

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 10 年度博士課程進学

氏 名 中道 裕子

指導教官名 加藤 茂明

論文題目

軟骨由来細胞機能調節因子の生体内高次機能に関する研究

1. はじめに

骨は、体重を支え運動器官としての役割を持つと共に、造血器官としての役割をも持つ。同時に、骨はミネラルの貯蔵の場であり、血中カルシウム濃度の厳密な維持に重要な役割を果たしている。骨の外側は緻密な皮質骨で覆われるが、内腔は粗な海面骨と骨髄とから成る。皮質骨／海面骨は、骨形成を司る骨芽細胞・骨吸収を司る破骨細胞と、これらの細胞が分泌する骨基質タンパクおよび沈着したミネラルで構成されている。一方、骨髄は多分化能を有する未分化間葉系細胞と造血系幹細胞が存在し、未分化間葉系細胞は骨細胞種のみならず軟骨細胞・筋芽細胞・脂肪細胞・胸腺ストローマ細胞に分化することが知られている。従って、正常な骨組織の構築や骨代謝の制御には、この骨髄未分化間葉系細胞からの精巧な分化プログラムの制御による骨細胞種への分化が非常に重要であるといえる。

骨形成は単純に骨芽細胞により形成されるのはまれで、大部分が内軟骨性骨化を経て形成される。内軟骨性骨化はまず中胚葉由来未分化間葉系細胞が凝集して軟骨細胞に分化し、ついで軟骨細胞が増殖することで軟骨組織が作られる。次に軟骨の中央部の細胞が肥大化し石灰化すると血管侵入を受ける。これと同時に未分化間葉系細胞細胞が侵入し、軟骨が浸食されながら骨髄腔の形成とともに骨が形成される。内軟骨性骨化の過程は、長官骨の中央部から始まるので、骨端部分は成長期を過ぎる頃まで軟骨が維持される。最終的に軟骨がすべて骨に置換された段階で骨の成長は止まるので、軟骨成長が骨長ひいては成長を

規定すると考えられている。

軟骨は、他の組織とは異なるユニークな特徴を持ち、原則として血管、神経あるいはリンパ管が存在しない。また、軟骨細胞は *in vitro* で培養すると、がん細胞に似た増殖特性を持つことが知られている。この軟骨細胞の特性から、軟骨細胞自らが強力な増殖因子を産生することが予想された。実際、軟骨中から軟骨細胞の増殖促進・DNA合成促進・プロテオグリカン合成促進活性のある因子の検索が行われ、コンドロモジュリン（軟骨由来細胞機能調節因子; ChM-I)が見出されている。ChM-Iは、334アミノ酸残基の前駆体 ChM-Iとして合成された後、プロテアーゼによるプロセッシングを受け、C末端側が成熟型 ChM-I(121アミノ酸残基の糖タンパク)として細胞外に分泌される。

ChM-Iは、血管内皮細胞の増殖阻害活性と内皮細胞による管腔形成阻害活性をも持ち、軟骨を無血管に保つうえで、重要な役割を持つことが示唆された。ChM-Iの主要な発現部位は軟骨であるが、その他には胸腺および眼にも微弱な発現が認められる。また、骨芽細胞に対しては増殖促進・分化抑制作用を持つことが知られている。ChM-Iの以上のような軟骨細胞・血管内皮細胞・骨芽細胞に対する *in vitro* における活性から、内軟骨性骨化の過程における無血管状態から血管形成状態への切り換えの制御および、血管侵入後の骨芽細胞の活性の制御に重要な役割を持つことが示唆される。また、骨機能の制御の上で、骨髄未分化間葉系細胞の分化制御への ChM-Iの関与の可能性は高いと考えられている。

これまでに、*in vitro* での ChM-Iの作用については詳細に調べられているものの、個体での ChM-Iの生理作用は全く未知である。そこで本研究では ChM-Iの生体内高次機能の解明を目的に、ChM-Iの遺伝子欠損マウス(ChM-I KO マウス)を作成し、表現型の解析を行った。

