

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10466

研究課題名(和文)ヘパラン硫酸に着目した変形性膝関節症の新たな病態の解明

研究課題名(英文)The role of heparan sulfate in osteoarthritis

研究代表者

松本 和 (Matsumoto, Kazu)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40422711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Ext1 f/f x Prg4-Creを使用し、3M齢の同マウスは関節軟骨に肥大軟骨細胞の出現を認めた。免疫染色、in situ hybridizationにて同細胞のキャラクタリゼーションを行うと、MMP13の発現、Col10の発現を認め、まさに肥大軟骨細胞の特徴を有していた。これらの事実は変形性関節症の発症にヘパラン硫酸が関与している可能性を示している。
今後、薬剤の可能性を探り、更なる研究を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：We generated Ext1 f/f x Prg4-Cre mice, and found that these mice show the hypertrophic chondrocyte of articular cartilage. Hypertrophic chondrocyte is identified by the osteoarthritic change of joint cartilage, that means the lack of heparan sulfate may be related to the osteoarthritis. We further characterized these hypertrophic chondrocyte by in situ hybridization, and immunohistochemistry, and found that these chondrocyte truly has the character of hypertrophic chondrocyte.
In the near future, we will examine the possibility of drugs.

研究分野：整形外科

キーワード：ヘパラン硫酸 変形性関節症 Ext1

1. 研究開始当初の背景

軟骨は細胞成分に乏しく、その90%は細胞外マトリックスによって構成される。細胞外マトリックスは二大構成成分であるコラーゲン繊維と、プロテオグリカン会合体で構成され、後者の構成成分の一つがヘパラン硫酸プロテオグリカンである。ヘパラン硫酸は様々な成長因子と結合し、軟骨細胞の発達や機能維持に極めて重要な働きを演じている。

ヘパラン硫酸合成酵素である *EXT1*、*EXT2* は、多発性遺伝性外骨腫症 (MHE) の原因遺伝子として知られるが、その発症メカニズムはいまだ不明である。MHE は多彩な骨格の異常を呈し、四肢に多発する骨腫瘍を主症状とするが、四肢変形や OA を呈することが知られている (文献 1) また、申請者は、世界で初めて作製した MHE 疾患モデルマウス (文献 2) の関節軟骨において、OA 初期に認められる肥大軟骨細胞を認めることを見いだしている。これらの事実はヘパラン硫酸の欠乏が OA の発症と密接に関わっている可能性を示唆している。

本研究は、その知見を踏まえ、ヒトの OA 発症に及ぼすヘパラン硫酸の役割について分子生物学的観点からメカニズムを解明しようとするものである。

2. 研究の目的

ヘパラン硫酸合成酵素 (*EXT1*、*EXT2*) の異常で発症する多発性遺伝性外骨腫症では変形性関節症 (Osteoarthritis, OA) が発症することが知られている (文献 1) が、これまでにヘパラン硫酸と OA の関連について詳細に検討した報告は無い。申請者は *Ext1 flox/flox* マウス (*Ext1 cKO* マウス) を所有しており、本研究ではヘパラン硫酸が OA の発症に関与しうるか、またそのメカニズムについて検討を加える。この知見がヒトに適用できれば、ヒトの OA の機序解明と創薬に大きく貢献しうると思われる。そこで、本研究では、*Ext1 cKO* マウスを使用してヘパラン硫酸の OA への関与を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) Prg4-Cre x ROSA での Cre 発現の検討

Prg4 (Lubricin) は関節表面潤滑の重要な構成要素の一つで、Prg4-Cre マウスは Prg4 Promoter 領域の 3kb を使用して作製された Cre マウスである。その発現はマウスでは関節形成の終了した E14.5 以降に認められる (文献 3) 本解析ではまず、Prg4-Cre x ROSA マウスラインを確立し、その発現パターンを確認する。

(2) *Ext1f/f* x Prg4-Cre マウスラインの解析

まず本ラインでは自然発症型の OA を発症するかどうかを下肢関節 (主に膝関節) 中心に

解析する。解析は生後 0 日、2 週齢、4 週齢、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月のマウスを使用して組織染色を行い表現系を検討する。

(2)-①組織染色

膝関節を採取、ホルマリン固定後、0.5M EDTA にて脱灰処理を行う。その後パラフィン包埋を行い切片作製する。染色は Safranin O/Fast Green 染色で行う。

(2)-②免疫学的組織染色

前項で作製した組織切片を使用する。OA の初期では関節軟骨が肥大化することが知られている (文献 4) ため、肥大化軟骨のマーカーである Col2、Col10、Mmp13 での免疫染色を行う。また、軟骨変性の程度を評価するためマトリックス分子である Aggrecan の切断単を認識する抗体染色を行い変性の程度を評価する。

関節軟骨の肥大化を示した場合、そのメカニズムを検討する。これまでヘパラン硫酸が減少すると BMP シグナルが上昇するため、免疫染色にてその下流分子である pSmad の免疫染色を行い検討する。

4. 研究成果

(1) Prg4-Cre x ROSA での Cre 発現の検討
ROSA26 reporter マウスと Prg4-Cre マウスを掛け合わせ、生後 1 か月で x-gal 染色を行い、Prg4 の発現部位を確認した。膝関節の切片では Prg4-Cre マウスでは関節軟骨特異的に Prg4 発現を認めた (図 1)。

