

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09584

研究課題名(和文)先天性に骨・軟骨形成異常を示すラットの病因，病態解析

研究課題名(英文) Etiological and pathological analysis of rats with congenitally abnormal bone and cartilage formation

研究代表者

島田 ひろき (SHIMADA, Hiroki)

金沢医科大学・看護学部・教授

研究者番号：60278108

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)：我々はこれまでに先天性に短顔，脊椎の強い湾曲といった骨軟骨形成異常に関連する病態に加え，白内障，部分脱毛，皮膚の過角化の全身病態を示す系統のラットを確立している。このラットはコレステロール代謝系酵素遺伝子EBPの変異が原因であるX連鎖優性Conradi-Hunermann型点状軟骨異形成症と極めて類似している。

本研究はこれらラットの病因，病態を明らかにすることを目的とした。

全ゲノム解析の結果，x性染色体上のEbp遺伝子の対照群と病態群との間に変異は見られなかった。一方，x染色体上にはミスセンス変異となるSNPをもつ脂質代謝や骨形成に関連すると思われる遺伝子が存在した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で解析したラットは骨軟骨形成異常の病因解明を明らかにする上で非常に有用であると考えられる。さらにこの系統は骨軟骨形成異常のみならず，白内障，皮膚疾患等，広範囲な疾患の病因，病態を研究するうえで重要なモデルとなりうる。

研究成果の概要(英文)：We have previously established a strain of rats that exhibits congenital osteochondrodysplasia-related pathologies such as short face and severe curvature of the spine, as well as systemic pathologies such as cataracts, partial alopecia, and hyperkeratosis of the skin. This rat strain is very similar to the X-linked dominant Conradi-Hunermann type of petechial chondrodysplasia, which is caused by mutations in the cholesterol metabolism enzyme gene EBP.

The purpose of this study was to elucidate the etiology and pathogenesis of these rats.

Whole genome analysis revealed no mutation in the Ebp gene on the x sex chromosome between the control and the pathological groups. On the other hand, there were genes with missense mutations on the x chromosome that are thought to be related to lipid metabolism and bone formation.

研究分野：発生学

キーワード：骨軟骨形成 白内障 脱毛 脂質代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでに先天性に短顔、脊椎の強い湾曲といった骨軟骨形成異常に関連する病態に加え、白内障、部分脱毛、皮膚の過角化の全身病態を示す系統のラットを確立した。

これら全身症状はコレステロール代謝系遺伝子異常が原因である X 連鎖優性 Conradi-Hünermann 型点状軟骨異形成症 (CDPX2) と極めて類似している。

CDPX2 は出生から乳幼児期にかけて骨端軟骨とその周囲軟部組織に点状石灰化像を呈し、骨端核の出現の遅滞による変形や形成不全が生じ、鼻根部平坦と短い鼻、低身長、短い四肢、四肢骨の変形、側弯などが見られる疾病であり、白内障、魚鱗癬皮膚病変、部分脱毛などを伴う。病因は emopamil-binding protein (EBP) 遺伝子の変異であり、X 連鎖優性で変異の度合いによって男性致死で 95% が女性である。EBP はコレステロール合成系酵素 sterol $\Delta 8$, $\Delta 7$ -isomerase であり、臨床診断女児の 85-95%, sterol profile 異常女児の 91%, 男児の 100% で変異が見られる。これまでコレステロール合成と骨軟骨形成の関連性については数多く報告されてきた。軟骨細胞は幾つかのコレステロール合成系タンパク質を発現しており、これらの発現は軟骨形成時に上昇し、コレステロール合成を促進している (Villalvilla ら, Review, 2013)。また、コレステロールが軟骨細胞の肥大化を促進し、アポトーシスを抑制していることも報告されている。この様にコレステロール合成が軟骨細胞分化に関わることも明らかとなっているが、その作用機序に関しては不明な点が多い。さらに高コレステロール血症と変形性関節症 (OA) の関係も報告されているが、コレステロール合成経路阻害剤スタチンが OA の進行を抑制するという報告がある一方で改善が見られないという報告もあり、はっきりしていない。骨形成とコレステロール合成との関係性については、代表的なものとしてスタチンによる骨形成効果やエストロゲン減少による骨吸収の増加がある。スタチンによる骨形成効果はコレステロール合成初期物質イソプレノイドによるものである。EBP はコレステロール合成経路の後期に関与するので、CDPX2 の病態はコレステロール合成初期段階に関連するものではないと考えられる。ステロイドホルモンであるエストロゲン減少は破骨細胞分化を促すことがわかっている。この作用機構として破骨細胞分化因子 RANKL や分化抑制因子 OPG が関わっていることがわかっているが、関連する細胞でのエストロゲン作用を媒介するエストロゲンレセプターについてはいまだよくわかっておらず、その機構は明らかでない。

