

機関番号：32713

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591792

研究課題名（和文）軟骨石灰化不全ラットを用いた軟骨石灰化機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of cartilage calcification using the spontaneously cartilage calcification insufficient rat

研究代表者

田中 政巳（TANAKA MASAMI）

聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：00171801

研究成果の概要（和文）：SD系ラット由来の自然発症軟骨石灰化不全ラット（CCIラット）は、四肢短縮と低体長を伴う発育不全を示す。CCIラットの骨は低形成ではあるものの形成された骨自体は正常であり、骨の低形成は軟骨内骨化において成長軟骨の石灰化遅延が生じていることが示された。CCIラットの成長軟骨ではFGF18の発現亢進によって軟骨の石灰化が抑制されていることが示唆された。今後さらにCCIラットにおける軟骨石灰化不全の機序を明らかにし、骨形成メカニズムの解明や骨疾患薬物治療への応用へ発展させたい。

研究成果の概要（英文）：Rats with spontaneous cartilage calcification insufficiency (CCI rat, mutant of the Sprague-Dawley strain) develop dwarfism accompanied by the shortness of all 4 limbs and the overall body length. CCI rats are characterized by systemic ossification deficiency of cartilage, and it was revealed that deficient endochondral ossification is present. The growth cartilage calcification was considered to be delayed in CCI rats. In the growth plate of the CCI rats, the expression level of FGF18 mRNA was markedly high, and resulting inhibits cartilage calcification. In the future, we intend to clarify the mechanism of cartilage calcification insufficiency in CCI rats, and use this animal to elucidate the mechanism of cartilage calcification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：軟骨、骨、軟骨代謝、骨代謝、石灰化、小人症、モデル動物、ラット

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者所属研究機関の研究施設で系統維持してきたSprague-Dawley系ラット由

来のコロニーにおいて四肢短縮、短尾、低体長等の骨格異常を伴う発育不全（四肢短縮型小人症）を発現する個体（発育不全ラット）

が出現した。本発育不全ラットは出現頻度から遺伝的変異によるものと思われたので、コロニーから発育不全形質を有する個体を選別して本発育不全ラットの繁殖・育成と特徴の解析を開始した。体重は12週齢で正常ラットの36% (雄) であった。エックス線とHE染色組織標本の解析から本発育不全ラットは全身の成長軟骨の石灰化不全を第一の特徴とすることが明らかとなっており、本発育不全ラットを自然発症軟骨石灰化不全ラット (cartilage calcification Insufficient rat, CCI ラット) と名付けた。また戻し交配の成績から発育不全形質は常染色体劣性遺伝であることを明らかになっていた。血漿中のカルシウム, 無機リン, ビタミンD ( $1\alpha, 25(OH)_2$ , ビタミンD) には異常のないことが認められていた。

## 2. 研究の目的

CCI ラットは形態学的には四肢短縮型小人症の代表的疾患である骨系統疾患国際分類2001における軟骨無形成症グループに類似すると考えられる。軟骨無形成症の原因は繊維芽細胞増殖因子受容体3 (FGFR3) の遺伝子変異により FGF 作用が増強されることによって発症することが明らかになっており、変異させた FGFR3 遺伝子を導入したマウスが軟骨無形成症モデル動物として利用されている。自然発症の小人症モデル動物には DW/J マウス, Spontaneous dwarf rat (SDR), KMI ラットが知られている。DW/J マウスと SDR は成長ホルモンの欠乏によるもので四肢短縮型小人症を呈さない。KMI ラットは四肢短縮型小人症を呈し、原因は cyclic GMP-dependent protein kinase II (cGKII) の遺伝子変異であることが明らかとなっている。しかし CCI ラットは KMI ラットに比べ体重の減少と四肢短縮の程度が著しく、これら既存の自然発症小人症モデル動物とは異なる新しい小人症モデル動物と考えられる。本研究では CCI ラットの疾患モデル動物としての可能性を明らかにするために、形態学的, 組織学的, 生化学的特徴を詳細に調べ、既存の小人症モデル動物との類似点と相違点および特徴を明らかにすることによって CCI ラットの病態を解明することを目的とした。さらに CCI ラットを利用して軟骨石灰化機構の解明を進めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 繁殖・系統維持