2. ChM-I 遺伝子欠損マウスの作成

マウス ChM-I cDNA (約 1.4kb) を用い、マウス ChM-I exon1-exon 4 を含む約 17kb のゲノム DNA 断片と exon 5-exon7 を含む約 20kb のゲノム DNA 断片を取得した。この DNA 断片について制限酵素地図を作製し、exon1 内の second ATG の直後(N末端から 21 アミノ酸残基め)に site direct mutagenesis 法により stop コドンを導入するとともに、exon3 を含むゲノム領域 3.5kb をネオマイシン耐性遺伝子(NEO^r)に置換したターゲティングベクターを構築した。これを C57BL6 と CBA マウスの F1 の ICM 由来である TT2 ES 細胞株にエレクトロポレーション法により導入し、サザンブロット法により相同組み換え体を同定した。得られた相同組み換え体 ES 細胞を CD-1 マウス 8 細胞期胚にアグリゲーション法により導入し、ES 細胞の寄与率が 100%のキメラマウスを得た。ついで、この ES 細胞が生殖細胞系列に伝搬したことをサザンブロット法により確認し、F1 ヘテロマウス (ChM-I^{+/-}) および F2 ホモマウス (ChM-I^{-/-}) を得た。得られた ChM-I^{-/-}マウスの軟骨よりタンパクを抽出し、ウエスタンブロット法により、抗リコンビナントヒト ChM-I ポリクローナル抗体を用いて ChM-I タンパクの発現を検討したところ、野生型においては ChM-I タンパク

は検出されたが、ChM-I^{-/-}マウスでは検出されなかった。したがって、ChM-I^{-/-}マウスは Null mutant であると断定した。以下、このホモマウスを ChM-I 遺伝子欠損 (以下 ChM-I KO) マウスとして解析した。

3. ChM-I 遺伝子欠損マウスの解析

ヘテロマウス同士の交配により出生する ChM-I KO マウスは、メンデルの法則による期待値とほぼ同等の数で誕生した。このことから、ChM-I は、個体の発生および生存には必須な因子でないと考えられた。ChM-I KO マウスは外見上は正常であり、生殖可能でかつ産仔数も正常で、体重も野生型との差異は認められなかった。そこで、ChM-I の発現組織である軟骨および隣接する骨組織と眼および胸腺の詳細な解析を行った。

3-1. 骨・軟骨組織における解析

ChM-I KO マウスの胎仔期の骨・軟骨形成は正常であり、生後の骨・軟骨組織も5週齢までは野生型との差異は認められなかった。しかし、12週齢の ChM-I KO (ChM-I^{-/-}) マウスにおいて野生型のマウスと比較して体重差がないにも関わらず、DEXA による大腿骨の骨密度分析の結果、有意に骨密度の上昇が認められた (野生型 $54.6 \pm 1.7 \text{ mg/cm}^2$, KO $59.1 \pm 4.3 \text{ mg/cm}^2$; mean \pm SD, $p < 0.01$)。一方、ヘテロ接合体 (ChM-I^{+/-}) には全く変異は認められなかった。頸骨組織切片の Villanueva-Goldner 染色を行ったところ、海面骨・皮質骨の双方で骨量が増加していることがわかった。次に、この骨密度増加の現象を詳細に解析するために骨組織形態計測を行った。単位骨量 (BV/TV) は KO マウスは野生型の約 2.5 倍 (野生型 $4.37 \pm 1.43\%$, KO $10.59 \pm 2.20\%$; mean \pm SEM) であり、骨芽細胞面 (Ob.S/BS) と破骨細胞数 (N.OC/BPm) はともに KO マウスにおいて顕著な減少 (それぞれ、60%, 35%) が認められた。骨形成速度 (BFR/BS) および吸収面 (ES/BS) もまた KO マウスにおいて顕著な減少 (それぞれ、45%, 64%) が認められた。従って、骨密度上昇は、骨形成・骨吸収の代謝回転の低下によるものであることがわかった。更に、種々の骨代謝マーカーについて検討したところ、ChM-I KO マウスにおいて血中カルシウムおよびリン濃度は正常であったが、骨形成マーカーである血中アルカリホスファターゼ活性 (野生型 $189 \pm 33.9 \text{ IU/L}$, KO $144 \pm 36.8 \text{ IU/L}$; $p < 0.005$) とオステオカルシン濃度 (野生型 $178 \pm 16.3 \text{ ng/ml}$, KO $147 \pm 28.6 \text{ ng/ml}$; $p < 0.05$) は野生型と比較して有意に減少していた。以上、本研究によって ChM-I が骨量および骨代謝の制御に関与していることを初めて明らかにした。

