

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592789

研究課題名(和文)軟骨石灰化不全ラットの病態と原因遺伝子の解明

研究課題名(英文)Abnormal growth and causative factor in cartilage calcification insufficient rat

研究代表者

永山 元彦(Motohiko, Nagayama)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：50298436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：聖マリアンナ医科大学で確立したSD系列ラット由来の軟骨石灰化不全ラット(Cartilage Calcification Insufficient rat, CCIラット)は全身性軟骨石灰化遅延を示し、軟骨の肥大または増生と、軟骨の吸収不全による骨化の遅れの二面性のある常染色体劣性遺伝形式が考えられる。本研究では頭部頭蓋底のマイクロCT画像による形態的变化が、また採取したcDNAマイクロアレイでインディアンヘッジホッグシグナル関連するGli1遺伝子亢進がreal time PCRとin situ hybridization法で、BrdU取込み軟骨細胞数も多い軟骨増生の亢進が明らかだった。

研究成果の概要(英文)：The cartilage calcification insufficient (CCI) rat derived from Sprague-Dawley (SD) rat, show spontaneous skeletal dwarfism associated with delay of endochondral ossification. In this study, CCI rats after two weeks later of birth showed abnormal synchondrosis including longitudinally wider length of intra-sphenoidal and sphenoid-occipital synchondrosis compared to the normal phenotype of SD wild type rats. Real time PCR and over expression of Smo and Gli1 mRNA expected association with Ihh by in situ hybridization, showed prominent relative increasing of transcription in CCI rats and this was supported by up-regulated BrdU incorporation. The data demonstrate CCI rats affect their endochondral ossification due to excessive Ihh signaling, results in hyper proliferating but feed-back arrest of chondrocyte differentiation in post-natal stage.

研究分野：口腔病理学

キーワード：軟骨内骨化 頭蓋底軟骨結合 下顎頭軟骨 Ihhシグナリング in situ hybridization Gli1

1. 研究開始当初の背景

SD 系列ラットの交配で、軟骨石灰化不全ラット (Cartilage Calcification Insufficient rat, 以下 CCI ラット) が自然発症型の全身性軟骨石灰化遅延を示す (自然発症頻度約 25% の浸透率) ことが聖マリアンナ医科大学で確立された。この形質発現から、原因となる責任遺伝子は単一で、常染色体劣性遺伝形式に表現されている可能性が示唆されている。一方、この形態異常は、形成される骨の石灰化や形態には影響することなく、関節軟骨等軟骨の成長異常から全身性の骨格異常を示すことから、全身性に軟骨の幅が増大し、さらに軟骨内石灰化制御の不全と骨化遅延であることが形態的にわかった (図1)。

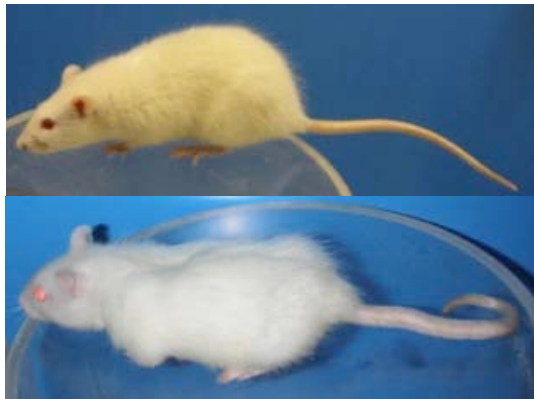


図1 SD ラット (WT、上) と CCI ラット (下) 生後 6 週齢 (雌)

しかし、その発症メカニズムについては責任遺伝子を始め、明らかにされていなかった。同時に現在でも軟骨の分化、成長は未知の分野であると同時に、将来の関節などの再生目的を考えた場合に、軟骨組織とその制御メカニズムの解明は、これからの高齢者社会においても極めて重要になることが予測できる。

2. 研究の目的

CCI ラットでは、全身性の軟骨石灰化不全による骨格異常は四肢を始め、脊椎、頭部の全てで異常がみられるが、頭部は骨の形成を線維芽細胞からの骨芽細胞分化による膜性骨化と、骨の基盤となる部分に軟骨が先に形成されて、破骨細胞による軟骨の吸収過程を踏んで骨化を起こすという内軟骨性骨化があり、齧歯類の頭蓋底軟骨は篩骨、蝶形骨、後頭骨がほぼ水平に並び、その間に軟骨による軟骨結合を介して軟骨内骨化を起こす (図2)。