本発育不全形質を発現する個体 (ホモ個体) が不妊のためヘテロ個体を後代検定により確認し、得られたヘテロ個体を雌雄1対1で交配し繁殖に用いた。産まれた仔は以下の条件で判別し、本研究での発育不全形質の解析と繁殖・系統維持に用いた。

①10日齢における尾長の比較によって尾長の短い個体をホモ個体と判別した。

②産仔中に本発育不全形質を発現する個体 (ホモ個体) を有する場合はその親をヘテロ個体と判別し次世代の親とした。(後代検定)。

③産仔8匹以上かつ本発育不全形質を発現する個体を有しない場合は正常ホモ個体と判別した。

### (2) コンジェニック化

本発育不全に関わる遺伝形質のみを発現する動物を得ることは本発育不全の解析に有用かつ必須と考え、近交系動物としてF344系ラット 雌 (野生型) と本発育不全形質をヘテロで有するヘテロ個体を交配し仔 ( $F_1$ ) を得た。以降毎世代をF344系ラット (野生型) に戻し交配をおこなって本発育不全形質のコンジェニック化おこなった。

### (3) 形態学的・組織学的解析

すでに主要な部位について軟X線像およびヘマトキシリンエオシン染色による組織標本による解析を進め本発育不全の特徴は全身の成長軟骨の石灰化不全であることを明らかにしていたので、さらに形態学的解析を進め、CCIラットの病態を調べた。

①全身骨標本に対してアリザリンレッドとアルシアンブルーの2重染色をおこない全身骨の軟骨と石灰化骨の状態を調べた。

②骨の非脱灰標本に対してサフラニン - O 染色とトルイジンブルー染色をおこない軟骨の活性度や軟骨基質の残存を調べて軟骨の異常の状態を検討した。

③カルセインとテトラサイクリンを投与したラットの骨の非脱灰標本作製してこれらの取り込み(動的パラメータ)を調べて、骨形成, 骨代謝回転の状態を検討した。

④骨の脱灰標本に対して軟骨形成因子, 骨形成因子の免疫組織化学染色をおこない、これら諸因子の発現部位と発現の変化の変化を調べた。

#### (4) 遺伝学的解析

##### ① 遺伝子発現の解析

本発育不全動物の軟骨における遺伝子発現を検討した。大腿骨あるいは脛骨の成長軟骨（成長板）RNA を調整し逆転写後リアルタイム PCR 法により軟骨、骨関連因子の遺伝子発現の変化を定量的に調べた。

##### ② 遺伝子変異の解析

まず以下の四肢短縮や発育不全との関連が知られている遺伝子の変異について解析する。ヒトの四肢短縮型小人症の代表的疾患の軟骨無形成症の原因遺伝子である繊維芽細胞増殖因子受容体 3 (FGFR3) の遺伝子についてシーケンスをおこない本発育不全ラットでも同様な変異があるかを確認した。

#### 4. 研究成果

CCI ラット雌雄、もしくは雌雄どちらか一方が CCI ラットの交配では仔を得ることはできなかった。従って CCI ラットは不妊であることが示された。不妊の原因は現在明らかでない。

CCI 形質ヘテロラット雌雄と F344 系ラット雌雄との交配では、仔はすべて小人症を呈することはなく外観は正常であった。CCI を発症するコロニーにおける交配で、発育不全仔を有する産次における発症率は 26.2%であり、また CCI は雌雄ともに発現した。これらのことから CCI の形質は常染色体劣勢遺伝であると考えられた。

