

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591739

研究課題名（和文） 靱帯骨化症の分子基盤 Runx3 遺伝子欠損マウスを用いた検討

研究課題名（英文） Elucidation of the molecular pathogenesis of calcification of the ligament

研究代表者

阿江 啓介（AE KEISUKE）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20376726

研究成果の概要(和文):我々は Runx3 欠損マウスを用いた個体レベルの検討において、Runx3 が骨芽細胞の増殖に重要であることを見出した。また、Runx3 は靱帯の骨化には直接的には影響を及ぼさないことを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文): We uncovered that Runx3 regulates osteoblast proliferation by means of Runx3-deficient mice. We also studied the role of Runx3 in calcification of the ligament and observed that Runx3 does not play a major role in OPLL though the use of mouse model of OPLL.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2009 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学

1. 研究開始当初の背景

日本は世界一の長寿国家となり、高齢者人口は急速に増加している。高齢者の生活の質を考える際、変形性関節症、骨粗鬆症などの骨関節疾患のマネジメントはきわめて重要である。後縦靱帯骨化症、黄色靱帯骨化症は多くは進行性で、長期にわたり麻痺を放置すると全横断性脊髄麻痺となる予後不良の疾患であり、その病態解明は急務である。靱帯骨化症発症の危険因子として全身的骨化素因、局所の力学的要因、炎症、ホルモン異常、カルシウム代謝異常、糖尿病、慢性外傷などが知られており、従って靱帯骨化症は多因子疾患であると考えられている。なかでも我が国における後縦靱帯骨化症患者の家系調査

により高率な多発家系の存在することが明らかとなり、本症の成因に遺伝的背景が大きな役割をなしていることが示唆されている。しかしながら、靱帯骨化症を惹起する遺伝的素因の詳細は未だ不明である。靱帯骨化症に類似した病態を自然発症するモデルマウスとして *ttw* マウスが知られている (Ikegawa ら *Nat Genet* 1998)。ヒトの靱帯骨化症患者や *ttw* マウスで認められる靱帯骨化領域は、骨化に先立ち、軟骨細胞の増殖や肥大化といった内軟骨性骨化に類似した組織像を呈する (Yamamoto Y ら *Spine* 2002) ことから、靱帯骨化症の病態に内軟骨性骨化が関与している可能性が示唆されているがその詳細は不明である。Runx1,2 およ

び3はRunxファミリーに属する転写因子であり、遺伝子欠損マウスの解析からRunx2が骨芽細胞分化に必須であること(KomoriらCell 1997)が知られている。

これまでに我々は軟骨特異的にRunx2を発現するトランスジェニックマウスを作成しRunxが軟骨細胞肥大化に重要であることを報告した(Takeda et. al. Genes & Dev 2001)。さらに、このマウスは変形性関節症を呈することを見出し、重力負荷によりRunxの発現が誘導されることを明らかにした(阿江らArthritis Rheum in revision)。また、我々はRunx2欠損ヘテロにより変形性関節症が軽減することを明らかにした(KamekuraらArthritis Rheum 2005)。このように、我々はRunx2が軟骨細胞の肥大化を生理的に調節することを明らかとした。靭帯骨化においても、我々はRunx2に注目しRunx2ヘテロ欠損マウスでttwでみられる靭帯骨化が軽減されることを見出した(JBMR (22)S 2007)。

2. 研究の目的

Runx3はRunx2と協調的に軟骨細胞の肥大化を調節すること(Yoshida, KomoriらGenes & Dev 2004)が示されている。しかしながらRunx3の骨芽細胞分化における意義、またRunx3の靭帯骨化における作用についてはこれまで明らかでない。

本研究では靭帯骨化症におけるRunx3の役割に着目し、Runx3欠損マウス及びRunx2欠損マウスおよび靭帯骨化症モデルマウスを用いてRunx3の骨、軟骨代謝における作用の分子基盤を包括的に解析することを目指した。

