

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 *in vivo* 機能解析

鳥原秀美

緒言

骨組織における骨化様式は内軟骨性骨化と膜性骨化に大別され、主に軟骨細胞および骨芽細胞の働きによるものである。内軟骨性骨化とは、頭蓋骨および下顎骨の一部や鎖骨等を除く体内のすべての骨の発生に関与しており、未分化間葉系細胞が軟骨細胞へと分化し、増殖、肥大化および石灰化の一連の分化過程を経た後に骨組織に置換される骨化様式であり、骨の発生時期に形成される成長板によって長幹骨の長軸方向の成長が制御されていることが知られている¹⁻³⁾。具体的に、成長板において、扁平な静止軟骨細胞が連鎖状の軟骨細胞柱（カラム）を形成しながら増殖し、aggrecan および II 型コラーゲンを含む軟骨特異的な細胞外マトリックス（ECM）を発現する成熟軟骨細胞に分化する。その後、軟骨細胞は肥大化し、プログラム細胞死（アポトーシス）を受け、この際に生じた空間に血管とともに間葉系細胞が侵入し、骨芽細胞へと分化しながら骨基質を産生することで、海綿骨が形成される⁴⁾。骨成長において軟骨細胞の増殖、肥大および ECM 産生は、骨の長軸方向の成長を決定する因子であり、軟骨における ECM は、主にプロテオグリカン、非コラーゲン性糖タンパク質および II 型コラーゲンから構成される。プロテオグリカンは、コンドロイチン硫酸（CS）やケラタン硫酸（KS）などのグリコサミノグリカン（GAG）鎖がコアタンパクに共有結合してできる分子群であり、複雑な ECM の構造的構成要素として作用するだけでなく、様々なシグナル分子と相互作用することで、組織発生、恒常性および病理学的プロセスを制御していることが知られている⁵⁻⁸⁾。

Aggrecan は、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ことに加え、脳や大動脈などの組織にも存在する典型的な大型の CS / KS プロテオグリカンであり^{9,10)}、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^{11,12)}。ヒトにおいて、aggrecan 遺伝子 (*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 (SEDK: spondyloepiphyseal dysplasia, Kimberley type) と呼ばれる低身長や進行性骨関節症といった症状を呈する疾患が引き起こされることが知られている^{13,14)}。また、*ACAN* の G3 ドメインのミスセンス突然異常により、劣性遺伝の骨格形成異常症で

ある脊椎骨端骨幹端異形性症 (SEMD: spondylometaepiphyseal dysplasia) が引き起こされるなど、他にも、*ACAN* の異常による骨格形成不全疾患が多く報告され¹⁵⁻¹⁷⁾、*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。また、病理組織学的解析の結果、胎生期の本マウスの長管骨成長板のカラム構造に異常が生じることを報告している^{10,18-21)}。本結果は、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、ホモで変異をもつ場合のみ表現型を示すが、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。そして、本マウスを作製し解析を行った結果、生後 7 日目にタモキシフェンを投与し *Acan* を消失させることで、対照マウスと比較し、骨格の成長が有意に抑制され、大腿骨成長板において、増殖軟骨細胞層の形態変化およびカラム構造の変化が生じ、増殖軟骨細胞数の減少、アポトーシスの亢進が生じていることが明らかとなった。

材料ならびに方法

1. 動物実験モデル

Acan の *Exon4* を含む遺伝子領域を LoxP で挟んだ mutant allele を持つ *Acan^{flx/flx}* マウス²²⁾ とマウスの全身の細胞で Cre リコンビナーゼとエストロゲン受容体の複合体 (CreERT2) を発現する *ROSA26-Cre^{ERT2}* マウス²³⁾ を交配させ、時期特異的 *Acan* 全身ノックアウトマウス、*Acan^{flx/flx}; ROSA26-Cre^{ERT2}* マウスを作製した (図 1A)。*Acan^{flx/flx}* マウスはケンブリッジ大学の James Fawcett 教授、*ROSA26-Cre^{ERT2}* マウスはマサチューセッツ工科大学の Tyler Jacks 教授より供与頂いた。*Acan^{flx/flx}; ROSA26-Cre^{ERT2}* マウスにタモキシフェン (TAM) (20 µg/day) を出生後 7 日目 (P7) から 5 日間連続で腹腔内投与し (以下、*Acan^{Rosa26}^{-/-}* マウス)、P14, P21 および P56 で解析した (図 1B)。対照として、*ROSA26-Cre^{ERT2}* 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。すべての動物実験は岡山大学動物実験委員会の承認 (OKU-2015636,

OKU-2016008, OKU-2018811)のもと実施した。

2. DNA の抽出および PCR 法

マウスの尻尾を約 1 mm 切除し, REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (SLBT8193, SIGMA, MO, USA)を用いて genomic DNA を抽出し PCR を行った。*Acan^{flox/flox}*マウスの遺伝子型解析には, 表 1 に示すプライマーを用いて, タッチダウン PCR 法を用いた。具体的には, 95°C 3 分間の鋳型 DNA の熱変性後, 95°C 1 分間の熱変性, X°C 1 分間のアニーリング (X = 68, 66, 64, 62, 60, 58, 56, 54, 52, 50°C), 72°C 1 分間の伸長反応を 2 サイクルずつ行い, その後 94°C 30 秒, 48°C 30 秒, 72°C 30 秒を 20 サイクル行った。PCR 産物はアガロースゲルにて電気泳動後, ゲル撮影装置 (AE-6915, ATTO, 東京, 日本)にて DNA を観察した。

3. RNA の抽出・精製および定量性 RT-PCR 法

P14 マウスの肋軟骨を採取し, PowerMasher II (Nippi, 東京, 日本)および BioMasher II (Nippi)を用いて懸濁した。懸濁後, TRIzol® Reagent (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)を用いて全 RNA を抽出し, PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies)を用いて精製した。RNA サンプルを iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて逆転写し, KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS, Wilmington, MA, USA)および CFX96 real-time system (Bio-Rad)を用いて定量性 RT-PCR を行い, 標的遺伝子の発現を定量した。内部標準遺伝子としてとしてリボソーム小サブユニットタンパク質 29 (*Rps29*)を使用した。解析対象遺伝子およびプライマーの塩基配列を表 1 に示す。

表 1.

Target gene	Type	Primer set (5'-3')	Experiment
<i>Acan Exon3</i>	mouse	ATTAGAAGGCCTGGAGTGACAA	genotyping
<i>Acan Exon5</i>		TGGCGAGCTCAGACCATAAC	
<i>Acan Exon4</i>	mouse	GCTACACCCTGGACTTTG GTGGAAGCCATCCTCATAG	定量性 RT-PCR
<i>Rps29</i>	mouse	GGAGTCACCCACGGAAGTTCGG GGAAGCACTGGCGGCACATG	定量性 RT-PCR
<i>Sox9</i>	mouse	ACGGCTCCAGCAAGAACAAG TTGTGCAGATGCGGGTACTG	定量性 RT-PCR
<i>Col2a1</i>	mouse	GTCAATAATGGGAAGGCGGGAGG CGAGGGCAACAGCAGGTTACATAC	定量性 RT-PCR
<i>Col10a1</i>	mouse	TGCTGCCTCAAATACCCTTTCT TGGCGTATGGGATGAAGTATTG	定量性 RT-PCR

