

研究紹介

Ellis-van Creveld 症候群の 原因遺伝子である *Evc* と *Lbn* の 脛骨における発現について

辻 岳人
(生物機能開発学)

Expression of *Evc* and *Lbn* Responsible for Ellis-van Creveld Syndrome in Tibial Growth Plate

Takehito Tsuji
(Department of Biological Function)

Ellis-van Creveld (*Evc*) syndrome is an autosomal recessive chondrodysplasia characterized by disproportionate dwarfism, postaxial polydactyly, natal teeth and dysplastic nails. Ellis-van Creveld (*EVC*) gene, which is mutated in patients with *Evc* syndrome, has recently been identified by positional cloning⁹. LIMBIN (*LBN*), responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism¹¹, is also mutated in patients with *Evc* syndrome¹⁰. However, the physiological roles of *EVC* and *LBN* have not been elucidated. To assess the role of *Evc* and *Lbn* in the endochondral ossification of long bone, we examined the profiles of *Evc* and *Lbn* expression in the rat tibial growth plate. The levels of *Evc* and *Lbn* expression in the rat tibia were most abundant at embryonic day 17 and were gradually decreased through postnatal days 1, 28 and 56. The analysis by *in situ* hybridization revealed that the *Evc* was expressed mainly in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes in the rat tibial growth plate at postnatal stage. *Lbn* was detected strongly in proliferative chondrocyte and moderately in prehypertrophic chondrocytes. These profiles of *Evc* and *Lbn* expression reflected the abnormalities in chondrocytes of patients with *Evc* syndrome. Our results suggest that *Evc* and *Lbn* may affect chondrocyte differentiation and proliferation in endochondral ossification, respectively.

Key words : chondrocyte, *EVC*, *LBN*,
Ellis-van Creveld syndrome,
endochondral ossification

緒言

骨の形成過程は多くの遺伝子の働きにより厳密に制御されているが、ある重要な遺伝子の異常により、さまざまな骨格の形成異常を引き起こすことが報告されている。このようにしておこる遺伝的な骨格の形成不全症は、ヒトだけでなくウシ、ブタ、ニワトリなどの家畜においても発症し、生産者に多大な経済的損失をもたらせる。また、今後さらに大型化に向けた改良がなされる家畜において、正常な骨格形成は必須の要因であり育種面において重要な課題である。したがって、骨の形成過程に関与する重要な遺伝子を同定し、その機能を解析することは、ヒトの臨床面だけでなく畜産分野にとっても重要であると考えられる。

Ellis-van Creveld 症候群は、軟骨の形成不全による四肢の短小を主な症状とし、その他に多指、爪および歯の形成不全などの異常が認められるヒトの遺伝病として知られてる³。近年、Ellis-van Creveld 症候群の原因遺伝子として *EVC* が同定され、四肢の形成過程において重要な遺伝子であると考えられている⁹。一方、我々の研究室を含む共同研究により、四肢の短小、関節の変形、歩行困難を特徴とするウシの軟骨形成不全症の解析により、新規の遺伝子である LIMBIN (*LBN*) が原因遺伝子として同定された¹¹。その後、*LBN* はヒトの Ellis-van Creveld 症候群のうち *EVC* に変異が認められない患者において変異が報告され、*EVC* と *LBN* の異なる遺伝子が Ellis-van Creveld 症候群の原因遺伝子であることが示された^{5,10}。さらに、これらの遺伝子は同一染色体上で約 2 Kb 離れて head-to-head として向き合っており、プロモーターを共有している可能性が考えられている¹⁰。以上の結果から、*EVC* と *LBN* が四肢の形成過程において重要な役割を担い、その過程において、これらの遺伝子は機能的に何らかの関連があるのではないかと思われる。しかし、これまでに *EVC* と *LBN* は四肢の骨形成過程においてどのように関与するのかは明らかにされておらず、Ellis-van Creveld 症候群が発病するうえで *EVC* と *LBN* がどのように関与するのか未だ不明である。本研究では、両遺伝子の骨組織における発現パターンを明らかにするとともに、特に四肢の伸張に重要である成長板軟骨組織における発現の局在について解析を行い、*EVC* と *LBN* の骨形成過程における役割と関連性について検討した。

