

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号： 1 3 6 0 1

研究種目： 奨励研究

研究期間： 2022 ~ 2022

課題番号： 2 2 H 0 4 3 5 0

研究課題名 Chst14欠損マウスの骨表現型に関わる遺伝子の解明と患者検体での検証

研究代表者

高橋 有希 (TAKAHASHI, Yuki)

信州大学・医学部・研究支援推進員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000 円

研究成果の概要：本研究では、筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群（mcEDS）の疾患モデルマウスを用いて、骨密度や骨強度の低下に影響すると考えられる遺伝子の発現解析を行った。その結果、12、52週齢マウスの大腿骨由来RNAから合成したcDNAを用いた定量PCR解析にて、型コラーゲン（Col1a1）と骨形成因子（Bglap）の加齢に伴う有意な低下、骨吸収因子（Acp5）の加齢に伴う有意な増加、破骨細胞成熟因子（Rank）の52週齢での有意な増加が認められた。以上の結果から、疾患モデルマウスでは加齢に伴い破骨細胞形成が促進されて骨吸収が亢進し、それにより骨病態が進行することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群（mcEDS）患者同様の進行性の脊椎後彎等の骨病変を有する疾患モデルマウスにおける大腿骨の遺伝子発現解析にて、加齢に伴う骨形成因子の低下と骨吸収因子の増加、さらに52週齢での破骨細胞成熟因子の増加が認められたことから、骨吸収が亢進することが骨病態の進行に関与する可能性が示唆された。

本研究成果は、進行性の運動機能障害によるQOL低下につながる骨病変で苦しむ患者を有するmcEDSの病態解明の重要なポイントであり、将来的に治療法開発への応用が期待できると考えられる。

研究分野： 実験動物学（疾患モデル動物）

キーワード： 筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群 Chst14 KOマウス 骨病変 骨代謝 コラーゲン 遺伝子発現

1. 研究の目的

筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群 (mcEDS) は、当教室で発見された疾患で、結合組織の脆弱性による骨・関節病変が認められる¹⁾。特に、進行性の脊椎変形による運動機能障害は、QOL低下の最大の原因である。現在の治療法は、変形した脊椎に対する後方矯正固定術等の外科的方法であり、発症機序や病態の進行を抑える方法は明らかでない²⁾。mcEDS では、*CHST14* の病的変異による硫酸基転移酵素 D4ST1 の活性消失を原因として、全身性のデルマタン硫酸 (DS) 欠乏が生じ、コラーゲン細線維の会合不全が認められる³⁾。また、疾患モデル動物として *Chst14* 欠損マウス (*Chst14*^{-/-}) を用いた解析が進められており、これまでに皮膚において、コラーゲン細線維の会合不全や皮膚脆弱性等、患者類似の表現型が報告されている⁴⁾。一方で、骨・関節病変に関する疾患モデル動物の報告はない。

申請者は、*Chst14*^{-/-} で骨・関節病変の解析に取り組み、 μ CT 撮影と 3 点曲げ試験で大腿骨の骨密度と骨強度の低下や、8 週齢～1 歳齢の経時観察で進行性の脊椎変形など、患者類似の表現型を発見したところである。

そこで本研究は *Chst14*^{-/-} および患者の骨において、骨強度や骨密度に影響する骨関連遺伝子を明らかにすることを目的とした。それにより、mcEDS の骨・関節病変の発症機序の解明や、進行を予防する治療法の開発に貢献することが期待される。

2. 研究成果

本研究では 12 週齢と 52 週齢の野生型と *Chst14*^{-/-} の大腿骨から抽出した RNA を逆転写して得られた cDNA を用いて、骨リモデリングや骨の形態や強度の維持に関連する遺伝子について定量 PCR 解析を行った。

