

軟骨形成不全症モデル動物を用いた長管骨の成長を制御する遺伝子の解析

辻 岳 人

岡山大学大学院 自然科学研究科

1. 背景

骨格は、頭蓋を構成する頭蓋顔面骨、椎骨や肋骨などの体の中心部を構成する体軸骨、手足などを構成する四肢骨により構成される。これらの骨は、軟骨内骨化と膜内骨化の2つの異なる様式により形成される。軟骨内骨化では、最初に軟骨が形成され、その後骨へと置き換えられるもので、長管骨、椎骨、骨盤など骨格の大部分を形成する。軟骨内骨化において重要な役割を担う軟骨組織は、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞と呼ばれる長軸方向に配列した特徴的な形態変化を示すいくつかの軟骨細胞層から構成され、骨に置き換わるまでに順次変化してゆく。骨が効率よく成長するためには、これら一連の連続的な過程が正常に機能することが非常に重要となる。これらの過程は非常に複雑であり、多くの遺伝子により時間的にも空間的にも厳密に制御されている(1)。しかし、ある重要な遺伝子の変異は、軟骨内骨化の過程に異常をもたらし、長管骨や椎骨などの軟骨内骨化により形成される骨の成長が阻害される。ヒトでは低身長や四肢の短縮などが特徴的な症状として現れる先天性の疾患として知られている。また、家畜においてもこのような疾患の発症は、経済形質に悪影響を及ぼす可能性が高く、畜産農家にとっても深刻な問題となる。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非常に重要な課題の1つである。これまでに、さまざまな骨系統疾患の原因遺伝子が同定されつつあるが、未だ原因遺伝子が明らかにされていない疾患や、原因遺伝子が同定されても機能が解明されていないものなどが多数あり、今後さらに、これらの課題を解決する必要がある。本稿では、我々がこれまでに行ってきたモデル動物を利用した骨系統疾患の原因遺伝子の同定および機能解析への取り組みについて説明する。

2. Ellis-van Creveld症候群の原因遺伝子である *EVC*, *LBN* に関する解析

Ellis-van Creveld症候群は、軟骨の形成不全による四肢の短小を特徴とする遺伝性の疾患であり(2)、近年、原因遺伝子としてEllis-van Creveld (*EVC*) が同定された(3)。一方、これまでに我々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骨系統疾患を示すウシから、新規の遺伝子である*LIMBIN* (*LBN*) を原因遺伝子として同定した(4)。その後、非常に興味深いことに*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、6)。このことは、*EVC*と*LBN*は四肢の形成過程において重要な役割を担うだけでなく、機能的にも何らかの関連性があるのではないかと推測される。しかし、これまでに両遺伝子が四肢の骨形成過程において、どのように関与するのかは全く明らかにされていない。そこで、*EVC*と*LBN*の骨形成過程における役割と関連性を明らかにするために、まず、骨組織における発現パターンについて解析を行った。

(1) 各組織における*Evc*と*Lbn*の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、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(図1A)。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(図1B)。

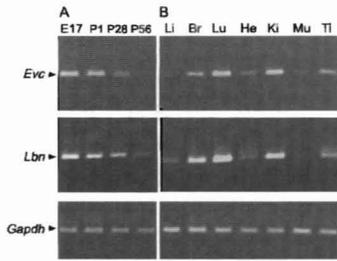


図1 RT-PCRによる *Evc*と*Lbn* 遺伝子のラット組織での発現解析

- A: 胎生17日 (E17)、生後1日 (P1)、28日 (P28)、56日 (P56)の脛骨における発現
 B: 肝臓(Li)、脳(Br)、肺(Lu)、心臓(He)、腎臓(Ki)、筋肉(Mu)、脛骨(Ti)における発現

(2) 成長板軟骨組織における*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*は主に成熟層から肥大層の軟骨細胞に強く発現していた(図2 A)。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(図2 B)。また、静止軟骨細胞層では発現していなかった。

