

別紙 1

論文の内容の要旨

論文題目 軟骨特異的新規遺伝子Cystatin 10の生体内機能に関する研究

指導教官 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 山田高嗣

【背景】

中軸骨格や四肢の生理的な骨形成、あるいは骨折治癒や異所性骨化などにおける病理性な骨形成は、主に内軟骨性骨化によって生じることが知られている。そのため、内軟骨性骨化のメカニズムを解明することにより、骨・軟骨の成長障害や形成異常、脊柱靭帯骨化症などの異所性骨化などの病態に関する理解が深まり、これらの疾患に対する治療法や骨折の治癒促進など、新しい医療の確立に道が開かれる可能性がある。また、内軟骨性骨化は軟骨細胞の分化や増殖とも深く関わっており、そのメカニズムが明らかとなれば、変形性関節症や関節外傷における関節軟骨の再生など、再生医療にも有用な情報を提供する可能性も高い。

内軟骨性骨化は、細胞の増殖・分化・遊走・細胞死といった“細胞の一生”が繰り返される複雑な現象である。現在、この内軟骨性骨化に関与が報告されている分子群は、転写因子から細胞周期制御因子、アポトーシス制御因子、細胞増殖因子、受容体など多彩であるが、いずれも軟骨特異的な因子ではなく、それら複数分子間の相互的な関係は依然として不明で、一連の内軟骨性骨化過程に包括的に関与する因子も見されていない。

そのような中、腰塚らは内軟骨性骨化に重要と考えられる軟骨特異的な新規遺伝子

別紙 1

の単離に成功した。異所性骨化のモデルマウスとして nucleotide pyrophosphatase をコードする *Npps* の点変異を持つ *ttw* (tip toe walking) mouse が知られている。このマウスは、成長期より耳介軟骨、脊椎傍靭帯、関節包などにさまざまな異所性骨化を呈し、脊椎や関節の骨性強直をきたすことが知られている。このマウスを用いて異所性骨化の発症機序を解明する中で、腰塚らは、このマウスが高リン食により異所性骨化が著明に増強することを見いだした。そこで、異所性骨化に関与する新規遺伝子を単離する目的で、低リン食群と高リン食群の 2 群に分けて飼育し、耳介軟骨より RNA を抽出し、Differential display 法により、両群で発現パターンの異なる 6 種類の新規遺伝子を単離した。更にその中で、全身の組織の中で軟骨でのみ特異的に発現している 1 種類の遺伝子を特定した。この遺伝子は全長 801bp、ORF は 447bp (149a.a.) で、アミノ酸配列は cystatin C 遺伝子と 40% の homology があつた。この遺伝子は、cysteine proteinase inhibitor ファミリー (cystatin) に相同性を有することから cystatin10 (Cst10) と命名された。この Cst10 に関しては、以下の結果が得られている。

- 1) マウスの成長板における抗 Cst10 抗体を用いた免疫学的解析では、肥大軟骨細胞層に強い発現が認められ、静止軟骨細胞には発現はみられなかった。
- 2) マウス軟骨細胞様細胞株 ATDC5 で、インスリン刺激により Cst10 の発現が誘導され、Cst10 の発現が出現した数日後に肥大軟骨細胞のマーカーである X 型コラーゲンの発現がみられた。
- 3) Cst10 を ATDC5 細胞に強制発現させると、より早期から強力に X 型コラーゲンの発現がみられ、石灰化が亢進した。更に細胞にアポトーシスの誘導が確認された。これらの事実は、Cst10 が軟骨細胞の機能の中核を担っている可能性を強く支持するものと言える。本研究では骨・軟骨の形成、再生における Cst10 の役割と制御機構を解明することを目的として、Cst10 遺伝子欠損マウスを作出し、Cst10 の骨・軟骨代謝機能を中心に生体内高次機能の解明を試みた。

【方法と結果】

Cst10 遺伝子欠損マウスの作出

Cst10 遺伝子の完全な欠損個体を作成するため、Cst10 の転写開始点を含むエクソン 1 を、ポジティブ選択マーカー遺伝子として用いたネオマイシン耐性遺伝子 (NEO^r) で置換して、転写開始点とエクソン 1 を欠失させるターゲティングベクターを作製した。このベクターを ES 細胞にエレクトロポレーションして、相同組み換え体を得た後、初期胚にアグリゲーションを行い、100% キメラマウスを得た。この 100% キメラマウス

別紙 1

を用いて、二世代の交配により、Cst10遺伝子欠損マウス（Cst10KOマウス）の作出に成功した。雌雄のCst10KOマウスはメンデルの法則で予想される確率通りに誕生した。