さらに F344 系ラットへのコンジュニック化第 1 世代の後代検定において CCI 仔が得られたことから、CCI の形質は単一遺伝子の変異による遺伝であると考えられた。

CCI ラットは四肢短縮、短尾、低体長等の骨格異常を伴う小人症を発現した。CCI は早いものは 3 日齢で判別可能で、おそらく CCI 形質の発現は胎児期に始まっていると考えられる。体重増加曲線からも CCI ラットが著しく発育不全であることが示された。また体重の標準偏差が比較的大きいことから示されるように CCI ラット体重には大きな個体差があり、すなわち CCI ラットの発育不全の重症度には大きな個体差があると考えられた。CCI ラットは発育不全の重症度が高く、四肢短縮型小人症の病態や病因の解明、また骨格形成に関わる骨や軟骨代謝の研究に有用な

実験動物となり得る要因の一つであると考えられる。

軟エックス線像から、CCI ラットでは椎骨、四肢の長骨、胸骨、寛骨、肋硬骨などの軟骨内骨化により成長する骨の短縮、低形成がみられたことから、軟骨内骨化に異常があると考えられる。これらの骨では軟エックス線像において骨の石灰化の不全が認められ、さらに HE 染色像やサフラニン O 染色像からも軟骨内骨化により成長する骨における石灰化不全が認められた。これらのことから、CCI ラットの一義的な特徴は全身軟骨の石灰化不全であると考えられた。一方、CCI ラットにおいて、膜性骨化によって形成される鎖骨や頭頂骨には明らかな変化は認められなかったことから、CCI ラットでは膜性骨化は正常であると考えられた。このように CCI ラットにおいては全身軟骨の石灰化不全が認められるが、一方、石灰化が完了した部分、すなわち骨の部分は正常と認められた。CCI ラットでは長骨や椎体で本来骨となるべき部分において石灰化されずに軟骨のみの部分と石灰化が始まっている部分とを認めた。軟骨のみの部分では TRAP 陽性細胞を認めなかったが、石灰化がおこなわれている部分では TRAP 陽性細胞を多数認めた。このことから CCI ラットでは骨の吸収は正常であると推定される。さらに大腿骨の骨幹部におけるカルセインの標識像は、CCI ラットにおいてやや雑然としているものの正常ラットとおおきな違いはみられなかった。このことは CCI ラットでは骨芽細胞によってできた類骨への石灰沈着は正常である、すなわち骨の代謝回転は正常であると考えられる。

ヒトにおける代表的な四肢短縮型小人症として軟骨無形成症、軟骨低形成症、致死性骨異形成症があるが、これら四肢短縮型小人症の原因として FGFR3 の遺伝子変異による恒常的活性化が知られている。動物においても活性化型 FGFR3 を軟骨に発現させたトランスジェニックマウスでは軟骨無形成症と同様四肢短縮型小人症を呈し、成長板軟骨の増殖・分化・骨化に異常がみられる。しかし、CCI ラットの FGF 受容体 3 (FGFR3) のアミノ酸翻訳部分の遺伝子配列に変異はなかった。

血清 Ca と P 濃度は CCI ラットと正常ラットの間に明らかな差はなかった。石灰化は骨の有機基質リン酸カルシウムが沈着する

ことにより生じるが、血清カルシウムやリンの欠乏は石灰化不全を生じる。血清 Ca と P 濃度は CCI ラットと正常ラットの間に明らかな差はなかったことから、CCI ラットの病因は血清 Ca や P の欠乏ではなく、またおそらく血清ビタミン D の欠乏や副甲状腺の機能障害でもないと考えられる。

CCI ラット成長板における FGF18 mRNA の発現は正常ラットに比べ著しく高値であり、一方、骨型アルカリフォスファターゼ (BALP) mRNA の発現は著しく低値であった。

