

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462326

研究課題名(和文) 遺伝性多発外骨腫症モデルマウスを用いた骨軟骨腫発生に関するヘパラン硫酸の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of Osteochondroma Formation Using Prx1Cre ERT; Ext1flox/flox mice

研究代表者

伊藤 芳毅 (Ito, Yoshiki)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：10313884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多発性外骨腫症(MHE)は、骨幹端部の多発骨軟骨腫を特徴とする遺伝性疾患で、EXT1・2が主要原因遺伝子である。本研究の目的は、Prx1CreERT; Ext1flox/floxマウス(Creマウス)を用い骨軟骨腫発生機構について検討する事である。本研究では、MHEで骨軟骨腫が好発する成長軟骨板周囲の軟骨膜組織に注目した。Prx1CreERT transgeneに注目した。同Creマウスに対し、出生後にtamoxifenを注射した後、四肢関節形態を観察すると、軟骨膜からEXT1が欠損する事で、四肢に骨軟骨腫を形成されることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Multiple hereditary exostosis (MHE) is autosomal dominant disorder characterized by multiple osteochondroma formation and deformities of extremities due to osteochondroma formation. To determine the function of heparin sulfate in the perichondrium, we have generated Prx1-CreER; Ext1flox/flox mice (Cre mice) by breeding the Prx1-CreER transgenic mice with the Ext1flox/flox mice. EXT1 expression was deleted in the perichondrium due to tamoxifen injection after birth, and Cre mice exhibited the osteochondroma formation in the extremities.

研究分野：骨関節疾患

キーワード：多発性外骨腫症

1. 研究開始当初の背景

遺伝性多発性外骨腫(Multiple Hereditary exostosis: MHE)は、長管骨骨幹端部に発生する多発性骨軟骨腫を特徴とする常染色体優性の遺伝性疾患で、硫酸合成酵素である Exostosin 1、2(EXT1,2)が MHE の原因遺伝子として同定されている。MHE と EXT1、EXT2 の関連については、*in vivo* study で、Ext2 のヘテロノックアウトマウスが肋骨に骨軟骨腫を形成することが Stickens ら(文献1)によって報告され、また Matsumoto ら(文献2)は、軟骨細胞特異的 Ext1 ノックアウトマウスが、多発性骨軟骨腫の形成といった MHE の表現型を呈し、MHE の発生には Ext1 の loss of heterozygosity (LOH)が必要である事を示した。しかし、Ext1 欠損が四肢長幹骨に骨軟骨腫を発生させる機構については未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、MHE で骨軟骨腫が好発する成長軟骨板周囲の軟骨膜組織に注目した。同部位での Ext1 の機能を解析するため、Prx1CreERT transgene に注目した。Prx1CreERT;Rosa26 reporter マウスを作成し、生後1・2日に tamoxifen を腹腔内注射し、LacZ 染色を行った。ところ Prx1CreERT transgene が出生後マウスの成長軟骨板周囲軟骨膜に発現している事を確認した。本研究の目的は、Prx1CreERT; Ext1flox/flox マウス(Cre マウス)を作成し、生後1・2日に tamoxifen を腹腔内注射することで軟骨膜組織から Ext1 を欠損させ同組織でのヘパラン硫酸の機能を解析し、骨軟骨腫形成について検討することである。

3. 研究の方法

本研究では、MHE で骨軟骨腫が好発する成長軟骨板周囲の軟骨膜組織に注目した。同部位での Ext1 の機能を解析するため、Prx1CreERT transgene に注目した。Prx1CreERT;Rosa26 reporter マウスを作成、生後1・2日に tamoxifen を腹腔内注射し、LacZ 染色を行った。次に Cre マウ

スに対し、生後1・2日に tamoxifen を注射した後、四肢関節形態を Safranin O/Fastgreen 染色、X-ray 撮影で検討した。更に Sox9、catenin の免疫組織染色を用いて、軟骨膜での同蛋白発現について確認した。In vitro で、マウス間葉系細胞の C3H10T1/2 に対し、Ext1 発現を抑制後、catenin の発現を qPCR と蛍光免疫染色にて確認後、骨分化について Alp 活性を測定した。

4. 研究成果

1) LacZ 染色で、Prx1CreERT transgene が成長軟骨板周囲軟骨膜に発現している事を確認した(図1)。

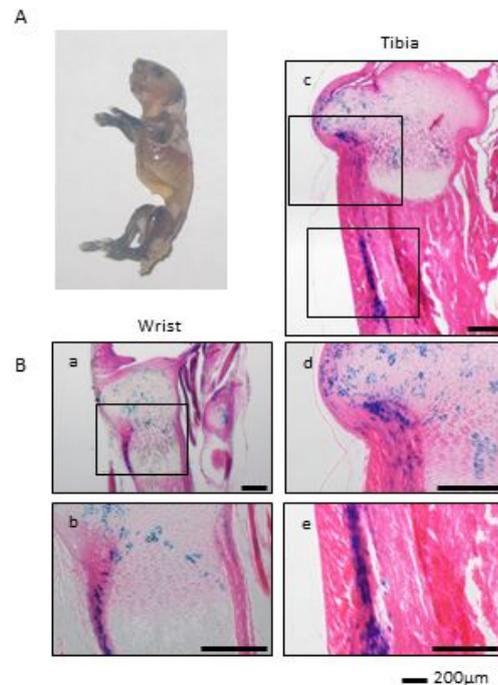


図1

2) Cre マウスは、生後 tamoxifen を注射することにより生後3週で四肢短縮をみとめた(図2)。また、whole mount preparation と Safranin O/Fastgreen 染色で手関節に骨軟骨腫を形成することを確認した(図3)。