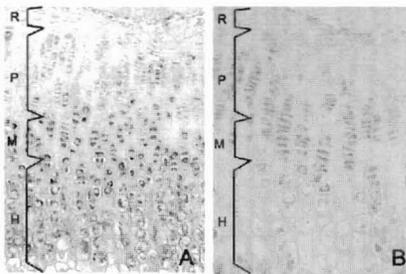


図2 in situ hybridizationによる*Evc* (A)と*Lbn* (B) 遺伝子の脛骨成長板軟骨での発現解析

- R: 静止軟骨細胞層、P: 増殖軟骨細胞層、M: 成熟軟骨細胞層、H: 肥大軟骨細胞層

以上の結果より、両遺伝子とも長管骨における発現が確認され、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であった。また、*Evc*と*Lbn*は今回調べたすべての組織で発現が確認され、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。これらの遺伝子は同一染色体上で約2Kb離れてhead-to-headとして向き合っていることから(6)、両遺伝子がプロモーターを共有している可能性があり、機能的にも関連している可能性が推測され

た。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(7、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発現が確認された。したがって、両遺伝子の機能が完全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た。*Evc*と*Lbn*ともに膜貫通ドメイン、ロイシンジッパードメイン、核移行シグナルからなるが、他に類似した構造をもつ遺伝子はみつからない。今後さらに、これらの遺伝子の標的分子の同定や機能解析を進めることで、新たな骨成長の制御機構が明らかになることが期待される。また、現在我々は*Lbn*のノックアウトマウスについて解析を進めており、*Lbn*の機能を解明しつつ*Evc*との関連性についても明確にしたいと考えている。

3. achondroplasia (*cn/cn*)マウスの原因遺伝子の同定

achondroplasia (*cn/cn*) マウスは、ジャクソン研究所で維持しているAKR/J系統より出現した常染色体劣性の突然変異マウスである(9)。*cn/cn* マウスの特徴としては体のサイズが小さく、特に四肢と尾の短縮が顕著に現れる(図3 A)。これらの表現型は生後1週齢までに認められ、週齢が増すにつれて正常個体との差が明確になり、四肢骨の長さは正常の約60%程度にしか成長しない(10)。これまでの骨組織の組織学的解析により、成長板軟骨における増殖軟骨細胞層と肥大軟骨細胞層の減少が認められており(図3 B)(11)、ヒトの軟骨形成不全症のモデル動物として知られている。これまでに原因遺伝子(*cn*)の詳細な位置は明らかにされておらず、原因遺伝子も同定されなかった。我々は*cn/cn*マウスの原因遺伝子を同定することで、軟骨内骨化を制御する新たな遺伝子を同定することにつながると考え、連鎖解析によるマッピングにより*cn*の詳細な位置を明らかにし、さらに原因遺伝子を同定することを試みた。

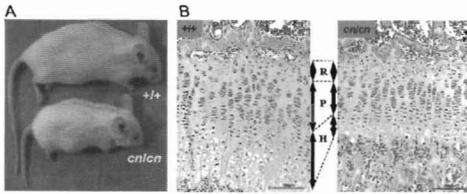


図3 +/+マウスと cn/cn マウスの外観と成長板軟骨の組織像

- A : 14週齢同腹の+/+マウスと cn/cn マウス
 B : 4週齢+/+マウスと cn/cn マウスの脛骨成長板軟骨
 R : 静止軟骨細胞層、P : 増殖軟骨細胞層、
 H : 肥大軟骨細胞層

(1) cn/cn マウスの原因遺伝子マッピング

他系統マウスとの交配により得られたF2マウスのうちホモ (cn/cn) 個体についてマイクロサテライトマーカーによるタイピングをおこなった。その結果、第4染色体上の近位端側のマーカーと表現型との有意な連鎖が認められ、原因遺伝子はD4Mit182からD4Mit109の間の約0.8cMの領域に存在することが明らかになった(図4)。この連鎖の認められた約0.8cMの領域は、マウスゲノムデータベースからの物理地図と比較すると約0.8Mbに相当しており、30個程度の機能的遺伝子が存在していることが報告されていた。さらに cn/cn マウスの原因遺伝子の候補を絞り込むために、骨形成との関連性が知られている遺伝子を探索したところ、natriuretic peptide receptor 2 (*Npr2*)の遺伝子が見つかった(図4)。*Npr2*は、ナトリウム利尿ペプチドファミリーの一つであるC型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)のレセプター(NPRB)をコードしており、CNPはロックアウトマウスなどの解析から局所調節因子として軟骨内骨化による骨形成の促進因子として知られている(12)。