解析対象遺伝子を以下に示す。

コラーゲンやその会合に関わる遺伝子
<i>Col1a1, Col12a1, Dcn, Bgn, Chst14, Chst11, Chst12</i>
骨形成を担う骨芽細胞や骨細胞関連遺伝子
<i>Bmp2, Alpl, Runx2, Osx, Bglap, Dmp1, Sost, Spp1, Tgf-β</i>
骨吸収を担う破骨細胞の分化や機能に関する遺伝子
<i>Rank1, Rank, Acp5, Opg, Ctsk</i>

上記遺伝子について定量 PCR 解析を実施した結果、*Chst14*^{-/-} で *Chst14* の遺伝子発現の消失が確認でき、骨の大部分を占める I 型コラーゲン (*Col1a1*) の遺伝子発現については、野生型でも加齢に伴う低下傾向が認められたが、*Chst14*^{-/-} では加齢に伴う有意な低下が認められた。コラーゲンの会合に関わるプロテオグリカンであるデコリン (*Dcn*) や DS を側鎖に持つビグリカン (*Bgn*) の遺伝子発現は同週齢の野生型と比較して差は認められなかった (図 1)。

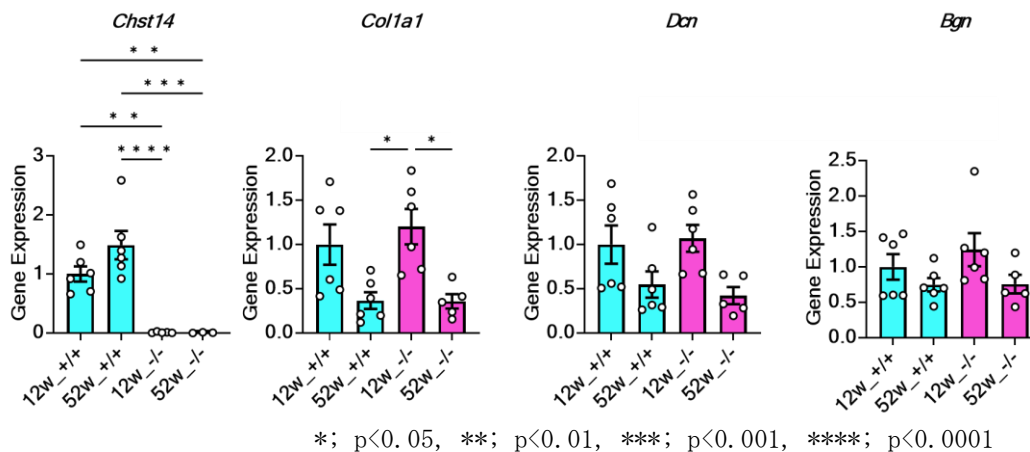


図 1. *Chst14*、I 型コラーゲン、デコリン、ビグリカンの遺伝子発現

また、骨代謝関連因子については、*Chst14*^{-/-} で骨形成因子である *Bglap* が加齢に伴う有意な低下、骨吸収因子である *Acp5* が加齢に伴う有意な増加を示した。さらに、破骨細胞成熟を反映する遺伝子である *Rank* が 52 週齢で野生型と比較し *Chst14*^{-/-} で有意に増加しているとともに、野生型では加齢に伴う増加が認められなかったのに対して、*Chst14*^{-/-} で加齢に伴う有意な増加が認められた (図 2)。