4. マイクロ CT 解析

マウスの全身 CT 撮影には岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門鹿田施設に設置されている実験動物用 X 線 CT 装置 (Latheta LCT200, HITACHI, 東京, 日本) を用いてスキャンを行い, 標準の解析ソフトウェアを用いて立体構築した。マウス大腿骨は, SkyScan-1174 micro-computed tomography (micro-CT; SkyScan, Aartselaar, Belgium) を用いて解像度を 6.4 μm にて撮影し, SkyScan 社製ソフトウェアを用いて解析した。大腿骨の長さについては, 大腿骨の遠位端から骨頭部までの長さを測定した。皮質骨の解析としては, 大腿骨の中央部を 0.5 mm の範囲で抽出し, 皮質骨断面の表面積および厚みについて測定した。海綿骨の解析としては, 大腿骨遠位端の成長板から 0.5 mm から 1 mm 下部の骨髄内の骨密度 (Bone Mineral Density; BMD), 海綿骨体積率 (Bone Volume/Tissue Volume; BV/TV), 骨梁間隔 (Trabecular Separation; Tb.Sp), 骨梁数 (Trabecular Number; Tb.N), 骨梁幅 (Trabecular Thickness; Tb.Th) を測定した。

5. HE 染色およびサフラニン O 染色

大腿骨試料を 4% paraformaldehyde (PFA) で固定し, モールス溶液 (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を用いて室温で 7 日間脱灰した。脱灰した試料を通法に従いパラフィン包埋し, ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色) およびサフラニン O 染色を行い, BZ-700 顕微鏡 (Keyence, 大阪, 日本) にて観察した。

6. 免疫組織化学 (IHC) および TUNEL 染色

標本は凍結包埋し, 川本法にて凍結切片を作製した¹³⁾。具体的には試料を cryoembedding medium (SECTION-LAB Co. Ltd, 広島, 日本) を用いて凍結包埋し, 包埋試料の表面に専用の粘着フィルムを貼付し, タングステンカーバイドナイフにて 5 μm 厚の切片を作製した。aggrecan および II 型コラーゲンの IHC 染色用切片は, 70%エタノールで 10 秒間洗浄し, 4%PFA で 20 分間固定した。固定した切片は 0.1 U/mL Chondroitinase ABC (Millipore, Temecula, CA, USA) 処理し, 1% bovine serum albumin (SIGMA) を含む 5% normal goat serum (Life TechnologiesTM) にて室温で 60 分ブロッキングした。一次抗体は Rabbit anti-Aggregan Antibody (Millipore) および Mouse anti-Collagen Type II Antibody (Millipore) を用いて, 4°Cで一晩反応させた。Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の IHC 染色用切片は, 試料を 100%メタノールにて室温で一晩処理し, ブロッキングした後, 一次抗体として, Mouse anti-PCNA antibody (Cell Signaling Technology,

Danvers, MA, USA) を用いて 4°Cで一晩反応させた。洗浄後, 切片を Alex Fluor® 546 goat anti-mouse IgG [H+L] (Life Technologies™) もしくは Alex Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG [H+L] (Life Technologies™) を用いて室温で 60 分間反応させた。細胞死の解析は, TUNEL アッセイキットを用い, プロトコールに従い染色を行なった (Promega, Madison, USA)。全ての画像は, BZ-700 顕微鏡 (Keyence, 大阪, 日本) にて撮影した。

7. 軟骨細胞の培養

Acan^{fllox/fllox}; ROSA26-Cre^{ERT2} マウスから肋軟骨を採取し, 37°Cにて 7 時間 30 分間, コラゲナーゼ (Worthington Biochemical Corporation, USA) を用いて酵素処理を行い, 軟骨細胞を単離した。単離した軟骨細胞は, 24 well plate に播種し (1.6×10⁵ 個/well), 10% ウシ胎児血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific), 100 units/mL penicillin (SIGMA, St. Louis, MO, USA) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, high glucose, Thermo Fisher Scientific)を用いて, 37 °C, 5 % CO₂ 気相下で培養した。播種 3 日目に 1.0 mM の 4-hydroxytamoxifen (4-OHT; SIGMA) を添加した。対照群には, 4-OHT の溶媒である同濃度のエタノールを添加した。播種後, 3 日, 7 日後にサンプルを回収し, Alcian Blue 染色および定量性 RT-PCR 法にて解析を行なった。解析対象遺伝子およびプライマーの塩基配列を表 1 に示す。内部標準遺伝子としてリボソーム小サブユニットタンパク質 29 (*Rps29*) を使用した。

8. 統計解析

定量実験から得られた結果を平均値±標準偏差として報告する。統計分析は, 一元配置分散分析 (one-way factorial ANOVA), 次いで Tukey の多重比較検定, もしくは, 対応のない t 検定を用いた。

結果

1. *Acan^{Rosa26}^{-/-}* マウスの作製および *Acan* の消失の確認

出生後の骨の発達における aggrecan の役割を明らかにすることを目的に, *Acan^{fllox/fllox}; ROSA26-Cre^{ERT2}* マウスに TAM を P7 から 5 日間連続で腹腔内投与し, 時期特異的 *Acan* 全身ノックアウトマウス (以下, *Acan^{Rosa26}^{-/-}* マウス) を作製した (図 1)。初めに, Cre-LoxP システムが機能しているかを確認するため, TAM 投与前後のマウス尻尾から genomic DNA を抽出し, PCR 解

析を行なった。プライマーのデザインを図 1A に示す。その結果、TAM 投与前の DNA では 1148bp のバンドが検出されたが、投与後の DNA では *Exon4* を含む *LoxP* に挟まれた部位が消失した 265bp のバンドのみが検出された (図 2A)。次に、対照マウスおよび *Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスの剣状突起軟骨から抽出した RNA を用いて、定量性 RT-PCR 解析を行った。また、*Acan* を検出するのに、*Exon4* 内にデザインしたプライマーを用いた。その結果、*Acan* の発現は *Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスの剣状突起軟骨において検出されなかった (図 2B)。以上より、生後 7 日目から TAM の 5 日間連続投与により、*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が確認された。

2. タモキシフェン投与後の体重変化およびマイクロ CT 解析

次に、生後 7 日目から TAM を 5 日間連続投与した *Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスの体重を経時的に計測した。その結果、タモキシフェンを投与した対照マウスでは、投与前と比較し体重の増大を認めたが、*Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスでは、タモキシフェン投与前と比較し大きな体重増加を認めず、P21、P56 において、対照マウスと比較し、体重は有意に低下していた (図 2C)。また、図 2D と図 2E に野生型マウスと *Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスの全身の写真および全身マイクロ CT 解析の結果をそれぞれ示す。対照マウスと比較し、*Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスにおいて成長不良が観察され、四肢の長管骨や椎骨の著明な短縮のみならず、頭蓋骨の形成抑制が確認された。

3. マウスの大腿骨のマイクロ CT 解析

次に、マイクロ CT を用いて大腿骨の詳細な解析を行った。大腿骨の 3D 画像および大腿骨の長さのグラフをそれぞれ図 3A, 3B に示す。P21 において、*Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスの大腿骨長は、対照マウスと比較し 27.3%短縮していた。また、対照マウスでは P21 から P56 で大腿骨長は 1.4 倍に成長したが、*Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスでは長軸方向の有意な成長は確認されなかった。大腿骨の皮質骨のマイクロ CT 解析の結果を図 4 に示す。P21 の両マウス間において、皮質骨断面の表面積および厚み共に有意な差は認めなかった。一方、P56 のマウスにおいて、皮質骨断面の表面積は *Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスにおいて有意に小さかったが、皮質骨断面の厚みに有意差は認められなかった。大腿骨の海綿骨のマイクロ CT 解析の結果を図 5 に示す。*Acan* *Rosa26*^{-/-}マウス大腿骨の海綿骨は、P21、P56 マウス共にほぼ観察されなかった。対照マウスと比較し *Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスにおいて、骨密度、骨量体積率、骨梁の厚さ、骨梁の数は有意に減少し、骨梁の間隔の有意に増加した (図 5C, D)。