3-2. 胸腺における解析

ChM-I mRNA の胸腺組織における発現の局在を検証するために in situ hybridization 法により発現部位の同定を行ったところ、皮質層にのみシグナルが認められた。3週齢および5週齢の ChM-I KO マウスにおいて野生型との組織学的な差異は認められなかったが、9週齢の ChM-I KO マウスにおいて胸腺髄質層の萎縮と組織サイズの縮小および Total cell

number の顕著な減少 (約 40%) が認められた。そこで、胸腺における T cell population についての検討を FACS 解析にて行った。mature T cell の分化マーカーである CD4,CD8 については差が認められなかった。しかし、immature T cell の population を調べるために CD3⁺CD4⁺CD8⁻細胞の CD25,CD44 のプロファイルを作成したところ、CD44⁺CD25⁻細胞の増加 (野生型 12.6%,KO 21.8%)と CD44⁻CD25⁺細胞の減少(野生型 45.7%,KO 37.2%)が認められ、ChM-I の T 細胞分化への関与が示唆された。

3-3.眼における解析

眼において ChM-I mRNA は網膜に発現し、ChM-I タンパクは無血管である硝子体に蓄積していることが知られている。そこで Adult ChM-I KO マウスの眼について眼底撮影装置で血管の走行を調べたところ、野生型との差異は認められなかった。眼の組織切片の HE 染色においても網膜の層状構造は正常であり野生型との差異は認められなかった。

4. まとめ

本研究では ChM-IKO マウスを作成し、ChM-I の生体内高次機能の解明を試みた。作成した ChM-I KO マウスは null mutant であるにもかかわらず、予想に反して胎生中期の軟骨形成および胎生後期の一次内軟骨性骨化、生後の二次内軟骨性骨化ともに正常に行われ、野生型との差異は見いだされなかった。従って、in vitro におけるこれまでの知見からは ChM-I は内軟骨性骨化に重要であると考えられていたが、本研究における ChM-I KO マウスの表現型の解析から内軟骨性骨化において必須の因子ではないことがわかった。一方、これまでに成体における骨代謝および骨量の制御に関する ChM-I の作用に関する報告は全くなかったが、本研究において ChM-I KO マウスの骨密度増加および骨代謝回転低下を見出した。更に骨代謝を検討したところ骨吸収の低下の度合いが骨形成速度低下を上回るにより骨密度増加に至ることを見出した。即ち ChM-I は、何らかの破骨細胞機能に重要な役割を果たす可能性が示唆された。これらの結果より、ChM-I の生体内機能は軟骨より皮質骨・海面骨により重大な作用を持つことを明らかにした。また、ChM-I KO における胸腺細胞の減少および CD25,CD44 の population の変化から、ChM-I が T 細胞の増殖および分化に関与している可能性が示唆された。KO で認められた胸腺細胞の減少および骨芽細胞面・破骨細胞数の減少により、成体における T cell の供給源であるとともにこれらの細胞の幹細胞が存在する骨髄において、ChM-I が幹細胞の分化に関与している可能性が示唆される。今後、骨髄細胞の表面分化マーカーの発現について FACS で解析することで、ChM-I の作用部位・時期を解明することが可能であると期待される。

以上、本研究では ChM-I KO マウスを作成し、ChM-I が骨量および骨代謝の制御に関与していることを初めて明らかにした。また、胸腺機能の調節に ChM-I の機能が生理的に重要である可能性を明らかにすることが出来た。