以上のように、骨軟骨形成にコレステロール合成代謝経路がどの様に関わっているかはいまだによくわかっていない。

われわれが独自に確立したラットは Wistar Hannover 系より得られたもので、白内障単独で発症する系と、そのなかから派生した骨形成異常、白内障、皮膚病変の全身性病態を持つ系の 2 系統がある。骨格異常の動物モデルは数多くある。自然発症型としては 2 型コラーゲン (COL2)、軟骨細胞増殖を抑制する FGF3、軟骨形成に関与する C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)、RANKL および OPG の遺伝子変異によるものであるが、コレステロール代謝に関連したものではない。また、遺伝子改変マウスも COL2 や骨形成タンパク (BMP) 遺伝子発現に関与する Smad 遺伝子を改変したもの等、脂質代謝に関連したものは無い。EBP 変異のマウスモデルは報告されているが、骨格系の異常と皮膚病変は発症しているものの白内障を発症しているものはない (Seo et al, 1997, Derry et al, 1999)。以上のことから本ラットは今までにない新しいモデルであると考えられる。よって、その病因、病態を解明することは、他のモデルにない知見が得られると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではこれらラットの全ゲノム解析、脂質プロファイル解析、発生学的形態解析、遺伝子およびタンパク解析、in vivo, in vitro での機能解析等をおこない、その病因、病態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンスによる全ゲノム解析: 対照を含めた 3 系統ラットの肝臓より DNA を調製し、それより全ゲノム解析 (シーケンシング、リファレンスゲノムへのマッピング、SNV (一塩基変異) および InDel (挿入・欠失変異) 検出、CNV (コピー数変異)) をおこなった。全ゲノム解析は株式会社ファーマフーズ・アプロサイエンスグループに受託した。全身病態系ラットは病態が雌に顕著に現れるため、DNA 試料は各群雌 2 匹づつ調製した。

(2) 透明標本による形態学的解析: 胎仔、新生仔の皮膚および筋をわれわれが開発した迅速組織透明化法 RAP で透明化した後、軟骨、骨染色をおこない、発生段階の軟骨、骨形成過程を解析する。

4. 研究成果

当初の予定では、研究方法 (1)、(2) に加え、リポドミクスによる脂質代謝産物解析 (受託、)

交配試験による遺伝形式の解析，胎仔から成体への組織学的病態変化の解析，これらの解析から明らかになった病因遺伝子候補を軟骨細胞へノックイン，ノックアウトした細胞培養実験，病因遺伝子候補の遺伝子改変マウス作成を行い，本モデルにおける骨軟骨形成異常の病因，病態とコレステロール合成代謝系との関係を明らかにする予定であった。しかしながら，系統を維持している間に，白内障単独発症系，全身病態系の群でその形質が一部弱まってしまう個体が散見されたため，再度，より強い形質の個体の交配を続け，目的の形質をもつ群の維持と数を増やした。特に全身病態系の群の形質がなかなか固定されず，2022 年末にようやく実験を行うに必要な各群の匹数がそろった。そのため，(1)次世代シーケンスによる全ゲノム解析は行ったが，(2)胎仔，新生仔の経時的透明標本作成は全て終わらなかった。

全ゲノム解析の結果，本研究のラットでは，Ebp 遺伝子（x 性染色体上にある）の対照と白内障群，対照と全身病態群，白内障群と全身病態群との間に変異は見られなかった。一方，x 染色体上にはミスセンス変異となる SNP をもつ脂質代謝や骨形成に関連すると思われる遺伝子が存在した。なお，常染色体上の解析は現在進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shintani Akari, Sakata-Haga Hiromi, Moriguchi Keiichi, Tomosugi Mitsuhiro, Sakai Daisuke, Tsukada Tsuyoshi, Taniguchi Makoto, Asano Masahide, Shimada Hiroki, Otani Hiroki, Shoji Hiroki, Hatta Junko, Mochizuki Takashi, Hatta Toshihisa	4. 巻 1
2. 論文標題 MC5R Contributes to Sensitivity to UVB Waves and Barrier Function in Mouse Epidermis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JID Innovations	6. 最初と最後の頁 100024 ~ 100024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xjidi.2021.100024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kariyama Nobuo, Sakata-Haga Hiromi, Tsukada Tsuyoshi, Shimada Hiroki, Taniguchi Makoto, Hatta Toshihisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Rapid bone staining with hair removal (RAP-B/HR): a non-destructive and rapid whole-mount bone staining protocol optimized for adult hairy mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81616-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 狩山信生, 坂田ひろみ, 塚田剛史, 島田ひろき, 八田稔久
2. 発表標題 有毛動物に最適化した迅速全身骨染色法 (RAP-B/HR) によるマウス関節病変の描出
3. 学会等名 第61回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新谷 明里, 坂田ひろみ, 盛口敬一, 友杉充宏, 酒井大輔, 塚田剛史, 谷口真, 浅野雅英, 島田ひろき, 大谷浩, 東海林博樹, 八田順子, 望月隆, 八田稔久
2. 発表標題 マウスの皮膚バリア形成におけるメラノコルチン5受容体の役割
3. 学会等名 第62回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------