4. *Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスの大腿骨の組織学的解析

HE染色の結果を図6A, 6Bに示す。P21およびP56の両群ともに*Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスの大腿骨成長板における層構造及びカラム構造に異常が観察され、増殖軟骨細胞層では細胞数が減少している像が観察された。サフラニンO染色は、コンドロイチン硫酸を選択的に染色する染色方法であるが、P21の*Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスにおけるサフラニンO陽性のコンドロイチン硫酸量は減少傾向を示し、P56において劇的な減少を示した(図6C, 6D)。また、ACANのIHCの解析結果を図6E, 6Fに示すが、増殖軟骨細胞層におけるACANの発現は、TAM投与14日後(P21)では減少し、TAM投与49日後(P56)にはほぼ完全に消失していることが確認された。一方、*Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスにおける大腿骨成長板中のII型コラーゲンの発現は、対照マウスのもものと比較し大きな差は認めなかったが、発現パターンは、成長板の層構造及びカラム構造の異常により劇的に変化した(図6G, 6H)。次に、成長板の細胞増殖および細胞死について解析を行なった。細胞増殖のマーカーであるPCNAのIHCの結果、*Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスの成長板におけるPCNA陽性細胞数は明らかに減少していた(図7A)。また、TUNEL染色の結果、*Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスの成長板の細胞のTUNEL陽性細胞数が増加していた(図7B)。つまり、aggrecanの消失によって増殖軟骨細胞数の低下およびアポトーシスの亢進が生じていることが確認された。

5. *In vitro*におけるaggrecanの消失が軟骨細胞分化に与える影響

軟骨細胞分化におけるaggrecanの役割を細胞レベルにて解析するため、生後1-2日の*Acan*^{flx/flx}; *ROSA26-Cre*^{ERT2}マウス肋軟骨から軟骨細胞を単離、培養し、培養開始3日目に4-OHTを投与し、aggrecanの発現をノックアウトした(図8A)。培養開始10日目の*Acan* (*Exon4*)の遺伝子発現量は、4-OHT投与により、有意に抑制されていた(図8C)。また、4-OHT投与により、Alcian Blue染色の染色性は低下し、軟骨細胞の分化が抑制されていることが確認された(図8B)。また、軟骨細胞分化関連遺伝子の発現解析を行なった結果、肥大軟骨細胞のマーカーであるX型コラーゲンα1 (*Col10a1*)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α1 (*Col2a1*)の発現に有意な変化は認めなかった(図8C)。

考察

本研究では、出生後の長管骨の成長におけるaggrecanの役割を解明することを目的に、TAM誘

導性時期特異的 *Acan* 全身欠損マウス, *Acan^{flox/flox}; ROSA26-Cre^{ERT2}* マウスを作製し解析した。その結果, 出生後の *aggrecan* の消失により, 大腿骨成長板のカラム構造に乱れが生じ, 増殖軟骨細胞の減少およびアポトーシスの亢進により, 骨格成長に重大な欠陥を引き起こすことが明らかとなった。

プロテオグリカンは, 組織発生の初期から発現し, 組織および細胞を支持する足場として重要な役割を果たすだけでなく, シグナル伝達分子および成長因子と結合することによって組織発生を調節していることが知られている^{24,25)}。中でも, *aggrecan* は 3 つの球状ドメイン (G1,G2,G3) と 2 つの糖鎖結合領域 (KS および CS 鎖) から構成され, 特に G2 ドメインと G3 ドメインとの間に, 約 100 本の CS 鎖が結合する糖鎖結合領域を持つ, CS および KS によって修飾を受けているプロテオグリカンである。骨格の発生における *aggrecan* の重要性は既実証されており, 軟骨組織中において, 軟骨細胞の細胞接着や増殖, 分化において重要な役割を担っていること^{12,18,26)} 自然発症型 *Acan* 変異マウスである *cmd* マウスは重度の骨格形成不全を示すことが報告されてきた^{9,10)}。さらに, Lauing らは, *Col2a1* プロモーターの制御下でニワトリ *Acan* の発現を誘導することが可能なトランスジェニックマウスと交配し, *cmd* マウスにおける *aggrecan* の発現をレスキューすることで, *cmd* マウスの骨格における表現型が部分的に回復することを報告している²⁰⁾。しかし, これらの報告は全て胎生期のマウスを用いたものであり, *cmd* マウスが出生直後致死であるため, 出生後の骨格発生における *aggrecan* の役割は不明であった。本研究では, TAM 誘導性時期特異的 *Acan* 全身欠損マウスを作製し, 生後の成長における *aggrecan* の機能解析を行なった。その結果, TAM に投与により *aggrecan* を消失させて以降, 骨格形成が著しく抑制された (図 1E)。また, 大腿骨の詳細な解析から, *aggrecan* の消失により, 大腿骨の長軸方向の成長および海綿骨形成がほぼ完全に抑制されたが (図 3, 5), 皮質骨の厚みは, 対照マウスと同様, 成長と共に増加したことから (図 4), *aggrecan* は成体マウスの大腿骨の長軸方向の成長に強く関与しているが, 大腿骨皮質骨の形成には関与していないことが明らかとなった。また, 組織学的解析の結果から, *aggrecan* の消失により, 大腿骨成長板の層構造及びカラム構造に異常をきたしていることが確認された (図 6)。今回の研究結果において海綿骨形成が完全に抑制されたことは, *aggrecan* の消失により, 増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化が抑制されることで大腿骨成長板の層構造及びカラム構造に異常をきたすことで, 間接的に骨芽細胞へ影響を与えたと考えられる。本表現型は, *cmd* マウスを用いた胎生期の解析結果と類似しており¹⁰⁾, 骨格の発生初期からのみならず, 骨格の発生途中において *aggrecan* が消失することで, 長管骨の成長に大きな支障をきたすことが明らかとなった。また, 一般的に, ある遺伝子の発現が抑制されると, それに類似した機能を有する遺伝子によりその機能が補われるこ

とが知られており、軟骨における他の主要な細胞外マトリックスにおける影響についてすでに検証されている²⁷⁾。そこで、aggrecan 同様、軟骨 ECM の主要な構成成分である II 型コラーゲンの発現解析を行なった。しかし、*in vitro*, *in vivo* 実験結果から、aggrecan の消失により、II 型コラーゲンの発現に変化は認めなかった (図 6, 図 8)。その為、aggrecan と II 型コラーゲンは軟骨細胞分化においてお互いを補うことができない異なる役割を担っている可能性が示唆される。

組織中の ECM は、様々な成長因子として結合しそれらの貯蔵庫として働くことで、発生や恒常性の維持に関わっていることが知られている^{28,29)}。例えば、骨において biglycan や decorin³⁰⁾ といったプロテオグリカンは、骨格形成において重要な役割を担っている TGF- β 1 と結合することで³¹⁾, *in vitro*, *in vivo* において TGF- β /Smad シグナル経路を介して細胞増殖, 分化およびアポトーシスの調節に関与していることが報告されている^{27,31)}。実際、aggrecan の発現を抑制した軟骨細胞を TGF- β 3 にて刺激した結果、Smad2/3 のリン酸化が抑制されるという結果が得られている (データは示していない)。本結果およびこれまでの報告から、軟骨細胞分化過程において aggrecan が消失することで、TGF- β 3 といった軟骨細胞分化に関わる成長因子との親和性が低下し、その結果、軟骨細胞分化が抑制された可能性が推測されるが、その詳細なメカニズムは未だ不明であり、さらなる解析が必要不可欠である。