また、顎関節に存在する下顎頭は、関節頭に一層の軟骨層が形成され、これが関節円板を介して上顎関節結節と関節を形成する軟骨内骨化の一例として捉えることができる。このように頭蓋底軟骨や下顎頭軟骨は、これらの異常や原因遺伝子の様相を形態的に知る上で絶好の組織モデルとなり得ること、また研究代表者はこれまでにインディアンヘッジホッグ分子を中心にこれら軟骨細胞の分化と成熟について研究をしてきた (図3)。そこで、本研究では形成される軟骨の増大が肥大または増生であり、

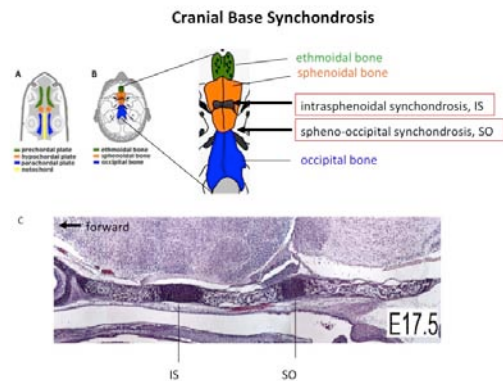


図2 頭蓋底軟骨結合の模式図と組織像

正常な頭蓋底軟骨結合では、頭蓋底を構成する篩骨、蝶形骨、後頭骨の骨間に一層の軟骨層 (軟骨結合) が介在して中顔面の前後方向の成長に影響する。写真はマウス (胎生 17.5 日) の頭蓋底矢状断を示す。

Ihh signaling pathway

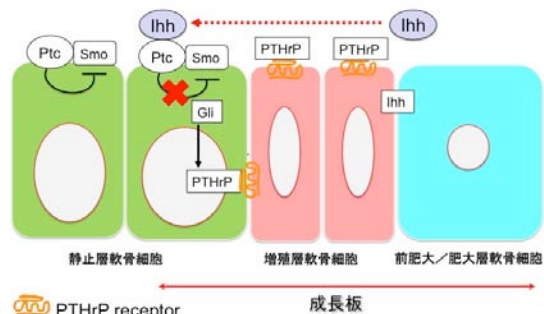


図3 Ihh 分子による軟骨細胞の分化と成熟

成長板軟骨の前肥大軟骨細胞から分泌したインディアンヘッジホッグ (Ihh) は Gli 転写因子を介して PTHrP の産生を促し、増殖の促進と分化の抑制を行うネガティブフィードバック作用によって、骨の成長に合わせた軟骨細胞層の成熟を行う。

腫瘍性の増殖ではないこと、また、軟骨の石灰化不全を起因として破骨細胞の吸収不全による骨化の遅れの二面性から、CCI ラットにおける軟骨石灰化不全の発症メカニズムと原因遺伝子の検索を行うことを目的とし、頭部の頭蓋底軟骨を中心に検索を行い、以下の研究目的を掲げた。

- (1) CCI ラットの原因遺伝子の解明
- (2) CCI ラットの形態学的・分子生物学的検索
- (3) CCI ラットとヒトの発育異常疾患との関連

3. 研究の方法

(1) CCI ラットの原因遺伝子の解明

自然発症型の軟骨石灰化不全を示す CCI ラットの奇形発症は、ホモで形質発現することから、ダブルヘテロの CCI ラットによる常染色体劣性遺伝による形質発現であることが予想された。そこで CCI ラットの繁殖と交配実験から、原因遺伝子の同定と遺伝子の機能解明を以下の手順で行った。

- ① CCI ラット遺伝型と表現型の確認と戻し交配

CCI ラットが劣性遺伝で発現することから、親がヘテロの場合、常染色体に責任遺伝子が存在すると仮定すると、Wild type の近交系 SD ラットと CCI ラットとの F1 世代を作成して、表現型を確認する。つぎに、この F1 ラットと SD ラットによる戻し交配ラット作成、同時に F1 ラットと CCI ラットによる戻し交配ラットを作成して、それぞれの表現型の比が 3:1 か 1:3 を確認する。さらに、F1 同士を交配させた F2 世代を作成して、遺伝型と表現型の比を確認する。

#### ②連鎖解析による遺伝子地図の作成

CCI ラットの原因遺伝子座における原因遺伝子の種類を限定するために連鎖解析を行い、軟骨石灰化異常が単一遺伝子の異常で生じるかを以下の方法で調べる。

F1 ラットに戻し交配させたラット2系と F2 ラットを用いて、Rat genome Database に紹介されている遺伝子位置情報を元に原因遺伝子をマップする。マッピングの方法は、個々のラットの腎臓(耳・尾)から DNA を抽出して、マイクロサテライトマーカーによる PCR を行い、タイピングで連鎖解析や QTL 解析(Quantitative trait loci:量的形質遺伝子座)で遺伝子座が 0.1cM 以内に確定でき、候補遺伝子を決定する。