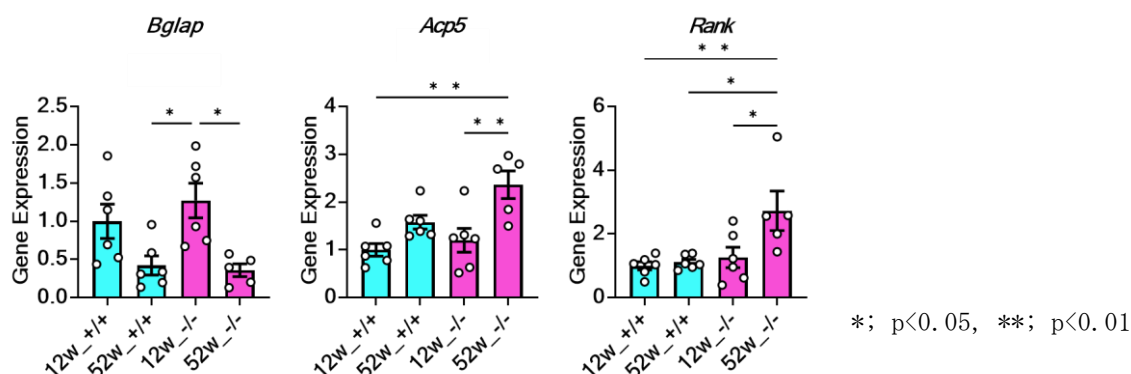


図 2. 骨代謝関連因子の遺伝子発現

その他の遺伝子については、加齢に伴う変動や、同週齢の野生型との差は認められなかった。以上の結果から *Col1a1* では *Chst14*^{-/-} で加齢に伴う有意な低下が認められ、DS が加齢に伴うコラーゲンの維持に関わる可能性が考えられた。さらに、骨代謝関連因子の解析では、*Chst14*^{-/-} では加齢に伴う骨形成因子 (*Bglap*) の有意な低下と骨吸収因子 (*Acp5*) の有意な増加が認められ、且つ、破骨細胞成熟因子 (*Rank*) が中年期で野生型と比較して有意に増加していたことから、加齢に伴い破骨細胞の形成が促進され、骨吸収が亢進することが示唆された。それによって、進行性の脊椎変形のような骨病態の進行が引き起こされると考えられた。

今回、マウスの骨で変動が認められた遺伝子について患者検体での解析を計画していたが、得られた患者検体が若齢患者由来であったことと、同一患者での加齢に伴う遺伝子発現の変動の解析が困難であることから、今後の検討課題とすることにした。

<引用文献>

- 1) CHST14/D4ST1 deficiency: New form of Ehlers-Danlos syndrome. Kosho T. *Pediatr Int*, 58(2):88-99 2016.
- 2) Spinal manifestations in 12 patients with musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by CHST14/D4ST1 deficiency (mcEDS-CHST14). Uehara M, Kosho T, Yamamoto N, Takahashi HE, Shimakura T, Nakayama J, Kato H, Takahashi J. *Am J Med Genet A*, 176(11):2331-2341 2018.
- 3) Structural alteration of glycosaminoglycan side chains and spatial disorganization of collagen networks in the skin of patients with mcEDS-CHST14. Takuya Hirose, Naoki Takahashi, Prasarn Tangkawattana, Jun Minaguchi, Shuji Mizumoto, Shuhei Yamada, Noriko Miyake, Shujiro Hayashi, Atsushi Hatamochi, Jun Nakayama, Tomomi Yamaguchi, Ayana Hashimoto, Yoshihiro Nomura, Kazushige Takehana, Tomoki Kosho, Takafumi Watanabe. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1863(3): 623-631 2019.
- 4) Systematic investigation of the skin in *Chst14*^{-/-} mice: A model for skin fragility in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by *CHST14* variants (mcEDS-CHST14). Takuya Hirose, Shuji Mizumoto, Ayana Hashimoto, Yuki Takahashi, Takahiro Yoshizawa, Yuko Nitahara-Kasahara, Naoki Takahashi, Jun Nakayama, Kazushige Takehana, Takashi Okada, Yoshihiro Nomura, Shuhei Yamada, Tomoki Kosho, Takafumi Watanabe. *Glycobiology*, 31(2): 137-150 2021.

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 高橋有希、吉沢隆浩、水本秀二、上原将志、渡邊敬文、小野史子、嶋田新、山田修平、高橋淳、古庄知己
2. 発表標題 疾患モデルマウスを用いた筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群の包括的骨病変解析
3. 学会等名 第3回日本エーラス・ダンロス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋有希、吉沢隆浩、水本秀二、山田修平、古庄知己
2. 発表標題 筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群(mcEDS)疾患モデルマウスを用いた骨病態解明への取り組み
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
古庄 知己	(KOSHO Tomoki)
吉沢 隆浩	(YOSHIZAWA Takahiro)