一方、ヒトにおいては、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た結果、低身長といった重度な骨格症状を呈する疾患が引き起こされる^{13,14,16,17)}。ヒト ACAN の Exon12 は糖鎖結合領域にあたり、この変異により CS 鎖の減少が生じ、骨格に表現型を示した可能性が考えられる。Sato らは、コンドロイチン硫酸鎖の生合成の開始反応を担う酵素の一つであるコンドロイチン硫酸 N-アセチルガラクトサミン転移酵素-1 遺伝子の欠損マウスを作製し、CS 鎖の消失が長管骨の発生に与える影響を検討した。その結果、軟骨の CS 鎖含有量は半分に低下し、出生後の長管骨成長板のカラム構造に異常が生じ、四肢が短縮することを報告している²⁶⁾。本結果は、我々のマウスと類似した表現型を示しており、aggrecan と結合している様々な分子が間接的に作用することで、骨格形成に関与している可能性が推測される。今後は、ヒトの疾患と同じ部位に変異が入った、ヒト 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 の CS 鎖が骨格形成に与える影響および、その病態の発症メカニズムを分子生物学的手法を用い明らかにする予定である。

結論

1. 時期特異的 *Acan* 全身ノックアウトマウス, *Acan^{flox/flox}; ROSA26-Cre^{ERT2}* マウスを作製し, TAM 投与により mRNA レベル, タンパク質レベルで目的の遺伝子が消失している事を確認した。
2. 同マウスを用いて出生初期の *Acan* の欠損が骨・軟骨の成長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ほぼ完全に抑制された。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。

謝辞

稿を終えるにあたり, 懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野 上岡寛教授, 分子医化学分野 大橋俊孝教授に心より感謝の意を表します。また, 研究を遂行するに当たり, *Acan^{flox/flox}* マウスを供与頂いたケンブリッジ大学の James Fawcett 教授, *ROSA26-Cre^{ERT2}* マウスを供与頂いたマサチューセッツ工科大学の Tyler Jacks 教授, および, 終始御指導, 御鞭撻を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科分子医化学分野大野充昭助教に謹んで感謝の意を表します。さらに, 本研究を行うにあたり, 多くの貴重な御援助と御協力をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野, 分子医化学分野, 組織修復学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野 (主任: 上岡寛教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科分子医化学分野 (委託: 大橋俊孝教授)

本論文の一部は, 以下の学会において発表した。

第 50 回日本結合組織学会学術大会 (2018 年 6 月, 福岡)

第 77 回日本矯正歯科学会大会 (2018 年 10 月, 横浜)

図の説明

図 1. TAM 誘導性 *Acan* 全身欠損マウスの作製

(A) TAM 投与における Cre/LoxP による *Acan* のノックアウトの模式図を示す。*Acan* 遺伝子座の *Exon4* を挟む形で LoxP 配列 (▶) が挿入されている。(B) *Acan^{flx/flx}; ROSA-Cre^{ERT2}* マウスへの TAM 投与方法および解析の概要を示す。また、TAM を投与した *Acan^{+/+}; ROSA-Cre^{ERT2}* マウスを対照マウスとして使用した。

図 2. TAM 誘導性 *Acan* 全身欠損マウスの遺伝子型解析および表現型解析

(A) TAM 投与前後のマウス尻尾から genomic DNA を回収し、図 1A に示すプライマーを用いて PCR 解析を行った。アガロース電気泳動の画像を示す。(B) TAM 投与前後の剣状突起から mRNA を回収し、*Acan* の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR にて解析した結果をグラフに示す。実験は 3 回以上繰り返し同様の結果が得られたので、代表的な結果を示す。(C) TAM 投与前 (P7), 投与 14 日目 (P21), 投与 49 日目 (P56) の雄の体重の平均値±標準偏差をグラフに示す。(対応のない t 検定, **p < 0.01; ***p < 0.001)。(D) *Acan^{Rosa26^{-/-}}* マウスおよび野生型マウスの全身像の代表的な写真を示す。(E) *Acan^{Rosa26^{-/-}}* マウスおよび対照マウスの全身 CT の 3D 画像解析の代表的な画像を示す。

図 3. TAM 誘導性 *Acan* 全身欠損マウスの大腿骨長のマイクロ CT 解析

(A) *Acan^{Rosa26^{-/-}}* マウスおよび対照マウス大腿骨の全長の 3D 画像解析の代表的画像を示す。(B) *Acan^{Rosa26^{-/-}}* マウスおよび対照マウス大腿骨長の平均値±標準偏差をグラフに示す。(n=4, one-way factorial ANOVA / Tukey, **p < 0.01; ***p < 0.001)。

図 4. TAM 誘導性 *Acan* 全身欠損マウスの大腿骨皮質骨のマイクロ CT 解析

(A) *Acan^{Rosa26^{-/-}}* マウスおよび対照マウス大腿骨中央部の 0.5mm スライス幅の皮質骨の 3D 画像解析の代表的画像を示す。(B, C) (A) で示す範囲の大腿骨の皮質骨の厚さ (C.Th.) および、断面積 (CSA) の平均値±標準偏差をそれぞれグラフに示す。(n=4, one-way factorial ANOVA / Tukey, **p < 0.01; ***p < 0.001)。

図 5. TAM 誘導性 *Acan* 全身欠損マウスの大腿骨海綿骨のマイクロ CT 解析

(A, B) P21 および P56 の *Acan^{Rosa26^{-/-}}* マウスおよび対照マウス大腿骨の 2D 画像解析の代表的画像を上段に、海綿骨の 3D 画像解析の代表的画像を下段に示す。(C, D) それぞれのマウスの海綿骨の

骨密度 (BMD), 骨量体積率 (BV/TV), 骨梁数 (Tb.No), 骨梁の厚さ (Tb.Th.) および骨梁間隔 (Tb.Sp.) の平均値±標準偏差をグラフに示す。(n=4, 対応のない t 検定, **p <0.01; ***p <0.001)。

図 6. TAM 誘導性 *Acan* 全身欠損マウス大腿骨の組織学的解析

(A, B) P21 および P56 の *Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスおよび対照マウス大腿骨の膝関節部の HE 染色像を示す。(C, D) サフラニン O 染色像を示す。(E, F) ACAN の免疫組織化学染色像を示す。(G, H) II 型コラーゲンの免疫組織化学染色像を示す。また, 全画像は, 下段に上段の画像の高倍率画像を示す。実験は少なくとも 3 回以上繰り返し同様の結果が得られたため, 代表的な結果を示す。

図 7. TAM 誘導性 *Acan* 全身欠損マウス大腿骨成長板の細胞増殖および細胞死の解析

(A) P21 の *Acan* *Rosa26*^{-/-}マウスおよび対照マウスの大腿骨成長板の PCNA の免疫組織化学染色像を示す。(B) TUNEL 染色像を示す。実験は 2 回繰り返し同様の結果が得られたため, 代表的な結果を示す。

図 8. *In vitro* における *Acan* の消失が軟骨細胞分化に与える影響の検討

生後 1-2 日の *Acan*^{flx/flx}; *ROSA26-Cre*^{ERT2}マウス肋軟骨から単離した軟骨細胞を 1.0 mM の 4-OHT にて処理し培養した。(A) 解析方法の概要を示す。(B) 培養開始 6 日後の Alcian Blue 染色の結果を示す。(C) *Acan* (*Exon4*), *Sox9*, *Col2a1*, *Col10a1* の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR にて解析した。実験は 6 回繰り返し, その平均値±標準偏差をグラフに示す。(n=6, 対応のない t 検定, *p <0.05; **p <0.01)