材料・方法

RNA 抽出

胎齢17日、生後1日齢、4週齢、8週齢ラット脛骨の成長板軟骨を含む骨頭および4週齢ラットより肝臓、

脳、心臓、肺、腎臓、筋の各組織から TRIZOL Reagent (Invitrogen) を使用して RNA を抽出した。

半定量 RT-PCR

抽出した各組織の RNA から Super Script Preamplification System (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。ラット *Evc* と *Lbn* の塩基配列を明らかにするために、マウスの遺伝子の塩基配列を基に設定したプライマー (*Evc* 1 : 5'-ACCAGAAGTTCCGGCCTCTG-3' *Evc* 2 : 5'-GAGCTGGAACACTTAAACTGGTCC-3') (*Lbn* 1 : 5'-GTTCTTCCTAACCATGGTCTTCAC-3' and *Lbn* 2 : 5'-CCACCGCTGACCAGATTCTTCATC-3') を用い、ラットの脛骨 cDNA を用いた RT-PCR を行った。それぞれ増幅した DNA 断片について塩基配列を解析した後、ラット *Evc* と *Lbn* に特異的な各プライマー (*Evc* 3 : 5'-TGGCAAGGAGGATGGCAGCTC-3', *Evc* 4 : 5'-TGTTTGCCATCTGGCCTGAAGT-3') (*Lbn* 3 : 5'-ACACAGCAGGCTTCATCGCAG-3', *Lbn* 4 : 5'-CATCAGAAGGCAATGATGTCC-3') を用いて各組織の cDNA による RT-PCR を行った。使用した cDNA 量は、内部標準コントロールとして Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) をもちいて調整した。PCR 反応は 94°C (30秒), 60°C (30秒), 72°C (45秒) の条件で 28 サイクルの反応を行った。増幅した DNA 断片は 1.5% アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにより染色を行った。

In situ ハイブリダイゼーション

プローブにはジゴキシゲニンをラベルしたアンチセンスおよびセンスプローブを使用した。*Evc* 1 と *Evc* 2 もしくは *Lbn* 1 と *Lbn* 2 のプライマーにより増幅した DNA 断片を導入したプラスミドベクターから T7 および SP6 RNA ポリメラーゼによりプローブを作成した。*Evc* は生後 1 日および 4 週齢ラットの脛骨を、*Lbn* は生後 5 週齢マウスの脛骨における発現をそれぞれ調べた。脛骨の組織切片は 4% パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィンに包埋して作成した。組織切片を HCl, Proteinase K による前処理を行った後、1 μg/ml プローブを含む hybridization buffer (50% formamide, 1xDenhardt's solution, 4xSSC, 10% dextran sulfate, 1 mM EDTA) で 42°C で 12 時間のハイブリダイゼーションを行った。2xSSC および 0.1xSSC により洗浄した後、DIG nucleic acid detection kit (Roche Molecular Biochemicals) によりシグナルを検出した。反応後の切片はメチルグリーンにより核染色を行った。