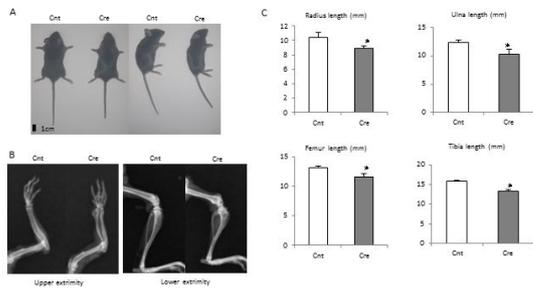


図 2

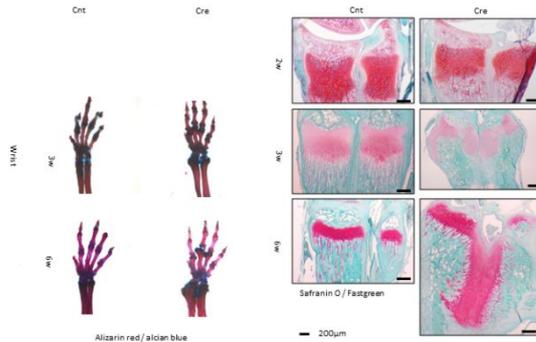


図 3

(3) 免疫組織染色によって同マウスは骨軟骨腫形成前に、軟骨膜で catenin の発現が低下し、同部位に異所性軟骨細胞が出現していることを確認した(図 4)。

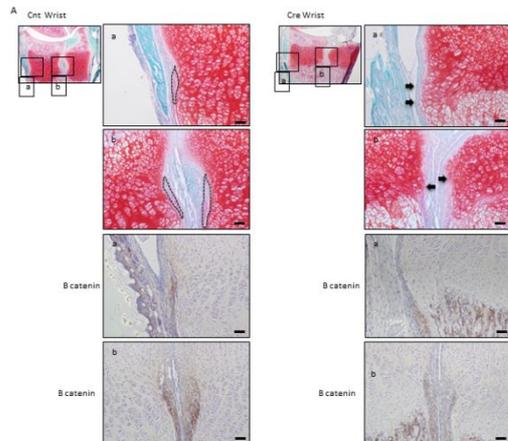


図 4

(4) In vitro で、C3H10T1/2 は Ext1 発現を抑制する事で、catenin の発現が低下し、骨分化が抑制される事を確認した(図 5)。

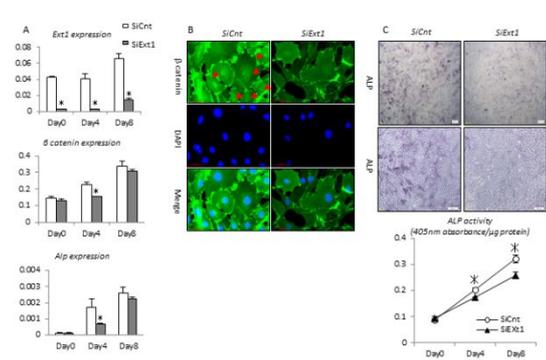


図 5

考察及び結論

Cre マウスを用い、出生後に成長軟骨板周囲の軟骨膜から Ext1 を欠損させる事で、骨軟骨腫形成が誘導された。同所見は、MHE での骨軟骨腫形成において、軟骨膜組織が重要であることを示唆する。成長軟骨板周囲の軟骨膜には、皮質骨に分化する骨軟骨前駆細胞が集簇しており、Ext1 が Wnt canonical signal を介して同細胞の骨分化を抑制する事で、骨軟骨腫形成に寄与していることが示唆される。

文献

- Stickens D, et al. Mice deficient in Ext2 lack heparan sulfate and develop exostoses. Development. 2005 Nov;132(22):5055-68.
- Matsumoto K, et al. A mouse model of chondrocyte-specific somatic mutation reveals a role for Ext1 loss of heterozygosity in multiple hereditary exostoses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

石丸大地, 秋山治彦, 松本和

Prx1CreERT; Ext1flox/flox マウスを用いた多発性外骨腫症発生機構の解明.

第 30 回日本整形外科基礎学術集会
2015/10/22-10/23, 富山国際会議場, 富山県富山市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 芳毅(Yoshiki Ito)

岐阜大学 医学系研究科 非常勤講師

研究者番号 10313884

(2)研究分担者

松本 和(Kazu Matsumoto)

岐阜大学 医学系研究科 准教授

研究者番号 40422711