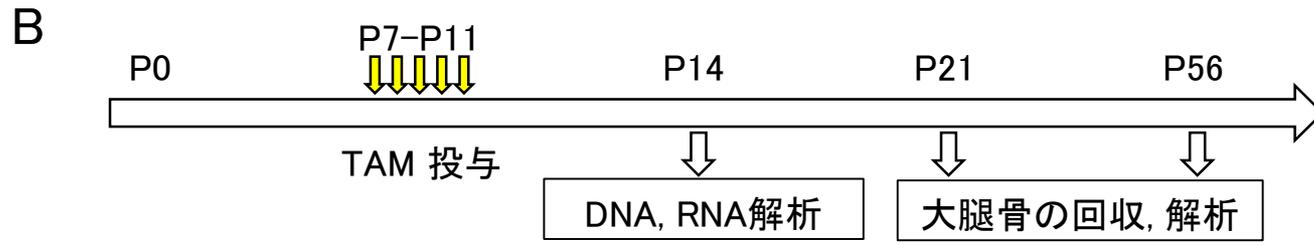
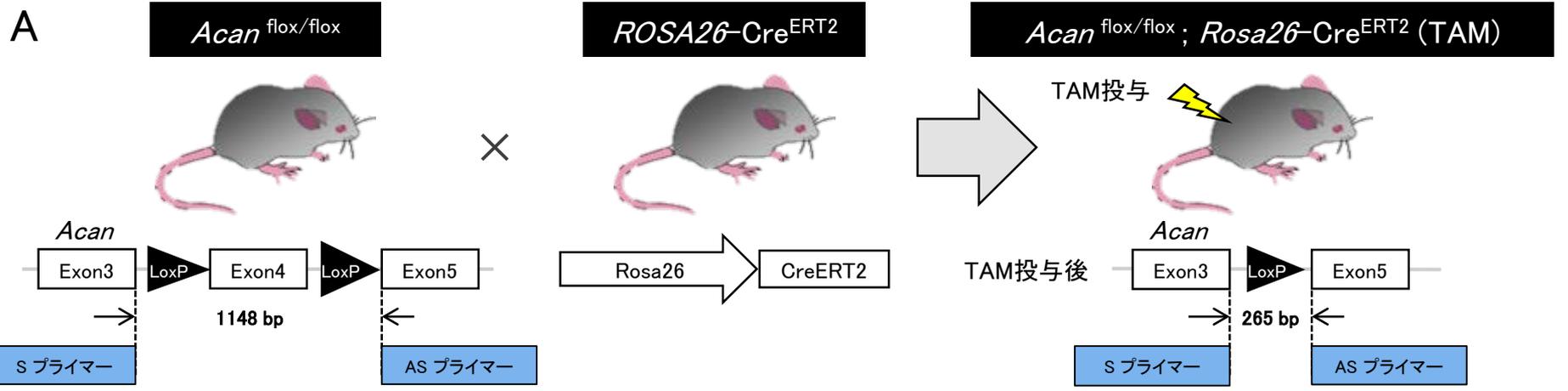
参考文献

1. White, A., Wallis, G.: Endochondral ossification : a delicate balance between growth and mineralization. *Curr Biol*, 11, 589-591, 2001.
2. Kronenberg, H.M.: Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 423, 332-336, 2003.

3. Aghajanian P., Mohan S.: The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. *Bone Res*, 6, 19, 2018.
4. Myren, M., Kirby, D.J., Noonan, M.L., Maeda, A., Owens, RT., Ricard-Blum, S., Kram, V., Kilts, T.M., Young, M.F.: Biglycan potentially regulates angiogenesis during fracture repair by altering expression and function of endostatin. *Matrix Biol*, 52-54, 141-150, 2016.
5. Muramatsu, T.: Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem*, 132, 359-371, 2002.
6. Schaefer, L., Schaefer, R.M.: Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*, 339, 237-246, 2010.
7. Embree, M.C., Kilts, T.M., Ono, M., Inkson, C.A., Syed-Picard, F., Karsdal, M.A., Oldberg, A., Bi, Y., Young, M.F.: Biglycan and fibromodulin have essential roles in regulating chondrogenesis and extracellular matrix turnover in temporomandibular joint osteoarthritis. *Am J Pathol*, 176, 812-826, 2010.
8. Prydz, K.: Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules*, 5, 2003-2022, 2015.
9. Rittenhouse, E., Dunn, L.C., Cookingham, J., Calo, C., Spiegelman, M., Doohar, G.B., Bennett, D.: Cartilage matrix deficiency (cmd) : a new autosomal recessive lethal mutation in the mouse. *J Embryol Exp Morphol*, 43, 71-84, 1978.
10. Watanabe, H., Kimata, K., Line, S., Strong, D., Gao, L.Y., Kozak, C.A., Yamada, Y.: Mouse cartilage matrix deficiency (cmd) caused by a 7 bp deletion in the aggrecan gene. *Nat Genet*, 7, 154-157, 1994.
11. Watanabe, H., Yamada, Y., Kimata, K.: Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J Biochem*, 124, 687-693, 1998.
12. Kiani, C., Chen, L., Wu, Y.J., Yee, A.J., Yang, B.B.: Structure and function of aggrecan. *Cell Res*, 12, 19-32, 2002.
13. Eyre, S., Roby, P., Wolstencroft, K., Spreckley, K., Aspinwall, R., Bayoumi, R., Al-Gazali, L., Ramesar, R., Beighton, P., Gleghorn, L.: Wallis G, Identification of a locus for a form of spondyloepiphyseal dysplasia on chromosome 15q26.1: exclusion of aggrecan as a candidate gene. *J Med Genet*, 42, 34, 2005.

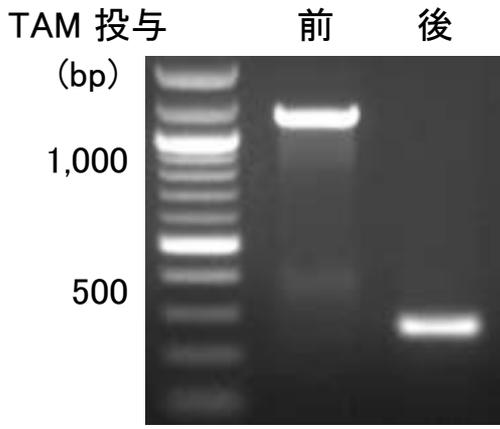
14. Gibson, B.G., Briggs, M.D.: The aggrecanopathies; an evolving phenotypic spectrum of human genetic skeletal diseases. *Orphanet J Rare Dis*, 11, 86, 2016.
15. Tompson, S.W., Merriman, B., Funari, V.A., Fresquet, M., Lachman, R.S., Rimoin, D.L., Nelson, S.F., Briggs, M.D., Cohn, D.H., Krakow, D.: A recessive skeletal dysplasia, SEMD aggrecan type, results from a missense mutation affecting the C-type lectin domain of aggrecan. *Am J Hum Genet*, 84, 72-79, 2009.
16. Henry, S.P., Liang, S., Akdemir, K.C., de Crombrughe, B.: The Postnatal Role of Sox9 in Cartilage. *J Bone Miner Res*, 27, 2511-2525, 2012.
17. Dateki, S.: ACAN mutations as a cause of familial short stature. *Clin Pediatr Endocrinol*, 26, 119-125, 2017.
18. Yang, B.B., Zhang, Y., Cao, L., Yang, B.L.: Aggrecan and link protein affect cell adhesion to culture plates and to type II collagen. *Matrix Biol*, 16, 541-561, 1998.
19. Watanabe, Y., Takeuchi, K., Higa, Onaga, S., Sato, M., Tsujita, M., Abe, M., Natsume, R., Li, M., Furuichi, T., Saeki, M., Izumikawa, T., Hasegawa, A., Yokoyama, M., Ikegawa, S., Sakimura, K., Amizuka, N., Kitagawa, H., Igarashi, M.: Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase-1 is required for normal cartilage development. *Biochem J*, 432, 47-55, 2010.
20. Lauing, K.L., Cortes, M., Domowicz, M.S., Henry, J.G., Baria, A.T., Schwartz, N.B.: Aggrecan is required for growth plate cytoarchitecture and differentiation. *Dev Biol*, 396, 224-236, 2014.
21. Taishi, K., Mitsuaki, O., Emilio, S.H., Junji, U., Ha, T.T.N., Ha, T.N., Tomoko, Y., Takahiro, M., Aya, K-O., Takeshi, T., Ryusuke, M., Kenji, M., Takuo, K & Toshitaka, O.: Type IV collagen alpha chain is a regulator of keratin 10 in keratinization of oral mucosal epithelium. *Sci Rep*, 8, 2612, 2018.
22. Rowlands, D., Lensjø, K.K., Dinh, T., Yang, S., Andrews, M.R., Hafting, T., Fyhn, M., Fawcett, J.W., Dick, G.: Aggrecan Directs Extracellular Matrix-Mediated Neuronal Plasticity. *J Neurosci*, 38, 10102-10113, 2018.
23. Brennan, M.J., Oldberg, A., Ruoslahti, E., Brown, K., Schwartz, N.: Immunological evidence for two distinct chondroitin sulfate proteoglycan core proteins: differential expression in cartilage matrix deficient mice. *Dev Biol*, 98, 139-147, 1983.

