

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 19～22 年度

課題番号：19791036

研究課題名（和文） 関節発生におけるヘパラン硫酸の役割の解明

研究課題名（英文） Role of Heparan sulfate in joint development

研究代表者 松本 嘉寛

（九州大学・大学病院・助教）

研究者番号：10346794

研究代表者の専門分野：整形外科

科研費の分科・細目：関節病学

キーワード：関節発生、ヘパラン硫酸

1. 研究計画の概要

遺伝性多発性外骨腫症 (Hereditary Multiple Exostoses; HME) は、多発性に発症する外骨腫を特徴とする、常染色体優性の疾患である。HME 家系の連鎖解析により、ヘパラン硫酸 (Heparan Sulfate: HS) 合成酵素である Exostosin (EXT) 1 が、HME の原因遺伝子として同定された。

HME 患者では骨関節の変形が高い頻度で見られる。そこで、四肢における EXT1 コンディショナルノックアウトマウスを作製した結果、変異マウスは(1)関節の消失、(2)長軸方向の成長障害、(3)合短指症、などの表現型を示した。このように、HS は四肢発生の様々な側面において、決定的な役割を果たしていることが予想される。そこで本研究においては、変異マウスの示した異常の中で、関節の消失という表現型に注目し、その詳細を解析し、HS による関節発生制御のメカニズムを検討することを目的とする

2. 研究の進捗状況

肢芽の形成の後、肢芽の遠近（指～肩）、前後（母指～小指）、背腹軸にそってパターンが形成される。続いて、肢芽内では側板中胚葉由来の間充細胞が集合して前軟骨性凝集 (Precartilagenous Condensation; PCC) が形成される。一方、間充細胞は Hox 遺伝子によって位置指定が行われ、それぞれの細胞が最終的にどのような形状の骨を形成するかについてのアイデンティティが付与される。ついで、PCC は伸長した後、分枝、分節され四肢組織のテンプレートとなり、骨

格構造が完成する。上記の各ステップの中で、関節発生には初期のパターン形成から PCC の分節化のステップが最も重要であると考えられる。

(1) 変異マウスの初期パターン形成、および PCC 分節化に焦点を絞り解析を行った。肢芽の正常な遠近パターンの確立には肢芽形成初期に外胚葉性頂堤 (Apical Epidermal Ridge; AER) が形成され、FGF-8、FGF-4 などの増殖因子が産生される必要がある。変異マウスにおいては、AER の形成、FGF-8、FGF-4 の発現はほぼ正常であった。このことは、変異マウスにおいては初期の遠近パターンは保たれていると考えられる。引き続き、変異マウス肢芽において、PCC の分節化が生じていないことを見いだした。このことは、肢芽における HS は PCC の形成に必須であることを確認した。変異マウスにおいては初期の遠近パターンは保たれていること、その一方で、PCC の分節化が生じていないことが明らかとなった。

(2) PCC の分節化、すなわち位置値の指定は Hox 遺伝子によって行われる。よって変異マウスにおける Hox 遺伝子の発現をホールマウント in situ hybridization 法 (ISH 法) で検討した。その結果、変異マウスにおいても Hox 遺伝子の発現は正常であることを確認した。また、初期の軟骨細胞のマーカーである Sox9 や Col1II を用いて ISH 法を行い、変異マウスでは本来関節となるべき PCC 中央部の中間細胞層の部位でも Sox9、Col1II の発現が消失していないことも見いだした。これらの結果は、変異マウスにおいては、PCC 内の位置

価指定といった Cell autonomous な step ではなく、細胞表面での HS の欠失のため周辺環境から細胞への情報伝達に異常が生じるために中間細胞層の形成が生じていないと考えられた

3. 現在までの達成度

区分② 概ね順調に進展している
(理由)