結果及び考察

半定量 RT-PCR による *Evc* と *Lbn* の脛骨における発現パターンの解析

胎生期から生後 8 週齢までのラット脛骨および 4 週齢

ラットの各組織における *Evc* と *Lbn* の発現について解析した。まず、ラットの *Evc* と *Lbn* の塩基配列は未だに明らかにされていないことから、ラットの両遺伝子の一部を単離することを試みた。マウスの遺伝子の塩基配列をもとに設定したプライマーにより、ラット脛骨 cDNA を用いた RT-PCR を行った結果、*Evc* cDNA として 611 bp, *Lbn* cDNA として 384 bp の断片をそれぞれ増幅した。これらの塩基配列はマウスの *Evc* と *Lbn* に対してそれぞれ 95.1% と 94.1% の相同性が認められ、今回増幅した cDNA はラットの *Evc* と *Lbn* であることを確認した (データ省略)。これらの塩基配列を基にラットの *Evc* と *Lbn* のそれぞれに特異的なプライマーを作成し、RT-PCR により発現パターンを調べた。まず、脛骨における発現パターンは、両遺伝子ともに胎生期で最も強く、生後個体の脛骨では週齢を増すにしたがって発現量が減少していた (Fig. 1 A)。また、各組織における発現を調べたところ、*Evc* はすべての組織で発現していることが確認された。*Evc* の発現は肺において最も強く発現しており、腎臓、脳においても強い発現が確認され、肝臓、心臓、筋でもわずかに発現していることが確認された。一方、*Lbn* もすべての組織での発現が確認され、肺において最も強い発現が認められ、次いで脳、腎臓でも強く発現し、これらの結果は *Evc* の発現パターンと類似していた (Fig. 1 B)。

以上の結果から、両遺伝子とも軟骨細胞を含む骨で発現しており、骨が活発に形成されている胎生期から機能することが示唆され、Ellis-van Creveld 症候群における四肢の短小への関与を支持する結果となった。また、*Evc*

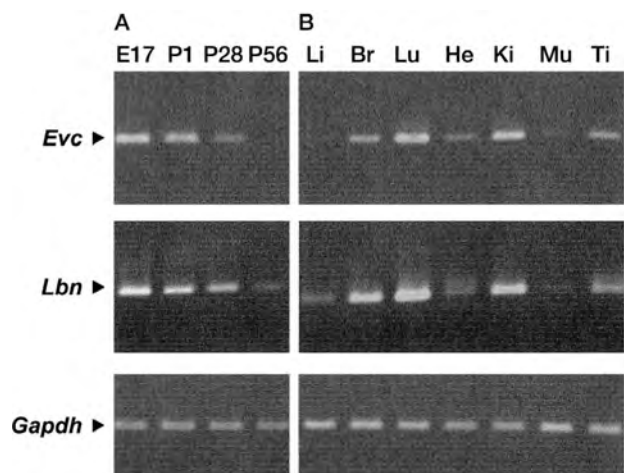


Fig. 1 Analysis of the expression of rat *Evc* and *Lbn* by RT-PCR.

The expression was analyzed in (A) rat tibia from embryonic day 17 (E17), postnatal day 1 (P1), 28 (P28) and 56 (P56) and in (B) rat tissues, the liver (Li), brain (Br), lung (Lu), heart (He), kidney (Ki), muscle (Mu) and tibia (Ti).

と *Lbn* は今回調べたすべての組織で発現が確認された。今回の半定量 RT-PCR による解析では、*Evc* と *Lbn* との発現量を単純に比較することは出来ない。しかしながら、両遺伝子とも組織間における発現パターンは非常に類似していることが明らかになった。このことは head-to-head として配置している両遺伝子がプロモーターを共有している可能性をさらに高めるとともに、機能的にも関連している可能性が推測された。また、骨以外の組織において発現していることが確認され、これまでに Ellis-van Creveld 症候群の症状として稀ではあるが、肺、腎臓、肝臓にも異常が報告されていることから¹⁷⁾、骨組織だけでなく、これらの組織においても何らかの機能を担っている可能性が新たに考えられた。

In situ ハイブリダイゼーションによる *Evc* と *Lbn* の発現局在についての解析

脛骨の成長板軟骨における *Evc* と *Lbn* の発現局在を *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した。*Evc* は生後 1 日齢と 4 週齢の両方の成長板軟骨ともに、主に成熟層から肥大層の軟骨細胞に強く発現していた (Fig. 2 A, B)。一方、静止層および増殖層の軟骨細胞には発現が認められなかった。同様の方法により *Lbn* の発現局在を検証した結果、増殖層にもっとも強い発現が認められ、成熟層においても、増殖層ほど強くはないが発現していることが確認された (Fig. 2 C)。また、静止軟骨細胞層では発現していなかった。*Evc* と *Lbn* の両者ともにセ