24. Cortes, M., Baria, A.T., Schwartz, N.B.: Sulfation of chondroitin sulfate proteoglycans is necessary for proper Indian hedgehog signaling in the developing growth plate. *Development*, 136, 1697-1706, 2009.
25. Ruoslahti, E., Yamaguchi, Y.: Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, 64, 867-869, 1991.
26. Wight, T.N., Kinsella, M.G., Qwarnström, E.E.: The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, 4, 793-801, 1992.
27. Bi, Y., Stuelten, C.H., Kilts, T., Wadhwa, S., Iozzo, R.V., Robey, P.G., Chen, X.D., Young, M.F.: Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*, 280, 30481-30489, 2005.
28. Jarvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., Penttinen, R.: Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 61, 198-223, 2009.
29. Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K.M.: Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 793-805, 2001.
30. Bi, Y., Ehirchiou, D., Kilts, T.M., Inkson, C.A., Embree, M.C., Sonoyama, W., Li, L., Leet, A.I., Seo, B.M., Zhang, L., Shi, S., Young, M.F.: Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*, 13, 1219-1227, 2007.
31. Moses, H.L., Yang, E.Y., Pietenpol, J.A.: TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*, 63, 245-247, 1990.

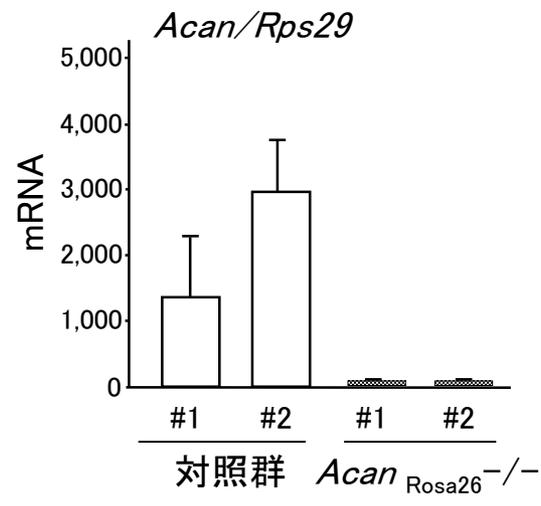


Acan^{+/+}; *ROSA-Cre*^{ERT2} (TAM) : 対照マウス
Acan^{flox/flox}; *ROSA-Cre*^{ERT2} (TAM): *Acan*_{Rosa26}^{-/-} マウス