3. 研究の方法

我々は、イスラエルWeizmann研究所副所長のGröner教授らとの共同研究によりRunx3欠損マウスを得て、その骨軟骨代謝動態を組織学的に解析した。さらに、靭帯骨化症モデルマウスであるttwマウスと交配させ、後縦靭帯の骨化部位を組織学的に解析し、靭帯骨化症におけるRunx3の意義の解明を試みた。

4. 研究成果

1)Runx3欠損マウスの骨代謝動態の解析
Runx3欠損マウスは既報とは異なり(YoshidaらGenes & Dev 2004)、骨、軟骨に明らかな異常を示した。

Runx3欠損マウスは出生直後より野生型マウスに比べて約30%体長が短く、成長とともにその程度が増悪した。また、Dexa法による骨密度測定ではRunx3欠損マウスは骨密度が低下する傾向にあった。

野生型 Runx3欠損



組織学的に検討するため、4、12週齢のマウスの骨を樹脂包埋し非脱灰切片を作成し、骨形態計測を行った。その結果、Runx3欠損マウスでは骨量の低下とともに、骨形成率の著明な低下が認められ、Runx3が骨形成に関わることが初めて明らかとなった。Runx3欠損マウスから得た骨芽細胞を培養したところ、その増殖は極めて遅かった。一方、骨芽細胞の分化には大きな異常は認められなかった。

Runx2は骨芽細胞分化のマスター因子として、Runx1は間葉系細胞から軟骨へのカギ分子としてよく知られているため、Runx1/Runx2/Runx3欠損ヘテロマウスを作製したが、大きな骨格系の異常は認められなかった。そのため、Runx1/Runx2/Runx3三重欠損ホモマウスを作成し、骨格系の形成におけるRunx1,2,3の協調的な作用について検討を進めた。

1)靭帯骨化症発症におけるRunx3の意義の解明、Runx2との協調的作用の検討

靭帯骨化症におけるRunx3の意義を解明すべく、ttwマウスとRunx3欠損マウスを交配し二重遺伝子変異マウス(Runx3^{-/-}/ttwマウス)を作成した。

靭帯の肥厚、石灰化が認められる8週齢、12週齢において石灰化部位をμCTを用いて三次元的に再構築し、定量したが、Runx3欠損の有無で明らかな差異は認められなかった。すでに我々は靭帯の骨化にRunx2が重要であることを見出しているが、Runx3がRunx2と協調的に靭帯の骨化を調節する可能性を検討するため、Runx2^{+/-}/Runx3^{-/-}/ttwマウスを作成し、解析をすすめた。

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4件)

伊藤総一郎、関野洋一、阿江啓介
巨大腫瘍を形成した脂肪腫と脂肪肉腫の治療経験
化学療法研究所紀要. 38巻():52-57 2008

小柳広高、松本誠一、真鍋淳、阿江啓介
再発性軟部肉腫の治療
日本整形外科学会誌 2009; 83(1): 22-27 2009

Hisaoka M, Ishida T, Kuo TT, Matsuyama A, Imamura T, Nishida K, Kuroda H, Inayama Y, Oshiro H, Kobayashi H, Nakajima T, Fukuda T, Ae K, Hashimoto H.
Clear cell sarcoma of soft tissue: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 33 cases
American Journal of Surgical Pathology.

32(3):452-60 2008

Kimura A, Inose H, Yano F, Fujita F, Ikeda T, Sato S, Iwasaki M, Jinno T, Ae K, Fukumoto S, Takeuchi Y, Itoh H, Imamura T, Kawaguchi H, Chung U, Martin JF, Iseki S, Shinomiya K, Takeda S. Runx1 and Runx2 cooperate during sternum morphogenesis. *Development* 137:1159-1167, 2010

〔学会発表〕(計 14件)