上述の結果に関しては、既に論文投稿中である。

4. 今後の研究の推進方策

四肢発生は基本的に以下に示す5つのステップにより構成されている。(1) 初期パターン (2) 位置価指定 (3) 前軟骨性凝集 (Precartilagenous Condensation; PCC) (4) PCCの遠近軸に沿っての分節 (5) 内軟骨性骨化である。前年度までの解析により、四肢発生時へパラン硫酸の欠損は上記(4)のステップを障害とすることが明らかとなった。今後は、以下の要領で研究を行う予定である

(1) 関節発生の進行に伴い PCC 中央部の数層の細胞が中間細胞層とよばれる扁平の細胞へと脱分化する。この中間細胞層から様々な組織が形成され最終的な関節構造が完成すると考えられている。近年、Transforming Growth Factor (TGF) ファミリーのひとつである Growth/Differentiation Factor5 (GDF5) や、ヒアルロン酸のレセプターである CD44 が、中間細胞層のマーカーであることが明らかとなった。そこで、それらの発現を関節形成時(胎生 12.5-13.5日)の組織標本を用いて解析し、変異マウスの PCC における中間細胞層の形成について検討する。さらに、中間細胞層の形成が変化している場合には、その原因と考えられる因子の探索を行う。予備的研究より、へパラン硫酸に結合する事が報告されている Bone morphometric protein (BMP) の四肢における分布が異常となり、中間細胞層の正常な形成が阻害されている可能性が高い。

(2) 軟骨分化、中間細胞層形成におけるへパラン硫酸の役割の細胞生物学的検討
関節形成時(胎生 12.5-13.5日)の肢芽を野生型、変異型マウスから採取、細胞を単離し micromass culture を行い、軟骨分化、中間細胞層形成を細胞生物学的に解析する。へパラン硫酸の欠失が、BMP をはじめとする各種因子の働きにどのように影響するかの検討が可能である。

5. 代表的な研究成果

(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6件)

1. Matsumoto Y, et al(他3名、1番目). Outcome of osteoplastic laminotomy for excision of spinal cord tumors. J Orthop Surg. 17, 275-279, 2009 査読有
2. Okada S, Maeda T, Ohkawa Y, Harimaya K, Saiwai H, Kumamaru H, Matsumoto Y, Doi T, Ueta T, Shiba K, Iwamoto Y. Does ossification of the posterior longitudinal ligament affect the neurological outcome after traumatic cervical cord injury? Spine. 34, 1148-1152. 2009 査読有
3. Iwao K, Inatani M, Matsumoto Y, Ogata-Iwao M, Takihara Y, Irie F, Yamaguchi Y, Okinami S, Tanihara H. Heparan sulfate deficiency leads to Peters anomaly in mice by disturbing neural crest TGF-beta2 signaling. J Clin Invest. 119. 1997-2008. 2009 査読有
4. Matsumoto Y, Matsuda S, Matono K, Oda Y, Tsuneyoshi M, Iwamoto Y. Intra-articular osteochondroma of the knee joint in a patient with hereditary multiple osteochondromatosis. Fukuoka Igaku Zasshi. 98, 425-430. 2007 査読有
5. Matsumoto Y, Irie F, Inatani M, Tessier-Lavigne M, Yamaguchi Y. Netrin-1/DCC signaling in commissural axon guidance requires cell-autonomous expression of heparan sulfate. J Neurosci. 27, 4342-4350. 2007 査読有
6. Kadoya K, Fukushi JI, Matsumoto Y, Yamaguchi Y, Stallcup WB. NG2 Proteoglycan Expression in Mouse Skin: Altered Postnatal Skin Development in the NG2 Null Mouse. J Histochem Cytochem. 2007; 56: 295-303. 査読有

[学会発表] (計1件)

Yoshihiro Matsumoto, et al. Essential role of heparan sulfate on axon guidance in developmental spinal cord The 53th annual meeting of the Orthopaedic Research Society 2007年2月11日 San Diego, USA

[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]

平成 21 年度

日本対がん協会福岡県支部がん研究助成金