

氏名	鳥原 秀美		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5937号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	出生後のマウス長管骨成長板の内軟骨性骨化における aggrecan の <i>in vivo</i> 機能解析		
論文審査委員	沢 禎彦 教授	久保田 聡 教授	池亀 美華 准教授

### 学位論文内容の要旨

論文内容の要旨 (2000字程度)

#### 【背景】

成長板や関節軟骨のような軟骨組織において豊富に存在する aggrecan は、典型的な大型のプロテオグリカンであり、ヒアルロン酸やコラーゲンと共に軟骨特有の弾力性と保水作用に関与していることが知られている。ヒトにおいて、aggrecan 遺伝 (ACAN) の Exon12 への1塩基対の挿入によりフレームシフトが生じることで、キンバリー型脊椎・骨端異形成症と呼ばれる低身長といった症状を呈する疾患が引き起こされるなど、ACAN の変異による骨格形成不全疾患が報告され、ACAN が骨格形成において重要な役割を担っていると考えられている。一方、Watanabe らは、Acan の Exon5 の7塩基欠失により、aggrecan のコアタンパクの合成の欠如が生じた結果、四肢の短縮や口蓋裂などの骨格に異常をきたす、自然発症型の cartilage matrix deficiency (cmd) マウスを報告してきた。これは、aggrecan が胎生期の長管骨成長板の発生において重要な役割を担っていることを示している。しかし、出生直後に気管軟骨や肋軟骨の形成不全に基づく呼吸不全により出生直後致死となるため、aggrecan が出生後の骨格発達においても重要であることが推測されるが、その詳細は未だ明らかではない。

そこで、ヒト ACAN 変異疾患の臨床病態を明らかにすることを最終目標に、本研究では、時期特異的に Acan を欠損させることが可能なタモキシフェン (TAM) 誘導性 Acan 全身欠損マウスを作製し、出生後の骨や軟骨の発達における aggrecan の役割を明らかにすることとした。

#### 【材料および方法】

1. *Acan*<sup>Rosa26<sup>-/-</sup></sup>マウスの作製およびTAM投与による *Acan* の mRNA 発現消失の確認  
*Acan*<sup>flx/flx</sup>; *ROSA26-Cre*<sup>ERT2</sup>マウスを作製した。*Acan*<sup>flx/flx</sup>; *ROSA26-Cre*<sup>ERT2</sup>マウスにTAM (20 μg/day) を出生後7日目から5日間連続で腹腔内投与し (以下、*Acan*<sup>Rosa26<sup>-/-</sup></sup>マウス)、21日目および56日目で解析した。対照として、*ROSA26-Cre*<sup>ERT2</sup>マウスに同様の方法を用いてTAMを投与したもの (以下、対照マウス) を用いた。また、同マウスのTAM投与前後の尻尾からgenomic DNA、剣状突起軟骨からmRNAを回収し、PCRおよび、定量性RT-PCRを行い、

*Acan*の発現解析を行なった。

## 2. *Acan* *Rosa26*<sup>-/-</sup>マウスの表現型解析

両マウスの体重を経時的に計測した。また、大腿骨の骨長、皮質骨、海綿骨をマイクロCTを用いて詳細に解析した。さらに、HE染色およびサフラニンO染色、免疫組織化学染色およびTUNEL染色を行い、組織学的に解析した。

### 【結果と考察】

#### 1. *Acan* *Rosa26*<sup>-/-</sup>マウスの作製およびTAM投与による*Acan*の消失の確認

TAM投与前後の*Acan*<sup>flx/flx</sup>; *ROSA26-Cre*<sup>ERT2</sup>マウス尻尾からgenomic DNAを抽出し、PCR解析を行なった。その結果、TAM投与により*Exon4*を含むLoxPに挟まれた部位が消失していること確認した。また、定量性RT-PCR解析を行った結果、Cre-LoxPシステムが正常に機能し、*Acan*のmRNAの発現がほぼ完全に消失していることを確認した。

#### 2. *Acan* *Rosa26*<sup>-/-</sup>マウスの表現型解析

*Acan* *Rosa26*<sup>-/-</sup>マウスでは、対照マウスと比較し体重は有意に低下し、明らかな成長不良が観察された。次に、マイクロCTを用いて大腿骨を詳細に解析した。その結果、*Acan* *Rosa26*<sup>-/-</sup>マウス大腿骨の長軸方向の成長は抑制されたが、皮質骨断面の厚みは対照マウスと比較し、有意な差は認めなかった。また、*Acan* *Rosa26*<sup>-/-</sup>マウスにおいて、海綿骨はほぼ観察されず、対照マウスと比較し、骨密度、骨量体積率、骨梁の厚さ、骨梁の数は有意に減少していた。組織学的解析の結果、*Acan* *Rosa26*<sup>-/-</sup>マウスの大腿骨成長板におけるカラム構造に異常が観察され、PCNA陽性の増殖軟骨細胞が減少し、TUNEL陽性のアポトーシスが誘導された細胞が増加していた。また、TAM投与49日後に大腿骨成長板のaggrecanの発現はほぼ完全に消失していることが確認されたが、COL IIの発現は発現パターンに変化を認めたものの、対照マウスのものと比較し発現量に差は認めなかった。