The 7th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society
一般演題(口演)
Well-Differentiated Liposarcoma -An Analysis of Recurrent Cases.
Ae K, Matsumoto S, Manabe J, Tanizawa T, Kawaguchi N, Kuroda H, Shinomiya K.
北京 2008.9.25

The 8th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society
一般演題(口演)
Safety surgical margin for musculoskeletal tumor surgery
Ae K, Matsumoto S, Manabe J, Tanizawa T, Kawaguchi N, Kuroda H, Shinomiya K.
Philippine 2010.2.27

特別講演

The 20th Forum of the Surgical Society For Musculoskeletal Sarcoma.
Analysis of Safety Margins Based on Registration of Surgical Margins in Japan.1980 - 2006
Ae K.
東京 2008.3.27

特別講演

The 21st Forum of the Surgical Society For Musculoskeletal Sarcoma.
Analysis of Safety Margins Based on Registration of Surgical Margins in Japan1980 - 2007
Ae K.
東京 2009.3.28

特別講演

The 22nd Forum of the Surgical Society For Musculoskeletal Sarcoma.
Analysis of Safety Margins Based on Registration of Surgical Margins in Japan1980 - 2007
Ae K.
東京 2010.3.27

第 41 回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学

術集会

主題口演

非円形軟部肉腫における化学療法の意義
MFHと滑膜肉腫について
阿江啓介、松本誠一、真鍋淳、黒田浩司、下地尚、谷澤泰介、五木田茶舞、小柳広高、重光俊男、四宮謙一、川口智義、蛭田啓之
2008.7.17-18

第 42 回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術集会

ポスター 優秀演題賞

軟部肉腫における至適経過観察法
阿江啓介、松本誠一、真鍋淳、下地尚、黒田浩司、谷澤泰介、五木田茶舞、佐藤信吾、小柳広高、川口智義、四宮謙一
2009.7.16-17

第 42 回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術集会

一般口演

Differential diagnosis of well-differentiated lipoma like liposarcoma by using molecular biological method
五木田茶舞、阿江啓介、下地尚、石田剛、三木義男、四宮謙一
2009.7.16-17

第 43 回日本整形外科学会 骨軟部腫瘍学術集会

モーニングセミナー

前腕から手にかけての骨・軟部腫瘍の治療
阿江啓介
2010.7.16

第 82 回日本整形外科学会学術総会

一般演題

骨軟部腫瘍手術計画における安全な切除縁設定
阿江啓介、松本誠一、真鍋淳、下地尚、黒田浩司、谷澤泰介、五木田茶舞、佐藤信吾、小柳広高、川口智義、四宮謙一
2009.5.14-17

第 83 回日本整形外科学会学術総会

シンポジウム

線維性骨異形成症の治療方針
阿江啓介、松本誠一、真鍋淳、川口智義、黒田浩司、下地尚、谷澤泰介、澤村千草、五木田茶舞、小柳広高、佐藤信吾、四宮謙一、大川淳
2010.5.27-30

第 4 回北陸骨軟部腫瘍セミナー

特別講演

骨軟部腫瘍切除縁評価法の妥当性について

阿江啓介
2010.12.18

第24回日本整形外科学会基礎学術集会
一般口演
温熱処理骨と骨髄由来間質細胞導入 TCP
を用いた大型犬の骨欠損モデルにおける骨
再生
小柳広高、阿江啓介、早乙女進一、四宮謙一、
大川淳
2009.11.5-6

第25回日本整形外科学会基礎学術集会
一般口演
温熱処理骨と骨髄由来間質細胞導入 TCP
を用いた大型犬の骨欠損モデルにおける骨
再生
小柳広高、阿江啓介、早乙女進一、四宮謙一、
大川淳
2010.10.14-15

〔図書〕(計0件)
〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿江 啓介 (Ae Keisuke)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：20376726

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

四宮 謙一 (Shinomiya Ken-ichi)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：20111594

麻生 義則 (Asou Yoshinori)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：1260261923

竹田 秀 (Takeda Shu)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：30376727