#### (2) CCI ラットの形態・分子生物学的検索

交配、繁殖中に得られた CCI ラットを胎生中、生後～4ヶ月齢までの各時期における軟骨性成長の様子を同腹の Wild type の SD ラットと形態学的、分子生物学的に比較した。

##### ①マイクロ CT によるエックス線の検索

屠殺後、頭部を4%パラホルムアルデヒドで固定後マイクロ CT 撮影し、頭蓋底や下顎頭の軟骨部を含めて3次元解析ソフトで Bone Mineral Density (BMD)から骨化状態を観察した。これまでに石灰化した骨は正常であるが、下顎頭以上に頭蓋底の軟骨性成長が悪く、軟骨内骨化のみならず、泉門開存など膜性骨化や歯の萌出も遅れ、結果として上顎劣成長による切端咬合や下顎前突を示すことが確認されている。本研究では、さらにどの部位の軟骨内骨化が最も影響を受けるのかを追求した。

##### ②組織学的および分子生物学的検索

頭蓋底軟骨結合部や下顎頭軟骨部のパラフィン切片を作製後、軟骨の各細胞層における mRNA ならびにタンパクの部位特異性を検索した。分子群は軟骨の成長に合わせた細胞層に発現される分子で、軟骨細胞層の静止層: PTHrP, Collagen type IIA; 増殖層: Histon H4C, PTHrP receptor, 前肥大層: Ihh, osterix, 肥大層: type X, osteopontin, MMP 9 and 13, osteocalcin について mRNA の局在を in situ hybridization 法で、また cDNA マイクロアレイによる網羅的分子間関連を検索するために、新鮮な頭蓋底軟骨や膝軟骨を採取して total RNA を cDNA マイクロアレイ解析依頼を行った。一方、軟骨細胞の増殖については BrdU 取り込みによる特異抗体を用いた免疫組織化学的手法でも調べた。

これら軟骨細胞の分化・成長が抑制されていると考えられる CCI ラットでは、未知の原因遺伝

子と絡み、分子間の均衡が崩れていることが予想された。特に、Ihh は産生されると細胞外基質のヘパラン硫酸にトラップされ、その標的細胞に対して作用を発揮するので、これらヘパラン硫酸の検索が重要となる。そこで、主要なヘパラン硫酸であるアグリカンの発現異常も検索の対象とした。

#### ③原因遺伝子レスキューによる形態機能回復

単一遺伝子の欠損が原因として解明された場合、その分子の形質発現タンパク等を胎児の CCI ラット肋軟骨から取り出した軟骨細胞を培養し、これに発現タンパクを加えてその刺激作用に対する応答で産生する分子を real time PCR で検出して、その分子が軟骨の成熟ならびに軟骨性骨化に必須分子を検索した。また、siRNA 法などによるノックダウンのみならず、分化獲得と回復を含めた *in vivo* 実験を考慮した。

#### (3)ヒトの発育異常疾患との関連

CCI ラットの軟骨石灰化不全の原因遺伝子が解明できた場合、ヒトの軟骨内骨化過程における成長発育不全で同様の症状を示す疾患を探る。頭頸部における骨系統疾患で軟骨内骨化の遅延を示す代表的な発育異常には、Crouzon 症候群、Apert 症候群、軟骨無形成症、軟骨低形成症等があるが、いずれも FGF レセプターの異常による軟骨結合や縫合における早期骨化が病態として知られている。そこで、CCI ラットがヒトのいずれの発育異常に相当するのかを分子生物学的な背景に基づく結果から原因遺伝子が明らかになれば、これらの gain of function や loss of function から、さらにヒトの発育異常への適応と治療を含めたビジョンで研究が展開できると考えた。

## 4. 研究成果

### (1) CCI ラットの原因遺伝子の解明

Cross mating between CCI carrier rat and F344 rat  
PCR using chromosome microsatellite primers

