

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09623

研究課題名(和文) 多中心性手根骨足根骨溶解症における「骨溶解」の病態解明

研究課題名(英文) Investigation for pathogenesis of "osteolysis" in multcentric carpotarsal osteolysis

研究代表者

長谷川 高誠 (Hasegawa, Kosei)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：90467738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多中心性手根骨足根骨融解症患者に認められたMafB遺伝子変異(R63G変異、T62P変異)の骨芽細胞や軟骨細胞を用いて機能解析を行なった。軟骨細胞様細胞ATDC5と骨芽細胞様細胞MC3T3E1にこれらの変異型、野生型発現ベクターを一過性発現させ、骨芽細胞分化、軟骨細胞分化のマスター遺伝子であるRunx2 mRNAの発現量について検討した。MC3T3E1においてはMafBの過剰発現は細胞死を起し、検討を断念した。ATDC5においては細胞増殖中(野生型=T62P>R63G)、細胞が密集した状態(R63G>T52P>野生型)と分化段階による遺伝子発現量の違いが認められた。

研究成果の概要(英文)：We conducted functional analysis of Wild and mutant (T62P and R63G) in MC3T3E1 and ATDC5. Overexpression of wild MafB induced apoptosis in MC3T3E1. In ATDC5, we analyzed runx2 mRNA expression before confluent state and after confluent state and we observed different runx2 mRNA expression according to the differentiation stage (Before confluent state, wild=T62P>R63G; after confluent state, runx2 R63G>T52P>wild).

研究分野：小児内分泌

キーワード：骨形成 骨吸収

## 1. 研究開始当初の背景

多中心性手根骨足根骨溶解症 (Multicentric Carpotarsal Osteolysis, OMIM:#166300; MCTO)は進行性に手根骨、足根骨の骨溶解を来し、手足の変形、運動障害を起こす疾患である。2012年に転写因子である MafB が MCTO の原因であることが判明した (Zankl et al. AJHG, 2012 90, 494-501)。MafB は造血幹細胞の破骨細胞への分化を抑制している (Kim et al. BLOOD, 2007, 109(8), 3253-9) ことが知られており、MCTO の骨溶解は MafB の機能喪失による破骨細胞分化亢進が原因と想定されてきた。

一方、過去に我々は MafB 遺伝子異常 (p.P63R) を認める MCTO の患児に骨溶解の抑制目的に骨吸収抑制剤である bisphosphonate を長期的に投与したが、骨溶解は抑制できず、また通常は複数の手根骨が認められる2歳時に出現していなかった手根骨、足根骨がその後出現することはなかった。また骨吸収を数値化し、骨吸収の状態の指標となる骨吸収マーカーは同性、同年齢の値と比較しても高値ではなかった。これらの事から MCTO の骨溶解は骨吸収の亢進が原因である可能性は低いと考えた。また、過去に軟骨細胞での MafB mRNA 発現は確認され、軟骨細胞の分化に関与していることが報告されているが (Zhang et al. J Cell Biochem. 2013 Feb; 114(2):471-9)、これまで骨芽細胞系での発現は確認されていなかった。我々は軟骨細胞系の細胞 (ATDC5) のみならず骨芽細胞系の細胞 (MC3T3E1) においても MafB mRNA が発現していることを確認し、MafB が骨形成に何らかの役割を果たしていることを想定した。しかしながら骨形成における MafB 遺伝子の機能についての既報の報告はなく、現段階では不明であった。

## 2. 研究の目的

多中心性手根骨足根骨溶解症 (MCTO) は進行性の骨溶解をきたす先天性骨系統疾患である。MCTO の原因として転写因子である MafB 遺伝子が同定された。骨吸収における MafB の機能として破骨細胞への分化抑制があり、骨吸収の亢進が骨溶解の病態と考えられており、患者に対する骨吸収抑制剤の投与にも関わらず、骨溶解が抑制出来なかったことや MafB mRNA の発現が骨芽細胞、軟骨細胞にも認められたことから MCTO の骨溶解の病態の本体が骨形成の異常である可能性を考えた。本研究では骨形成における野生型、変異型 MafB の機能を *in vitro* で検討し、「MafB の骨形成における役割や MCTO における骨溶解の病態を明らかにすること」を目的に設定し、研究を計画した。

## 3. 研究の方法

### 1) 骨芽細胞における野生型 MafB 遺伝子の機能解析

マウス骨芽細胞様細胞である MC3T3E1 細胞において MafB の発現が認められたことから SiRNA で MafB をノックダウンもしくは野生型 MafB 発現ベクターをトランスフェクトして過剰発現させることで骨芽細胞への分化を司る転写因子である Runx2、Runx2 の後に骨芽細胞分化に関わる Osterix、そして骨芽細胞に発現するオステオカルシン (OCN)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、I 型コラーゲン (COL1A1) など骨芽細胞分化に関連する遺伝子群の発現の変化について Realtime PCR を用いて検討する。臨床的に骨吸収抑制剤が骨溶解に有効でなかったこと、MCTO 患児において骨吸収マーカーの亢進が認められなかったことから破骨細胞分化に必要な RANKL、さらに RANKL のデコイレセプターである OPG の発現についても Realtime PCR で検討を行い、破骨細胞の分化誘導能を検討する。さらに脂