骨・軟骨には様々な FGF, FGFR が発現しており、FGF シグナルは骨・軟骨形成において重要な役割を果たしている。また、軟骨形成において FGF18 が FGFR3 の内因性リガンドとして機能し軟骨形成を負に調節していると考えられている。軟骨内骨化の過程では、種々のホルモンやサイトカインが軟骨の増殖・分化・石灰化に影響を及ぼしている。本研究の結果から、CCI ラットの軟骨内骨化の異常の少なくとも一因には、成長板での FGF18 の発現亢進により石灰化因子である BALP の発現が抑制されて、石灰化不全が生じている可能性が推定される。また形成された骨自体には大きな異常は観察されないことから、CCI ラットの軟骨内骨化における石灰化不全は軟骨の石灰化の遅延によるものと推定される。おそらく CCI ラットでは石灰化の遅延が著しいために骨化されない軟骨細胞が蓄積し、これが成長板の肥厚の一因となっていることが推定される。

今後さらに CCI ラットの特性を詳細に検討するとともに原因遺伝子を明らかにして、CCI ラットの疾患モデル動物としての可能性を検討していきたい。また骨・軟骨代謝や骨・軟骨形成メカニズム解明への CCI ラットの利用を検討していきたい。

## 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 1 件)

① Izuru Yokomi、Masami Tanaka、Shinichi Kobayashi、Toyomi Takahashi、Katsuko Sudo、Hitoshi Satoh、Trisomy of rat chromosome 1 in haematopoietic cell lineages may cause an early-onset of paraplegia、

Bull. Nippon Vet. Life Sci. Univ.、査読有、59、2010、51-57

[学会発表] (計 7 件)

- ① Tanaka M、Yokomi I、Watanabe M、Sudo K、Sato H、Igarashi T、Seki A、Kobayashi S、Analysis of gene expression in the spontaneously cartilage calcification insufficient (CCI) rat、16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology、2010 年 7 月 20 日、Bella Center (コペンハーゲン市)
- ② 天野 均、井上利志子、田中政巳、小林真一、山田 庄司、CCI ラットにおける頭蓋顔面異常に関する研究、第 30 回日本骨形態計測学会、2010 年 5 月 14 日、米子コンベンションセンター (鳥取県)
- ③ 田中政巳、横見出、渡辺実、須藤カツ子、佐藤均、五十嵐恒雄、関あずさ、小林真一、自然発症軟骨石灰化不全ラット (CCI ラット) における骨化異常と遺伝子発現の解析、57 回日本実験動物学会総会、2010 年 5 月 12 日、京都テルサ (京都府)
- ④ 田中政巳、横見出、渡辺実、須藤カツ子、佐藤均、五十嵐恒雄、関あずさ、小林真一、自然発症軟骨石灰化不全ラット (CCI ラット) における骨化異常の解析、第 84 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 17 日、大阪国際会議場 (大阪府)
- ⑤ 横見出、田中政巳、佐藤均、後肢麻痺 CCI ラットの骨髄に見出された染色体異常、染色体学会第 60 回年会、2009 年 11 月 14 日、くにびきメッセ (島根県)
- ⑥ 田中政巳、横見出、渡辺実、須藤カツ子、佐藤均、五十嵐恒雄、関あずさ、小林真一、自然発症石灰化不全ラット (CCI ラット) の骨化異常と遺伝子発現、第 83 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 17 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑦ 田中政巳、横見出、渡辺実、須藤カツ子、佐藤均、五十嵐恒雄、関あずさ、小林真一、自然発症軟骨石灰化不全ラット (CCI ラット) 軟骨における遺伝子発現、第 55 回日本実験動物学会総会、2008 年 5 月 15 日、仙台国際センター (宮城県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 政巳 (TANAKA MASAMI)  
聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究科  
（研究院）・准教授  
研究者番号：00171801

(2) 研究分担者

渡辺 実 (WATANABE MINORU)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10191800

(3) 連携研究者

なし