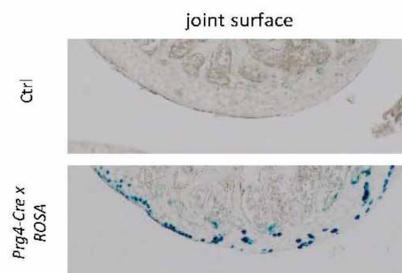


図 1: Prg4-Cre x ROSA での Cre 発現の検討

(2) *Ext1f/f* x Prg4-Cre (*Ext1-cKO*) マウスラインの解析

2-①組織染色

生後 0 日 (P0)、生後 14 日 (P14)、生後 1 か月 (P1M)、生後 3 か月 (P3M)、生後 6 か月 (P6M)、生後 12 か月 (P1Y) についてサフラン O ファストグリーン染色を行った (図 2)。WT (ctrl)、*EXT1*-CKO マウスを比較し、生後 0 日では明らかな違いを認めなかった。生後 14 日から関節軟骨に肥大軟骨細胞を認

めた。しかし、関節軟骨の破壊の所見は認めず、自然発症の OA は認められなかった (図 2)

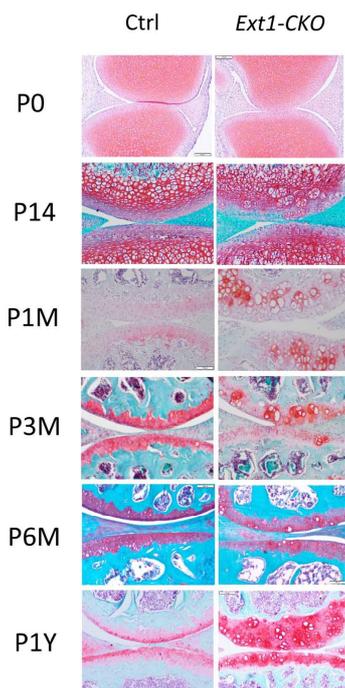


図2: Ext1-cKOマウス膝関節の組織学的検討.

(2) -②免疫学的組織染色

EXT1-CKO マウスでは肥大化した細胞に Col10 と Mmp13 の発現上昇を認めた。またアグリカンネオエピトープはノックアウトマウスの関節表面で発現上昇を認めた (図 3)

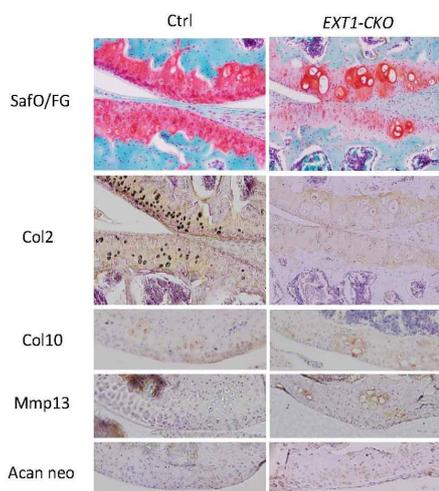


図3: Ext1-cKOマウス膝関節の免疫組織学的検討.

へパラン硫酸のノックアウトにより BMP シグナルの亢進を介して軟骨細胞の肥大化が起こるのではないかという仮説を立てた。生後 4 週マウスにおける BMP 応答シグナル因子の psmad1/5/9 の免疫染色では EXT1-CKO マウスの肥大細胞には psmad1/5/9 の発現が上昇していた。TGF-シグナルの psmad2/3 の免疫染色では明らかな発現の上昇は認めなかった (図 4)

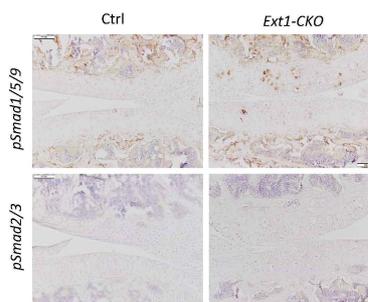


図4: Ext1-cKOマウス膝関節の免疫組織学的検討.

参考文献

1. Wicklund LC, Pauli RM, Johnston D, Hecht JT. Natural history study of hereditary multiple exostoses. Am J Med Genet. 1995 2;55(1):43-6.
2. Matsumoto K, Irie F, Mackem S, Yamaguchi Y. A mouse model of chondrocyte-specific somatic mutation reveals a role for Ext1 loss of heterozygosity in multiple hereditary exostoses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 15;107(24):10932-7.
3. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. J Clin Invest. 2005 115(3):622-31.
4. Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. Mol Cells. 2008 29;25(1):1-6.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

2016/11/19~20

第7回 Orthopedic Research Club (千葉)
川島健志、松本和、秋山治彦「関節軟骨での
へパラン硫酸の役割」

〔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〕
特に無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 和 (MATSUMOTO Kazu)
岐阜大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：40422711

(2) 研究分担者

秋山 治彦 (AKIYAMA Haruhiko)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60402830

小川 寛恭 (OGAWA Hiroyasu)
岐阜大学・医学系研究科・特任助教
研究者番号：70464104