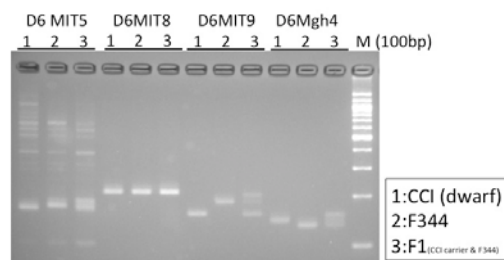


図4 マイクロサテライトマーカーによる多形性解析

F1 交配による CCI ラットにおける多形性の解析  
CCI:CCI rat; F344: Fischer rat

マイクロサテライトプライマーを用いて CCI ラットと SD 系列とは異なる Fischer 系統ラットとの F1 の軟骨による PCR で多形性を調べたところ、いくつかのサテライトマーカーで多形性が存在することがわかり、これらの付近に原因遺伝子の存在があることが示唆された。しかし、ばらつ



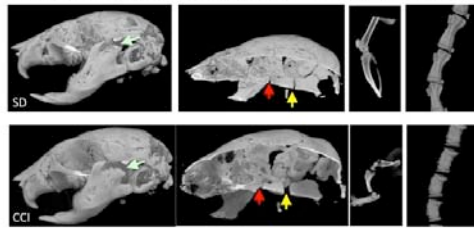
きも多く、また現在進行中のため、遺伝子地図作成にまでは至らなかった(図4)。

(2) CCI ラットの形態・分子生物学的検索

① マイクロ CT によるエックス線の検索

固定後マイクロ CT 撮影した頭部では、頭蓋底や下顎頭の軟骨部で SD ラットに比べて CCI ラットでは顕著な形態差を認めた。下顎頭では、軟骨の増大による下顎頭の扁平化、頭蓋底軟骨結合部では、いずれの軟骨結合においても軟骨幅の増大を認めた。加えて、後肢の関節には偽関節が生じ、脊椎の湾曲も強かった(図5)。

Phenotypical Dwarfism Accompanied by Skeletal Abnormality (μCT)



IS: intrasphenoidal synchondrosis  
SO: spheno-occipital synchondrosis  
CCI: cartilage calcification insufficient

2 weeks

図5 マイクロ CT による SD ラットと CCI ラットの骨格比較

生後2週で比較した場合、SD ラットに比べて、CCI ラットでは、下顎頭の扁平化、頭蓋底軟骨の幅の増大、後肢の偽関節、脊椎湾曲が顕著になる。左から順に下顎頭、頭蓋底軟骨、後肢、脊椎を示す。青矢印は下顎頭軟骨を、赤矢印は蝶形骨内軟骨結合を、黄矢印は蝶形後頭軟骨結合をそれぞれ示す。

次に骨の石灰化の状態を調べるため3次元解析 Bone Mineral Density (BMD)から骨化状態を観察したところ、S ラットと CCI ラットで骨の石灰化には差がないことが明らかとなった(図6)。

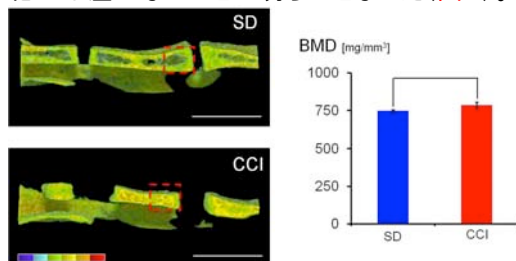


図6 BMD 解析による SD ラットと CCI ラットの石灰化密度比較

頭蓋底軟骨結合が介在するそれぞれの骨における BMD を比較したところ、SD ラットと CCI ラットの両者には差がなかった。

② 組織学的および分子生物学的検索

頭蓋底軟骨を生後2週齢の雌ラットで比較したところ、CCI ラットでは軟骨層の幅が増えている、軟骨細胞の配列の乱れを確認した(図7)。

Histopathological Findings of Cranial Base Synchondrosis

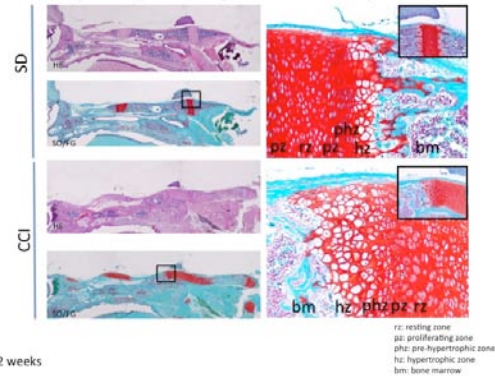


図7 頭蓋底軟骨結合の組織像

また、軟骨から採取した cDNA マイクロアレイでインディアンヘッジホッグシグナル関連する Gli1 と Smo 遺伝子の亢進が real time PCR と in situ hybridization 法のいずれとも一致した(図8、9)。