ンスプローブではシグナルを検出できなかった (Fig. 2 D, E, F)。

四肢などの長管骨の伸張には、骨幹端に存在する成長板軟骨と呼ばれる軟骨細胞層が非常に重要である。成長板軟骨における軟骨細胞は、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、成熟軟骨細胞、肥大軟骨細胞の順に分化し、その後アポトーシスをおこし骨組織へと置換される。各細胞層への移行は、厳密に規定されており、これまでにいくつかの遺伝子が関与していることが明らかにされている²⁾。本研究により、*Evc* と *Lbn* は特定の軟骨細胞に発現していることが明らかとなり、両遺伝子が Ellis-van Creveld 症候群の原因遺伝子であることをさらに支持している。さらに、両遺伝子の発現局在は Ellis-van Creveld 症候群を発症したヒトの成長板軟骨で報告されている増殖および肥大軟骨細胞での異常と一致しており^{4,6,8)}、両遺伝子がそれぞれ特異的な時期に機能していることが示唆された。つまり、*Evc* が発現していた成熟層から肥大層への発現は、軟骨細胞が活発に増殖している増殖層から肥大化へと移行する時期に相当し、*Evc* が肥大化軟骨細胞への移行に関与することが予想された。一方、*Lbn* は増殖層から成熟層にかけて発現していることから、*Lbn* が軟骨細胞の増殖と肥大化に関与することが考えられた。*Evc* と *Lbn* の発現局在を比較すると、それぞれの遺伝子が最も強く発現している軟骨細胞の範囲は完全には一致していなかったが、成熟層から肥大層においては両遺伝子の

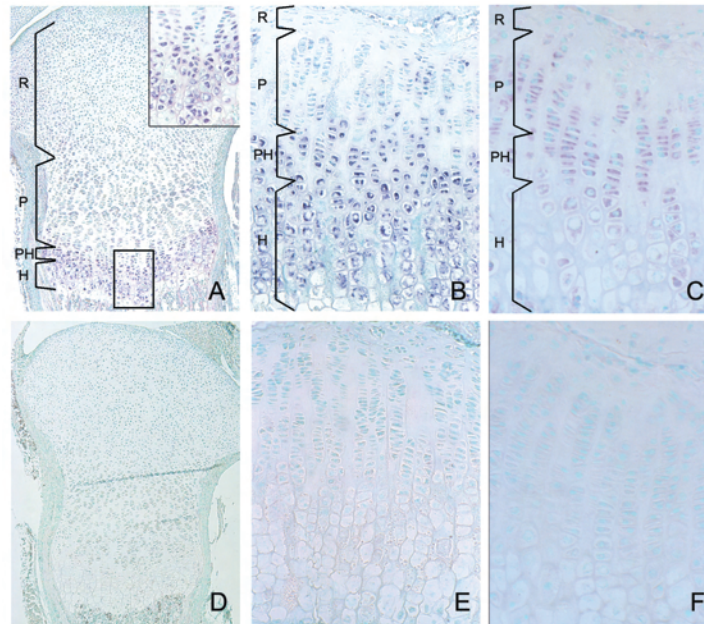


Fig. 2 Analysis of expression of *Evc* and *Lbn* in tibial growth plate by *in situ* hybridization.

Evc mRNA was detected in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes at postnatal day 1 (A) and day 28 (B). *Lbn* mRNA was detected in proliferative and prehypertrophic chondrocytes (C). No signal was detected in negative control using sense probe (D, E and F). R, the zone of resting chondrocyte; P, the zone of proliferative chondrocyte; PH, the zone of prehypertrophic chondrocyte; H, the zone of hypertrophic chondrocyte.