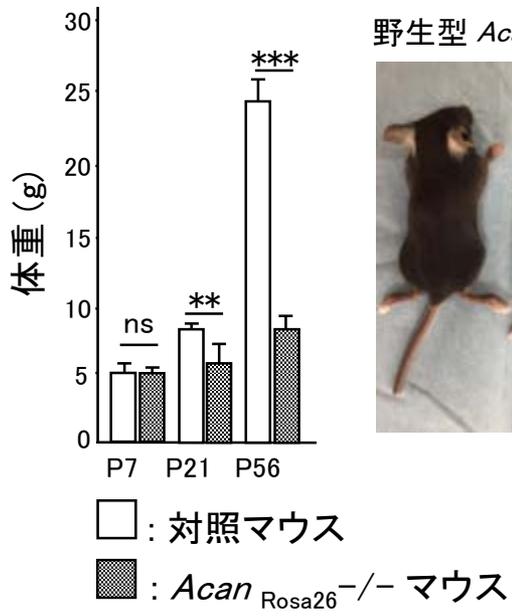
A



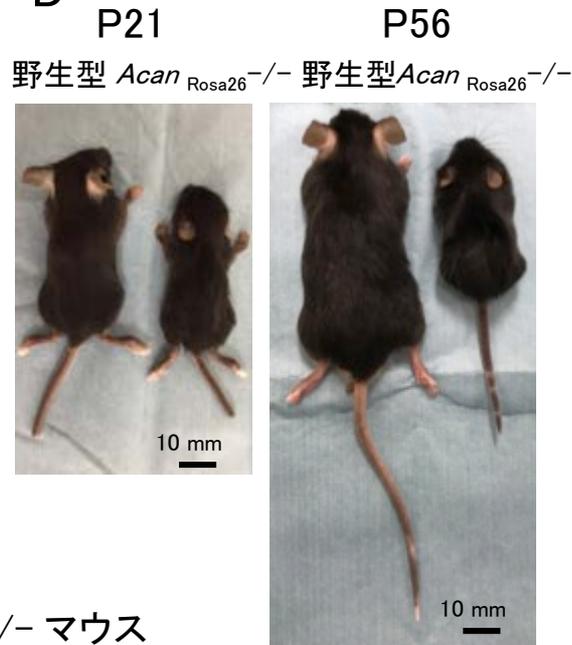
B



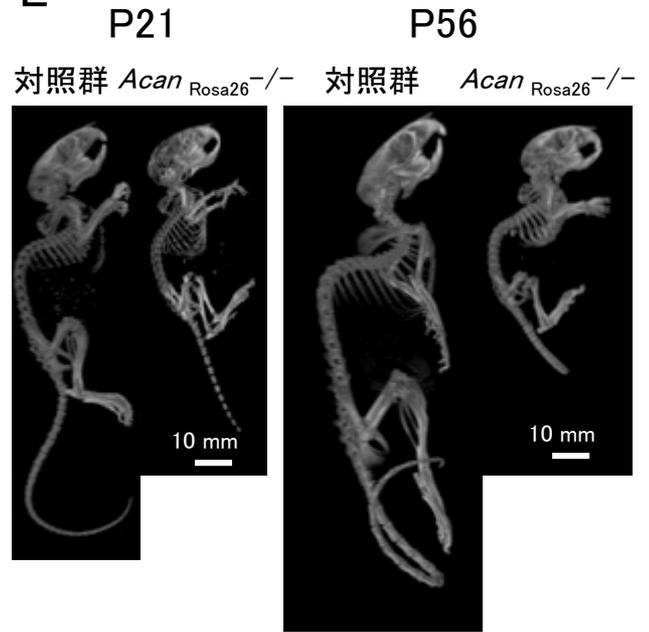
C

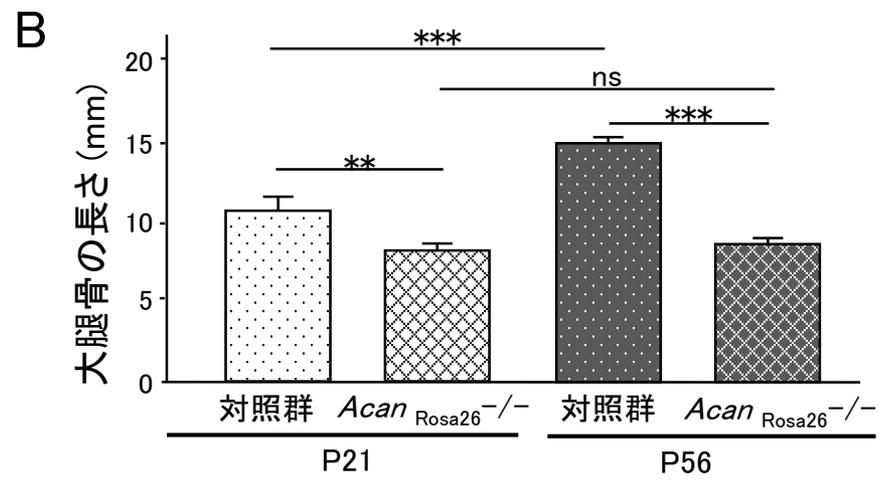
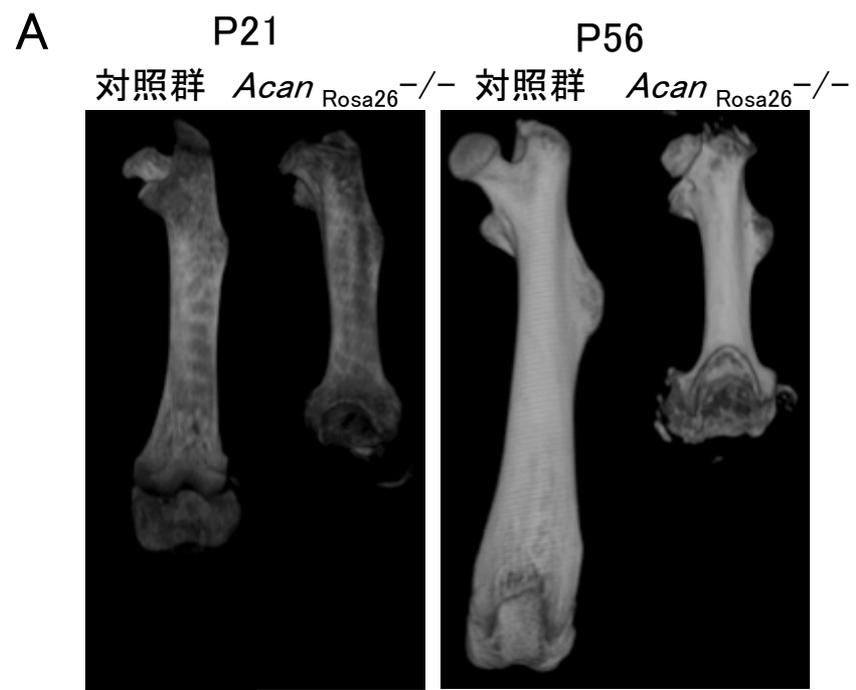


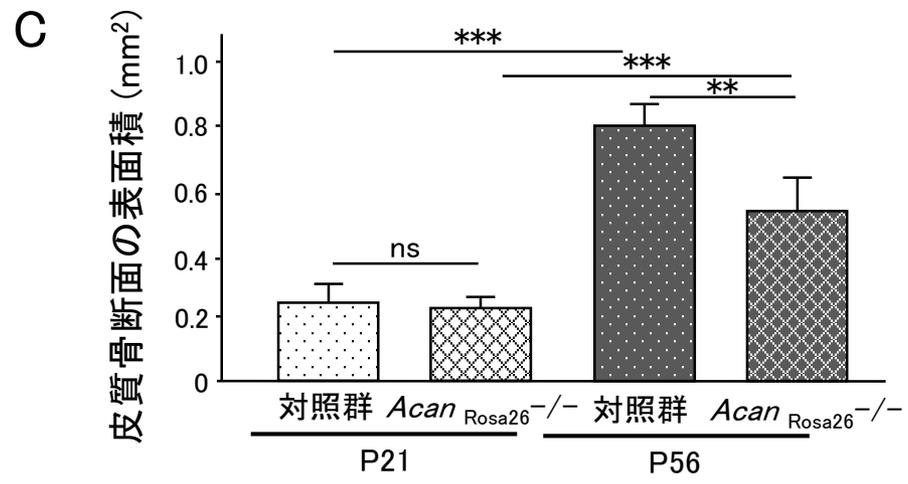
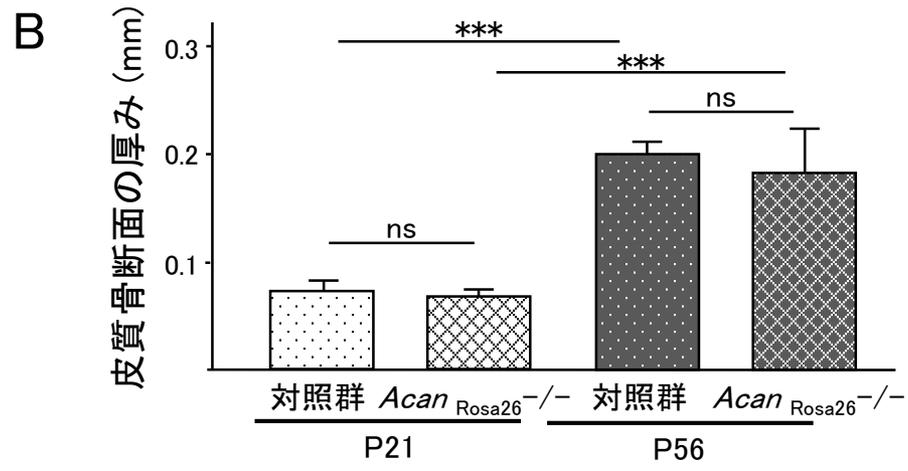
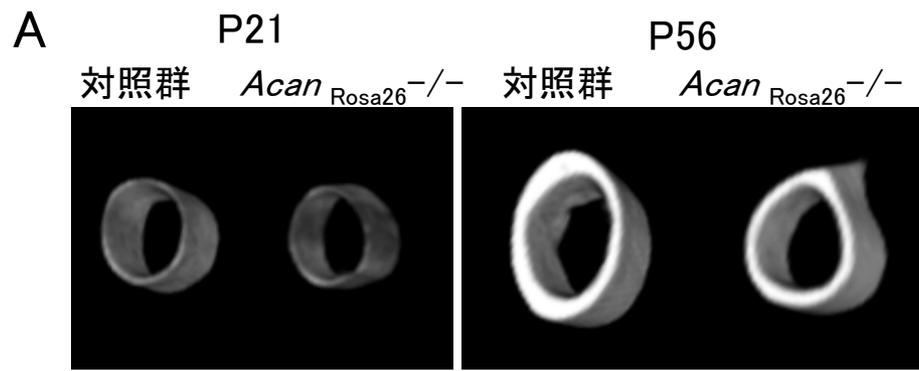
D