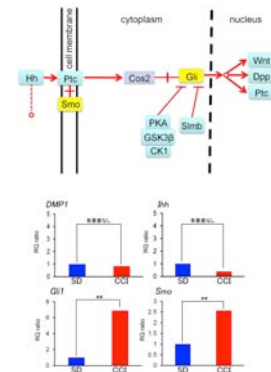


図8、9 マイクロアレイ解析(上)と realtime PCR による Ihh 関連分子の異常発現(下)

cDNA マイクロアレイと real time PCR により、Gli1 と Smo 遺伝子の強発現がみられ、これらは ISH 検索でも同様であった(図なし)

これらの結果、軟骨細胞の増殖が亢進して、分化が抑制されている結果、軟骨幅の増大することが明らかとなり、これを証明すべく、BrdU 取り込み軟骨細胞数も多い軟骨増生の亢進がみられた(図10)。

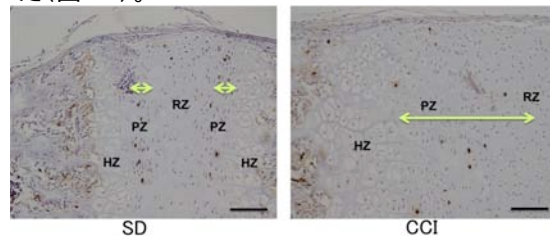


図10 BrdU 免疫染色(頭蓋底軟骨結合)

以上の結果を踏まえて、今後は下顎頭軟骨についても形態学的検索を行うとともに、原因遺伝子の追求を行う予定である。

③ 原因遺伝子レスキューによる形態機能回復 現在進行中である。

(3) ヒトの発育異常疾患との関連

現在進行中である。

<引用文献>

M. Nagayama et.al. Wnt-beta catenin signaling regulates cranial base development and growth, J Dent Res, 2008, 87: 244-249

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 Tanaka M, Watanabe M, Yokomi I, Matsumoto N, Sudo K, Satoh H, Igarashi T, Seki A, Amano H, Ohura K, Ryu K, Shibata S, Nagayama M, Tanuma J. Establishment of a novel dwarf rat strain: cartilage calcification insufficient (CCI) rats. Exp Anim. 査読有, 2015, 64:121-8. DOI: 10.1538/expanim.14-0072

[学会発表] (計6件)

- ① M.Nagayama et al. Abnormal Chondrocyte Differentiation in Post-natal Cartilage Calcification Insufficient Rat. 93rd General Session & Exhibition of the IADR/44th Annual Meeting of the AADR/39th Annual Meeting of the CADR, 2015/03/13, Boston (US)
- ② 竹内 綾他. 軟骨石灰化不全ラット(CCIラット)における頭蓋底軟骨結合と顎関節頭軟骨の変化. 第73回日本矯正歯科学会, 2014/10/20-22, 幕張メッセ(千葉県幕張)
- ③ A. Takeuchi et al. Abnormal cranial base synchondrosis development and growth in cartilage calcification in sufficient rat. 17th IAOP International Congress on Oral Pathology and Medicine, 2014/05/25-30, Istanbul (Turkey)
- ④ M. Nagayama et al. Morphological Study of Cranial Base Synchondrosis in Cartilage Calcification Insufficient rat. 第24回日本臨床口腔病理学会, 2013/08/28-30, 日本大学理工学部1号館 CSTホール(東京)
- ⑤ 竹内 綾他. 軟骨石灰化不全ラット(CCIラット)における頭蓋底軟骨結合の変化. 第103回日本病理学会総会. 2014/04/24-26, 広島国際会議場(広島)
- ⑥ 竹内 綾他. 軟骨石灰化不全ラット(CCIラット)における頭蓋底軟骨結合の形態学的解析. 第55回歯科基礎医学会, 2013/09/20-22, 岡山コンベンションセンター(岡山)

[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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等  
<http://scw.asahi-u.ac.jp/~patho/staff/index.html#staff02>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永山 元彦 (NAGAYAMA, Motohiko)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号: 50298436

(2) 研究分担者

田沼 順一 (TANUMA, Jun-ichi)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号: 20305139

(3) 研究分担者

渡辺 実 (WATANABE, Minoru)  
聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師  
研究者番号: 10191800

(4) 研究分担者

田中 政巳 (TANAKA, Masami)  
会津大学短期大学部・食物栄養学科・教授  
研究者番号: 00171801

(5) 連携研究者

天野 均 (AMANO, Hitoshi)  
大阪歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 90212571