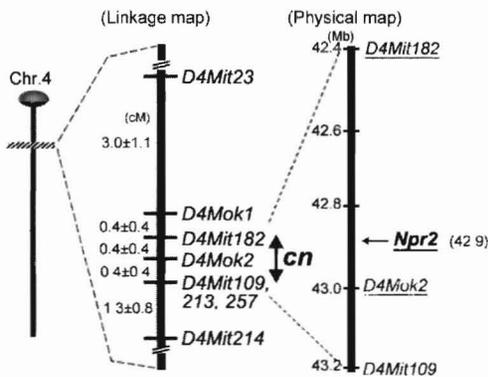


図4 cn 遺伝子座の連鎖解析によるマッピング
 右側にマイクロサテライトマーカーの位置を、左側にマーカー間の距離(cM)を示している。

(2) cn/cn マウスの*Npr2*に関する解析

*Npr2*のすべての翻訳領域を含むcDNA断片をRT-PCRにより増幅し、 cn/cn と+/+マウスの塩基配列について比較したところ、2654番目のtがgに変異している塩基置換が確認された。さらに、この塩基置換はLeuからArgへのアミノ酸置換を伴うミスセンス変異であった(図5)。NPRBの

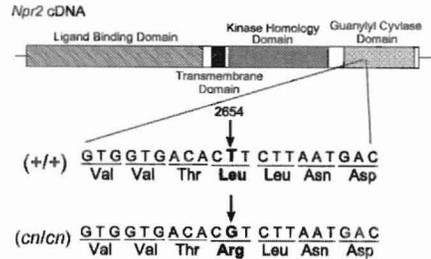


図5 +/+マウスと cn/cn マウスの*Npr2* cDNA塩基配列の比較

構造は、細胞外のリガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、キナーゼホモロジードメイン、グアニル酸シクラーゼドメインからなる。NPRBの細胞外ドメインにリガンドが結合するとグアニル酸シクラーゼドメインの活性化によりセカンドメッセンジャーであるcGMPが合成される。そこで、我々は突然変異がグアニル酸シクラーゼドメインによるcGMP合成に影響を及ぼしていると予想し、 cn/cn と+/+マウスの肋骨からの培養軟骨細胞でCNP刺激によるcGMPの合成能について解析を行った。その結果、+/+マウスの軟骨細胞ではCNPの濃度依存的にcGMP濃度が上昇したが、 cn/cn では全く上昇が認められなかった(図6)。

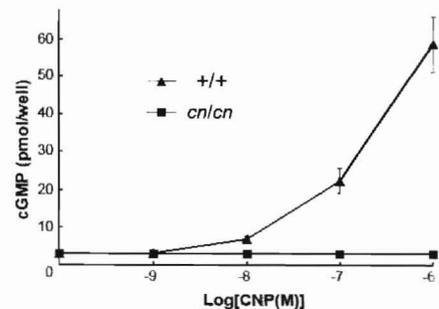


図6 +/+マウスと cn/cn マウスの軟骨細胞へのCNP添加後のcGMP量

以上の結果から、*Npr2*におけるミスセンス変異は、NPRBのグアニル酸シクラーゼドメインの機能欠損をもたらすことが明らかとなった。これまでに、cGMPは培養条件下における長管骨の成長を促進すること(13)、さらに、cGMPの下流シグナルであるcGMP-dependent protein kinase II

のノックアウトマウスは軟骨内骨化の異常により骨の伸長異常を示すことから (14)、cGMPは骨伸長に重要な役割を果たすことが明らかにされている。したがって、*cn/cn*マウスの骨伸長阻害は、*Npr2*におけるミスセンス変異に起因するNPRBのcGMP合成能の損失によりもたらされることが示唆された。

これまでにCNPが骨伸長の促進因子であることは、最近の研究から明らかにされつつある。一方、レセプターであるNPRBについては軟骨細胞における発現は確認されているものの (15)、骨伸長作用に関与することを示す直接的な証拠は無く、NPRBからのシグナルが本当に骨伸長に関わっているかは不明であった。我々が*cn/cn*マウスの原因遺伝子を見つけた同じ頃、四肢短縮を伴う低身長を特徴とする疾患であるヒトでのマロトー型の遠位中間肢異形成症の原因遺伝子が*NPR2*であることが報告され、NPRBを介するシグナルが骨伸長作用に重要であることが初めて示された (16)。*cn/cn*マウスについては、ヒトの場合と異なりこれまでに多く組織学的解析を中心とした解析報告があり、*cn/cn*マウスは軟骨内骨化における*Npr2*の役割や発症メカニズムを解析するうえで非常に有用であると思われる。また、ヒトの小人症で最も発症頻度が高い軟骨無形成症の原因遺伝子であるFGFR3のノックアウトマウスにおいて、軟骨無形成症の症状がCNPにより改善されたことから、CNPが軟骨無形成症の治療に有効である可能性が報告されている (17)。したがって、今後さらにCNP/NPRBによる軟骨内骨化の制御機構の解明は確実に重要性を増すと予想され、*cn/cn*マウスは有用な研究対象としてその一役を担うことが期待される。