E







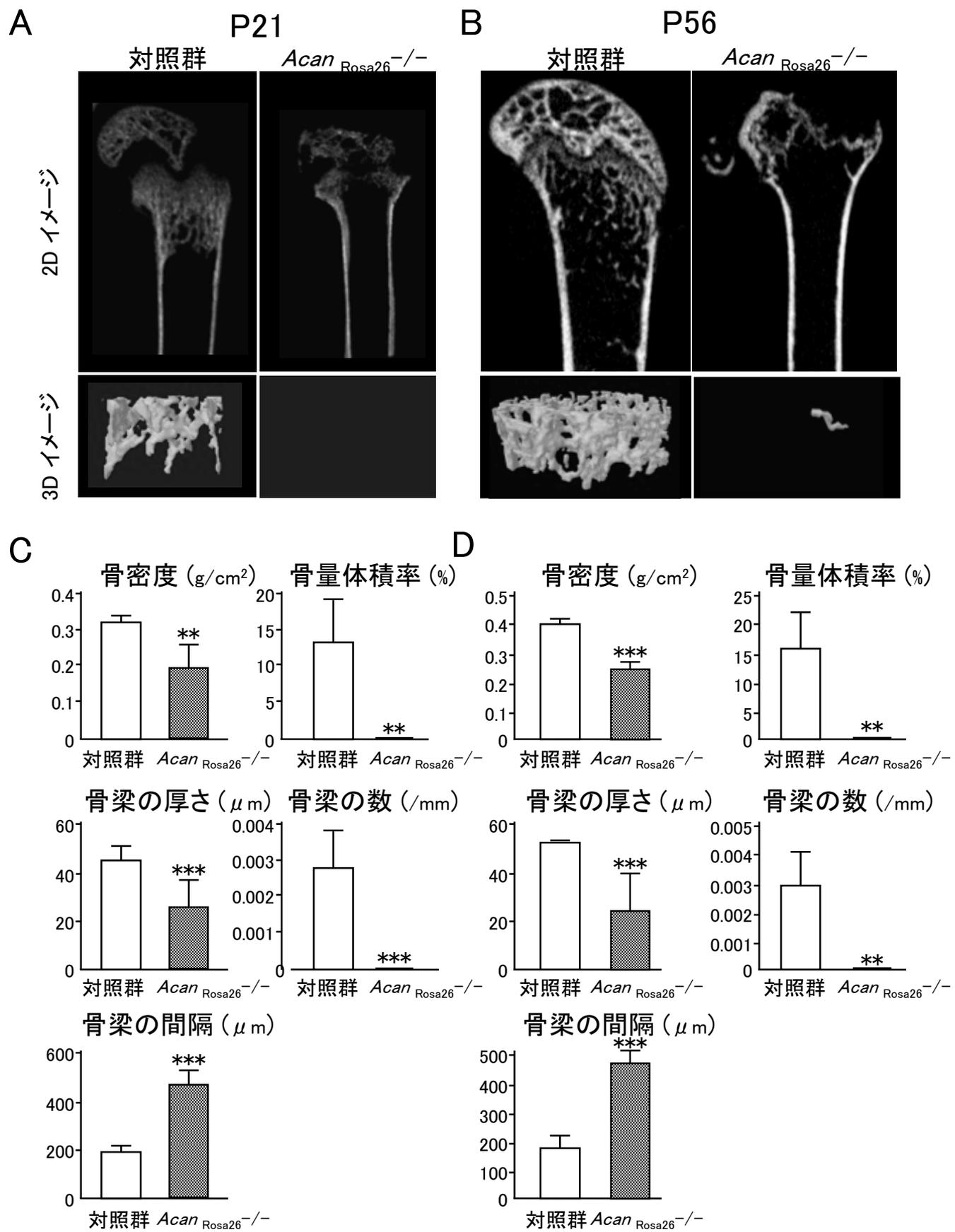


図5 鳥原秀美

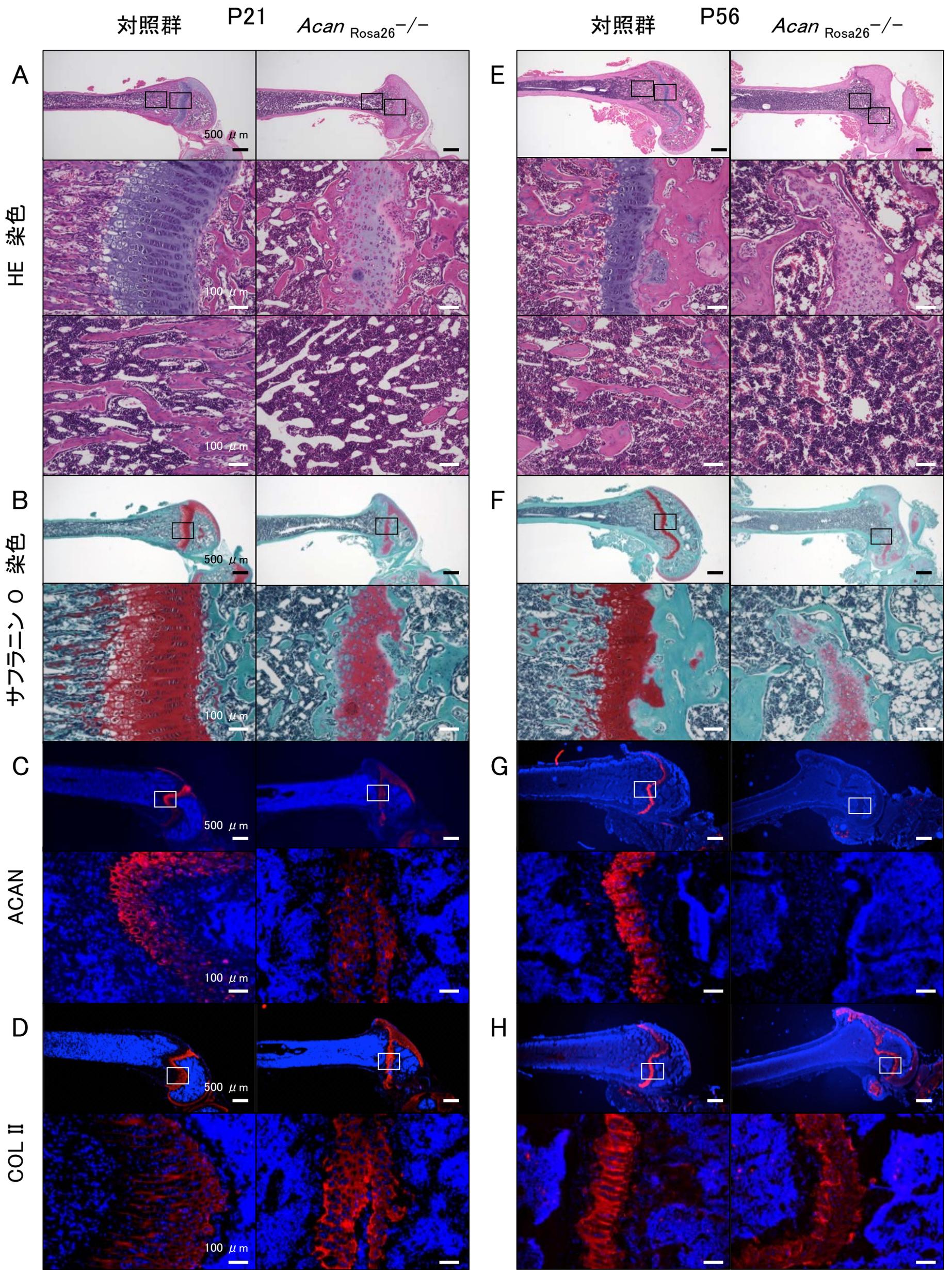


図6 鳥原秀美