#### 3. *In vitro*におけるaggrecanの消失が軟骨細胞分化に与える影響の検討

*Acan*<sup>flx/flx</sup>; *ROSA26-Cre*<sup>ERT2</sup>マウス肋軟骨から単離した軟骨細胞を4-hydroxytamoxifenにて処理し、aggrecanの発現をノックアウトした。その結果、aggrecanの消失により、Alcian Blue染色の染色性は低下し、肥大軟骨細胞のマーカーであるX型コラーゲン $\alpha 1$ の遺伝子発現は有意に抑制された。しかし、軟骨細胞の初期の分化マーカーである*Sox9*や、静止・増殖軟骨細胞に発現するII型コラーゲン $\alpha 1$ の発現に有意な変化は認めなかった。

本結果より、aggrecanは、出生後の長管骨の長軸方向の成長に必須な細胞外マトリックスであることが明らかとなった。今後は、ヒトの疾患と同じ部位に変異が入った、*Acan*変異疾患モデルマウスを構築し、本疾患モデルマウスを詳細に解析することで、aggrecanが骨格形成に与える影響および、その病態発症メカニズムを明らかにする予定である。

### 【結論】

1. TAM誘導性*Acan*全身欠損マウスを作製し、TAM投与によりmRNAレベル、タンパクレベルで目的の遺伝子が消失していることを確認した。
2. 同マウスを用いて出生初期の*Acan*の欠損が骨・軟骨の発生に与える影響を解析した。その結果、長管骨の長軸方向の成長および海綿骨の形成は完全に抑制された。また、組織学的解析の結果、成長板のカラム構造に乱れが生じ、増殖軟骨細胞数は減少し、アポトーシスが亢進していた。
3. *In vitro*解析の結果、軟骨細胞分化過程において*Acan*が欠損することにより、増殖軟骨細胞から

肥大軟骨細胞への分化に障害が生じている可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、出生後の骨や軟骨の発達における aggrecan の役割を解明するために、タモキシフェン（TAM）誘導性 *Acan* 全身欠損マウスを作製し、*in vivo* における表現型および *in vitro* においては aggrecan の消失が軟骨細胞分化に与える影響について検討したものである。

### 【材料と方法】

*Acan<sup>flox/flox</sup>; ROSA26-Cre<sup>ERT2</sup>*マウスを作製した。*Acan<sup>flox/flox</sup>; ROSA26-Cre<sup>ERT2</sup>*マウスにTAM (20 μg/day) を出生後7日目から5日間連続で腹腔内投与し（以下 *Acan<sup>Rosa26</sup><sup>-/-</sup>*マウス）、出生後21日目および56日目で解析した。対照として、*ROSA26-Cre<sup>ERT2</sup>*マウスに同様の方法を用いてTAMを投与したもの（以下 対照マウス）を用いた。同マウスのTAM投与前後の尻尾からgenomic DNA、剣状突起軟骨からmRNAを回収し、PCRおよび定量性RT-PCRを行い、*Acan*の発現解析を行なった。

次に、両マウスの体重を経時的に計測した。また、micro-CTを用いて、大腿骨の骨長、皮質骨および海綿骨を詳細に解析した。そして、HE染色、サフラニンO染色、免疫組織化学染色およびTUNEL染色を行い、組織学的に解析した。さらに、*Acan<sup>flox/flox</sup>; ROSA26-Cre<sup>ERT2</sup>*マウス肋軟骨から単離した軟骨細胞を4-hydroxytamoxifenにて処理し、*in vitro*においてaggrecanの発現を消失させ、軟骨分化に与える影響を解析した。

### 【結果および考察】

PCR および定量性 RT-PCR 解析の結果、Cre-LoxP システムが正常に機能していることを確認した。同マウスを用いて表現型解析を行った結果、対照マウスと比較し、*Acan<sup>Rosa26</sup><sup>-/-</sup>*マウスでは体重は有意に低下し、明らかな成長不良が観察された。Micro-CT 解析の結果、*Acan<sup>Rosa26</sup><sup>-/-</sup>*マウス大腿骨の長軸方向の成長は抑制されたが、皮質骨断面の厚みに有意な差は認めなかった。海綿骨はほぼ観察されなかった。組織学的解析の結果、*Acan<sup>Rosa26</sup><sup>-/-</sup>*マウスの大腿骨成長板においては、カラム構造に異常が観察され、出生後 56 日のマウスにおいては aggrecan がほぼ完全に消失していることが確認されたが、II型コラーゲンは組織内分布に変化を認めたものの、量的に差は認めなかった。また、増殖軟骨細胞が減少し、アポトーシスが誘導されていた。マウスから単離した培養軟骨細胞においては、aggrecan の消失により Alcian Blue 染色の染色性は低下し、肥大軟骨細胞のマーカであるX型コラーゲンの遺伝子発現は有意に抑制された。しかし、軟骨細胞の初期の分化マーカである *Sox9* や、静止・増殖軟骨細胞に発現するII型コラーゲン遺伝子の発現に有意な変化は認めなかった。本結果より aggrecan は、出生後の長管骨の長軸方向の成長に必須な細胞外マトリックス分子の一つであり、軟骨細胞分化過程において *Acan* が欠損することにより、増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化に障害が生じている可能性が示された。

本研究で得られた知見は、aggrecan が生後の骨格形成で果たす役割および関連ヒト疾患の発症メカニズムの解明に資する貴重なものである。

以上より、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。