肪細胞、筋細胞、軟骨細胞など他の細胞への分化傾向の有無について検討するため、これらの細胞に分化する際に発現する転写因子や蛋白である PPAR や MyoD、II 型コラーゲン (COL2A1) などの発現を Realtime PCR で検討する。

また SiRNA による MafB のノックダウン、発現ベクターのトランスフェクションによる野生型 MafB の過剰発現の状態において von Kossa 染色による石灰化能を検討する。

さらに MafB のアポトーシスへの関与の報告が有ることから、野生型 MafB の発現の増多により骨芽細胞のアポトーシスが亢進するかどうかについて、培養細胞の TUNEL 染色やカスパーゼ活性の測定、抗アポトーシス分子である Bcl-2、Bcl-XL の発現解析などにより比較検討を行う。

## 2) 軟骨細胞における野生型 MafB 遺伝子の機能解析

軟骨細胞においては過去に MMP3/13 およびアグリカンの発現を調節することで軟骨細胞分化に関わっているということが報告されているが (Zhang et al. J Cell Biochem. 2013 114(2):471-9)、これが軟骨細胞様細胞 ATDC5 において確認出来るかどうかを検討する。つまり MafB の発現量の増減により軟骨分化が促進するかどうか骨芽細胞での実験系と同様に SiRNA によるノックダウン、MafB の過剰発現により COL2A1、アグリカン、MMP3/13 mRNA の発現や軟骨細胞分化の最終段階である肥大軟骨細胞に発現する 10 型コラーゲン (COL10A1)、VEGF mRNA の発現量を Realtime PCR 法で検討する。またアルシアンブルー染色による軟骨基質の発現を比較検討する。骨芽細胞と同様にアポトーシスについても TUNEL 染色やカスパーゼ活性の測定、Bcl-2、Bcl-XL の発現解

析を行う。

## 4 . 研究成果

我々の施設において MCTO 患者に認められた p.Arg63Gly(R63G)変異、過去の文献で表現系の浸透率が 100%でない p.Thr62Pro(T62P)変異の骨芽細胞や軟骨細胞における骨分化能や細胞増殖能をはじめとした機能解析を継続した。軟骨細胞様細胞である ATDC5 細胞および骨芽細胞様細胞である MC3T3E1 細胞にこれらの変異の発現ベクターをトランスフェクション試薬により一過性に発現させ、ATDC5 細胞、MC3T3E1 細胞での Runx2 mRNA の発現量について検討した。MC3T3E1 細胞においては MafB の過剰発現は細胞死を起こしたため、検討を断念した。ATDC5 細胞については昨年の検討の結果 (コンフレント前であった場合 (野生型=T62P > R63G)、コンフレント後 (R63G > T52P > 野生型) になるという結果) の再現性があるのかどうかを検討し、同様の結果を得た。また SiRNA の導入による MafB ノックダウンの効果について検討を現在継続したが、MC3T3E1 細胞、ATDC5 細胞の両者において様々な条件設定を行なった上で MafB mRNA のノックダウンを試みたが、ノックダウン効率が悪く、解析が進まなかった。今後は MCOS 患者自身の細胞を iPS 細胞化して、骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞へ分化させ、それぞれの分化能や増殖能、破骨細胞系に分化させた場合は骨吸収能や多核化細胞への分化能などを検討して、MCOS の骨吸収の病態についての検討を行なっていくことを検討している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Hirai H, Hamada J, Hasegawa K, Ishii E. Acanthosis nigricans in a Japanese boy with hypochondroplasia due to a K650T mutation in *FGFR3*. Clin Pediatr Endocrinol, 査読あり,

2017;26(4):223-228.DOI:10.1297/cpe.26.223.

2. Higuchi Y, Hasegawa K, Yamashita M, Tanaka H, Tsukahara H. A novel mutation in the COL2A1 gene in a patient with Stickler syndrome type 1: a case report and review of the literature,査読あり,J Med Case Rep. 2017 Aug 26;11(1):237  
DOI:10.1186/s13256-017-1396-y.

〔学会発表〕(計3件)

1. 長谷川高誠 骨系統疾患の診療と遺伝子診断 西日本小児内分泌講演会 2018年3月24日 広島市
2. 長谷川高誠 子どもの成長、成長障害と成長曲線 第71回国立病院総合医学会 2017年11月10日 高松市
3. 長谷川高誠 今もう一度整理したいトランジション 軟骨無形成症～成人期の問題点と移行に向けて～ nordiscience forum 2017 2017年6月3日 大津市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 高誠 (HASEGAWA Kosei)

岡山大学病院・小児科・講師

研究者番号: 90467738

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

樋口 洋介 (HIGUCHI Yousuke)

山下 美保 (YAMASHITA Miho)