発現が確認された。したがって、両遺伝子の機能が互いに関連しているかどうかは不明なままであるが、発現が一致している成熟層から肥大層にかけて両遺伝子が機能している可能性も考えられる。

以上、*Evc* と *Lbn* の成長板軟骨組織における発現局在を明らかにし、*Evc* と *Lbn* が軟骨細胞を介した骨形成過程において重要な遺伝子であることを示した。今後、本研究で示唆された軟骨細胞における役割を検証するために、培養軟骨細胞を用いた機能的解析をさらに進める必要があると考える。

文 献

- 1) Bohm, N., M. Fukuda, R. Staudt and H. Helwig : Chondroectodermal dysplasia (Ellis-van Crevelde syndrome) with dysplasia of renal medulla and bile ducts. *Histopathology*, **2**, 267-281 (1978)
- 2) Cohen M.M. Jr : Some chondrodysplasias with short limbs : molecular perspectives. *Am. J. Med. Genet.*, **112**, 304-313 (2002)
- 3) Ellis, R. W. B. and S. van Crevelde : A syndrome characterized by ectodermal dysplasia, polydactyly, chondrodysplasia and congenital morbus cordis : report of three cases. *Arch. Dis. Child.*, **15**, 65-84 (1940)
- 4) Erzen, M., R. Stanescu, V. Stanescu and P. Maroteaux : Comparative histopathology of the growth cartilage in short-rib polydactyly syndromes type I and type III and in chondroectodermal dysplasia. *Ann. Genet.*, **31**, 144-150 (1988)
- 5) Galdzicka, M., S. Patnala, M. G. Hirshman, J. F. Cai., H. Nitowsky, J. A. Egeland and E. I. Ginns : A new gene, *EVC* 2, is mutated in Ellis-van Crevelde syndrome. *Mol. Genet. Metab.*, **77**, 291-295 (2002)
- 6) Guschmann, M., D. Horn, A. Gasiorek-Wiens, M. Urban, J. Kunze and M. Vogel : Ellis-van Crevelde syndrome : examination at 15 weeks' gestation. *Prenat. Diagn.*, **19**, 879-883 (1999)
- 7) Moudgil, A., A. Bagga, E. S. Kamil, D. L. Rimoin, R. S. Lachman, A. H. Cohen and S. C. Jordan : Nephronophthisis associated with Ellis-van Crevelde syndrome. *Pediatr. Nephrol.*, **12**, 20-22 (1998)
- 8) Qureshi, F., S. M. Jacques, M. J. Evans, M. P. Johnson, N. B. Isada and S. S. Yang. : Skeletal histopathology in fetuses with chondroectodermal dysplasia (Ellis-van Crevelde syndrome). *Am. J. Med. Genet.*, **45**, 471-476 (1993)
- 9) Ruiz-Perez, V. L., S. E. Ide, T. M. Strom, B. Lorenz, D. Wilson, K. Woods, L. King, C. Francomano, P. Freisinger, S. Spranger, B. Marino, B. Dallapiccola, M. Wright, T. Meitinger, M. H. Polymeropoulos and J. Goodship : Mutations in a new gene in Ellis-van Crevelde syndrome and Weyers acrodistal dysostosis. *Nat Genet.*, **24**, 283-286 (2000)
- 10) Ruiz-Perez, V. L., S. W. Tompson, H. J. Blair, C. Espinoza-Valdez, P. Lapunzina, E. O. Silva, B. Hamel, J. L. Gibbs, I. D. Young, M. J. Wright and J. A. Goodship : Mutations in Two Nonhomologous Genes in a Head-to-Head Configuration Cause Ellis-van Crevelde Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **72**, 728-732 (2003)
- 11) Takeda, H., M. Takami, T. Oguni, T. Tsuji, K. Yoneda, H. Sato, N. Ihara, T. Itoh, S. R. Kata, Y. Mishina, J. E. Womack, Y. Moritomo, Y. Sugimoto and T. Kunieda : Positional cloning of the gene *LIMBIN* responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 10549-10554 (2002)