Cst10KOマウスの表現型

骨組織の解析：8週齢の全身X線像では雄雌共に、KOマウスと野生型（WT）マウス間に全身骨格の形態に大きな差はなかった。摘出した大腿骨・脛骨のX線像でも、骨の形態には差は見られなかったが、骨幹端部の骨量低下が観察された。大腿骨の3次元CTでは、骨幹部や骨端部には差は見られないものの、骨幹端部の骨梁が著明に減少していることが観察された。摘出した8週齢の大腿骨の骨密度は、KOマウスがWTマウスに比べ7%、脛骨の骨密度は6%の低値を示した。20分割した骨密度測定によって、この骨量低下は成長板近傍の海面骨において強いことが確認された。海綿骨の骨組織形態計測を行うと、二次海綿骨で測定した単位骨量（BV/TV）は、KOマウスがWTマウスに対し軽度の低下を示した。一方、骨形成の指標や骨吸収の指標には差は見られなかった。血中・尿中の骨関連マーカーもKOマウスとWTマウス間で大きな差は見られなかった。

軟骨組織の解析：マウス胎仔の骨格標本では、WTマウスとKOマウスの間で骨格の形態、骨格の染色具合に顕著な差は見られなかった。頭胴長計測による成長曲線では、KOマウスがWTマウスと比較し軽度の成長の遅れが観察されたが、有意差は見られなかった。脛骨のtoluidine blue染色では、成長板軟骨の厚さや軟骨細胞の柱状配列は正常に保たれていた。一方、von Kossa染色では、成長板下端の肥大軟骨細胞層での石灰化がKOマウスで低下していた。成長板軟骨の形態計測を行うと、石灰化軟骨層の厚さがKOマウスで減少し、成長板軟骨全体に対する割合が有意に低下していた。また、石灰化した基質に覆われた、1コラム当たりの肥大軟骨細胞の数も、KOマウスで有意に減少していた。TRAP染色では、成長板下端の肥大軟骨細胞層や一次海面骨において、TRAP陽性の破軟骨細胞数の減少がKOマウスで確認された。II型コラーゲンやX型コラーゲンによる免疫染色では、WTマウスとKOマウスの間で顕著な差は見られなかった。マウス成長板から単離した軟骨細胞培養において、Alcian blue染色では差は見られなかったが、Alkaline phosphatase染色やAlizarin red染色では、KOマウスで染色性の低下が見られた。

病的状態におけるCst10の機能解析：骨折作製2週間後のX線では、WTマウス、KOマウス共に骨癒合が見られ、両者間で顕著な差は見られなかった。骨折部非脱灰切片のtoluidine blue染色では軟骨形成に差が見られなかったのに対し、von Kossa染色

別紙 1

で黒く染色される石灰化部分の減少がKOマウスで確認された。変形性膝関節症モデル作製10週間後の膝関節非脱灰切片では、KOマウスにおいて関節後方の骨棘形成が低下していた。この骨棘部分を詳細に観察すると、toluidine blue染色で染まる軟骨部分では、KOマウスにおいて細胞の肥大化が抑制されており、von Kossa染色で染まる石灰化部分はKOマウスで著しく減少していた。また、3次元CTによる観察でも、この骨棘形成はKOマウスで減少していた。骨棘の体積を測定したところ、KOマウスではWTマウスと比較し約70%減少していた。12ヶ月齢のWTマウスの全身X線撮影では、膝蓋靭帯やアキレス腱部の異所性石灰化が観察されるが、KOマウスではこれらの石灰化が著明に抑制されていた。3次元CTにより、アキレス腱部の異所性石灰化部分の体積を測定したところ、KOマウスではWTマウスと比較し約60%減少していた。

【考察と結論】

Cst10KO マウスの長管骨の組織学的解析により、成長板近傍の一次海面骨の減少が明らかとなり、これは長管骨の20分割した骨密度や、成長板周囲の3次元CTによっても確認された。成長板全体の厚みは、WTマウスとKOマウスで大きな差が見られなかったにも関わらず、肥大軟骨細胞層における石灰化障害がvon Kossa染色により明らかとなり、この成長板下端での石灰化障害が、一次海面骨量の減少を引き起こしていると考えられた。Cst10KOマウスでは、X型コラーゲンの免疫染色でも、WTマウスとの間に染色パターンの大きな差は見られなかったが、マウスの脛骨近位成長軟骨板から軟骨細胞を単離し培養する実験系において、軟骨細胞の後期分化を反映するAlkaline phosphatase染色や基質の石灰化を反映するAlizarin red染色で、KOマウスにおいて染色性が低下していたことから、主に肥大軟骨細胞において発現しているCst10は、実際の生体内では細胞の最終分化の促進、軟骨基質の石灰化に関与していることが明らかとなった。また、内軟骨性骨化が関与すると考えられる、骨折治癒過程・変形性関節症における骨棘形成・高齢化による異所性石灰化のモデルにおいても、Cst10KOマウスではWTマウスに比し石灰化の低下が認められ、今後このCst10の臨床応用に向けた更なる研究・解明が期待される。