参考文献

1. Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. 1995. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*, 80 : 371-378.
2. Ellis RWB, van Creveld S. 1940. A syndrome characterized by ectodermal dysplasia, polydactyly, chondro-dysplasia and congenital morbus cordis : report of three cases. *Arch. Dis. Child*, 15 : 65-84.
3. Ruiz-Perez VL, Ide SE, Strom TM, Lorenz B, Wilson D, Woods K, King L, Francomano C, Freisinger P, Spranger S, Marino B, Dallapiccola B, Wright M, Meitinger T, Polymeropoulos MH, Goodship J. 2000. Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodistal dysostosis. *Nat. Genet.*, 24 : 283-286.
4. Takeda H, Takami M, Oguni T, Tsuji T, Yoneda K, Sato H, Ihara N, Itoh T, Kata SR, Mishina Y, Womack JE, Moritomo Y, Sugimoto Y, Kunieda T. 2002. Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99 : 10549-10554.
5. Galdzicka M, Patnala S, Hirshman MG, Cai JF, Nitowsky H, A Egeland J, Ginns EI. 2002. A new gene, *EVC2*, is mutated in Ellis-van Creveld syndrome. *Mol. Genet. Metab.*, 77 : 291-295.
6. Ruiz-Perez VL, Tompson SW, Blair HJ, Espinoza-Valdez C, Lapunzina P, Silva EO, Hamel B, Gibbs JL, Young ID, Wright MJ, Goodship JA. 2003. Mutations in Two Nonhomologous Genes in a Head-to-Head Configuration Cause Ellis-van Creveld Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 72 : 728-732.
7. Erzen M, Stanescu R, Stanescu V, Maroteaux P. 1988. 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.
8. Guschmann M, Horn D, Gasiorek-Wiens A, Urban M, Kunze J, Vogel M. 1999. Ellis-van Creveld syndrome: examination at 15 weeks' gestation. *Prenat. Diagn.*, 19 : 879-883.
9. Lane PW, Dickie MM. 1968. Three recessive mutations producing disproportionate dwarfing in mice: achondroplasia, brachymorphic, and stubby. *J. Hered.*, 59 : 300-308.
10. Silberberg R, Lesker P. 1975. Skeletal growth and development of achondroplastic mice. *Growth*, 39 : 17-33
11. del Marco A. 1981. Observations of growth plate development in achondroplastic (*cn/cn*) mice. *Reprod. Nutr. Dev.*, 21 : 1025-1031
12. Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, Nakamura K, Nakao K, Kurihara T, Komatsu Y, Itoh H, Tanaka K, Saito Y, Katsuki M, Nakao K. 2001. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 : 4016-4021.
13. Mericq V, Uyeda JA, Barnes KM, De Luca F, Baron J. 2000. Regulation of fetal rat bone growth by C-type natriuretic peptide and cGMP. *Pediatr. Res.*, 47 : 189-193
14. Miyazawa T, Ogawa Y, Chusho H, Yasoda A, Tamura N, Komatsu Y, Pfeifer A, Hofmann F, Nakao K. 2002. Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification.

- Endocrinology, 143 : 3604-3610
15. Yamashita Y, Takeshige K, Inoue A, Hirose S, Takamori A, Hagiwara H. 2000. Concentration of mRNA for the natriuretic peptide receptor-C in hypertrophic chondrocytes of the fetal mouse tibia. *J. Biochem.*, (Tokyo), 127 : 177-179
 16. Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, Mundlos S, Chitayat D, Shih LY, Al-Gazali LI, Kant S, Cole T, Morton J, Cormier-Daire V, Faivre L, Lees M, Kirk J, Mortier GR, Leroy J, Zabel B, Kim CA, Crow Y, Braverman NE, van den Akker F, Warman ML. 2004. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am. J. Hum. Genet.*, 75 : 27-34
 17. Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. 2004. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat. Med.*, 10 : 80-86