究課題名（英文） The molecular mechanisms of Perlecan for vascular invasion
in growth plate development

研究代表者

石島 旨章 (ISHIJIMA MUNAKI)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70365576

研究成果の概要（和文）：

パールカンは軟骨分化に必須のヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、本研究では成長板軟骨の血管侵入における機能を検討した。

パールカン欠損マウスでは、成長板軟骨への血管進入が阻害されたが、VEGFの発現は亢進していた。マウス前腕骨器官培養においてVEGF制御因子のFGFシグナルを阻害すると、パールカンが欠損しても肥大軟骨細胞層の10型コラーゲンの発現が亢進した。

以上より、成長板軟骨血管進入には、パールカンはFGFシグナル伝達に関与するのみならず、VEGF自身が機能するためにも重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Perlecan (Perl) is a heparin sulfate proteoglycan required for cartilage development. This study investigated the role of Perl for vascular invasion in growth plate development. While the vascular invasion was inhibited, VEGF expression was increased in Perl^{-/-} growth plate. In organ culture experiment, the growth plate was expanded by the addition of FGF-FGFR inhibitor even though the absence of Perl. These data indicate that Perl is essential for vascular invasion in growth plate development by not only modulating FGF signaling but also regulating VEGF function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・整形外科科学

キーワード： 骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

(1) ヘ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 Dyssegmental Dysplasia: DDSG)と、良性の経過をと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) 研究代表者は、パールカン欠損マウスでは、FGFR3のリン酸化が亢進することなど、内軟骨性骨化において重要な役割を

担うことを示してきた。

(4) 成長軟骨板への血管侵入には、VEGFシグナルが必須である。このVEGFシグナルは、FGFシグナルにより制御されている(*Amizuka et al, Bone, 2004*)。しかし、パールカン欠損成長板における血管侵入抑制はどのような分子機構によるのかは未だ明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、成長板軟骨における血管侵入機構におけるパールカンの機能解明であった。

3. 研究の方法

(1) パールカン欠損マウスの成長板軟骨への血管侵入の状態を、既知の血管制御因子の発現を調べることで検討した。パールカン欠損マウス胎生期の成長板軟骨における、VEGF(Vascular endothelial growth factor)やコンドロモジュリン1やCTGF(Connective tissue growth factor)などの既知の血管侵入制御因子の発現を、組織学的評価として

の免疫染色やウエスタンブロットを用いたタンパクレベルでの解析と、リアルタイムPCRを用いたmRNAレベルでの解析を行った。

- (2) 成長板軟骨への血管浸入に重要な役割を担うFGF(Fibroblast Growth Factor)シグナルが亢進しているパールカン欠損マウスに対して、FGFシグナルを抑制させるため、前腕骨の器官培養を用い、FGFレセプターのチロシンキナーゼ阻害剤であるSU5402を添加して、FGF-FGFRシグナルを阻害した。

3. 研究成果

(1)

- ①□ 成長板軟骨のパールカンが欠損すると、軟骨への血管進入が阻害されていた。
- ②□VEGFの発現は亢進していた。
- ③□コンドロモジュリン1やCTGFの発現も、野生型と比べ同レベルの発現が認められた。
- ④□さらに、VEGF120, -164, -188の三種類のアイソフォームのなかで、パールカン欠損マウスでは、特にVEGF164の発現が亢進していた。

(2)

- ① 胎生16.5日のコントロールマウスとパールカン欠損マウス

の前腕骨の器官培養に、FGFレセプターのチロシンキナーゼ阻害剤であるSU5402を添加して、FGF-FGFRシグナルを阻害した。これによりコントロールマウスの成長板軟骨は、横径と長径ともに増加した。この現象は、パールカン欠損マウスでも認められた。

- ② コントロールマウスでは、FGF-FGFRシグナルの阻害により、肥大軟骨細胞層の10型コラーゲンの発現が亢進していた。この現象も、パールカンが欠損した状態でも認められた。

- ③ コントロールマウスにおけるパールカンの発現は、肥大軟骨細胞層の細胞周囲に特に強く認められるが、FGF-FGFRシグナル阻害により、肥大軟骨細胞層のみならず増殖細胞層でも増加していた。

(3)

- ①□ 成長軟骨板への血管侵入は、軟骨から骨への置換の過程において、もっとも重要なプロセスの一つである。それは、無血管である軟骨が血管の豊富な骨へ置換されるという事象の根幹をなす現象であるからである。
- ② 成長軟骨板への血管侵入には、VEGFシグナルが必須である。さらにVEGFシグナルは、FGFシグナルにより制

御されている (*Amizuka et al, Bone, 2004*)。

- ③ また、コンドロモジュリン1やCTGFといった因子も成長板軟骨への血管侵入に役割を持つことが知られていた。
- ⑤ 本研究では、パールカン欠損成長板において血管侵入が抑制されていることを観察し、パールカンが血管侵入に必須の分子であることを新たに示した。細胞外マトリックス分子による血管侵入シグナルの制御という観点からアプローチした本研究は、内外を問わず重要かつ独創的な計画である。細胞外マトリックス分子は、硬組織及び結合織を含む軟組織においてその構成分子としての構造的役割が強調されてきた。しかし、それとともに発生や疾患におけるシグナルの足場として、またリモデリングにおける組織再生にも大きな役割を果たしていることを示した。具体的には、パールカンは、(1)細胞外マトリックスの構造的役割と、(2)シグナル制御の役割を、軟骨への血管侵入においても担っている可能性が示された。
- ⑥ パールカンが欠損した成長板軟骨における血管侵入が、VGDFの発現が亢進しているにも関わらず阻害されていたことについての機序については、更なる解析を必要とする課題として残った。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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