

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

アグリカン遺伝子ノックインマウスの  
作製による軟骨破壊機序の解析

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 渡辺秀人

平成15（2003）年 4月

## 目次

I. 総括研究報告書	
アグリカン遺伝子ノックインマウスの作製による軟骨破壊機序の解析	1
II. 関連研究報告	
1. p53 ノックアウトマウス由来軟骨系細胞株 N1511 の樹立と性状解析	9
2. リンク蛋白欠損マウス：ヘテロ接合体の解析	12
3. 抗デコリン抗体 6B6 の性状解析と有用性の検討	20
4. 慢性関節リウマチにおける血清由来ヒアルロン酸結合蛋白質 (serum-derived hyaluronan-binding protein, SHAP) の関与	22
III. 研究成果の刊行に関する一覧	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	26

厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)

総括研究報告書

アグリカン遺伝子ノックインマウスの作製による軟骨破壊機序の解析

渡辺秀人 (愛知医科大学分子医科学研究所助教授)

「軟骨破壊の決め手となるアグリカン IGD ドメインの分解機序を、最先端の遺伝子操作技術の駆使により同ドメインを人為的に変化させたノックインマウスモデルを用いて解明すること」を目的として、初年度(平成 12 年度)は、ターゲティングベクターの作製、相同組み替え ES 細胞クローンの樹立を行った。二年目(平成 13 年度)には同細胞クローンを用いてキメラマウスの生殖細胞への導入(germ line transmission)を試みたが、生殖細胞への導入は達成されず、平成 14 年度に引き続きおこなわれ、ようやく導入が達成された。現時点ではノックインマウスの作製の目処は立っており、大幅な遅れを余儀なくされたが本研究は目的の達成まで期間後も引き続き行う予定である。

分担研究者

木全弘治

(愛知医科大学分子医科学研究所)

#### A. 研究目的

本研究の目的は、「軟骨破壊の決め手となるアグリカン IGD ドメインの分解機序を、最先端の遺伝子操作技術の駆使により同ドメインを人為的に変化させたノックインマウスモデルを用いて解明すること」である。

慢性関節リウマチ、変形性膝関節症等の進行性関節破壊疾患に於ける最も重要な問題は関節軟骨の破壊に伴う運動機能の低下である。軟骨組織の主成分であるプロテオグリカン会合体は、水分を貯溜し硝子様形態と弾力性を軟骨に与えている。この会合体は、アグリカンのアミノ側球状

ドメイン(G1)でヒアルロン酸とリンク蛋白の両者と結合し、これら三者の結合によって会合体が安定化する(図 1)。会合体の保水作用に基づく軟骨の耐久性は、アグリカンの有する多数のコンドロイチン硫酸鎖によるものであるが、G1 ドメインに隣接する IGD ドメインの切断によって会合体の構造は破壊され、その機能は失われる。関節破壊は、蛋白分解酵素の IGD ドメイン切断による会合体構造の破壊によって進むと考えられる(図 2)。慢性関節リウマチや変形性膝関節症患者の関節液中のアグリカン分解産物の解析から、IGD 内の前半約三分の一の EGE | ARG の部位を切断する酵素の存在が提唱されていたが、近年、その酵素が A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motif, ADAMTS ) -

4、別名アグリカナーゼ1としてクローニングされた。その後の生化学的研究により、同酵素がアグリカン IGD の特異的部位の他に、その C-末端側のコンドロイチン硫酸付加ドメインの4カ所で切断することが明らかとなった。しかし、アグリカンの主たる機能は IGD より C-末端側の CS ドメインに存在するので、IGD 内の特異的部位の切断がアグリカン分解の最も重要なプロセスと考えられる。そこで私は、IGD 内のアグリカナーゼ切断部位を除去したアグリカンを産生するマウスをノックインの技法を用いて作製し、生体内における、同酵素のアグリカン代謝、および軟骨破壊性疾患における役割を明らかにする研究を立案した。

種々の蛋白分解酵素によるアグリカンの分解に関する研究はもっぱら生化学的手法によるものであった。今後、関節破壊の機序を解明するためには、生体内という統合的微小環境下における各分子の機能を解析していかなければならない。従って、最先端の遺伝子操作技術を駆使したマウスモデルを用いた解析が不可欠であると考えている。

## B. 研究方法

初年度（平成 12 年度）はノックインコンストラクトの作製、ES 細胞への同コンストラクトの導入、相同組換えを有する ES 細胞株のスクリーニング、さらにはキメラマウスの作製までを行った（図 3）。次年度（平成 13 年度）は引き続きキメラマウスの作製と生殖細胞系列への伝搬（germ line transmission）をめざした。初年度に得られた相同組換えを有する ES 細胞クローン 4 種、IGDKI-14、IGDKI-78、IGDKI-106、IGDKI-

189) のうち IGDKI-14 と IGDKI-78 を用いて胚盤胞導入法によるキメラマウスの作製を日本エスエルシー株式会社に委託した。また、これらのうち IGDKI-106 の胚盤胞導入法によるキメラマウスの作製を同様にオリエンタル酵母株式会社に委託した。

得られたマウスの遺伝子型は PCR およびサザンブロット法にて解析した。

（倫理面への配慮）

当研究施設においては、動物愛護の観点から定められている愛知医科大学動物実験センターの「動物実験のガイドライン」に則って当該研究を行った。また、委託先の日本エスエルシー株式会社は動物愛護に関する独自のガイドラインに従って実験を行っている。

## C. 研究結果

委託先の日本エスエルシーでは、まず IGDKI-14 を胚盤胞に導入しキメラマウスを作製したところ、キメラ率 70>>50%のキメラマウスが 2 匹得られた。これらのキメラマウスを C57Bl/6Cr 雌マウスと各々計 18 回と 10 回、交配したが、germ line transmission は得られなかった（表 1）。並行して IGDKI-78 の胚盤胞導入よりキメラマウスを作製したところ、キメラ率 100>>70%のキメラマウスが 3 匹、70>>50%のキメラマウスが 1 匹得られた。これらを同様に C57Bl/6Cr と交配したが germ line transmission は得られなかった（表 2）。委託先の日本エスエルシーでは、動物センター内に感染が検出され、除感染に相当の労力を費やしており、胚盤胞導入の追加依頼が難しい状況にあったので、本年度（平成 14 年度）はオリエンタル酵母株式会社に胚盤胞導入に

よるキメラマウスの作製を委託することにした。再び、上記の4クローンを再解凍し、細胞の状態を形態学的に確認し、日本エスエルシーにて高いキメラ率のマウスが得られたIGDKI-78と細胞の状態が最も良好と思われるIGDKI-189の胚盤胞導入を依頼し、ほぼ100%までのキメラマウスを得ることができた。これらのマウスとC57Bl/6マウスを交配させ、現在F1マウスの遺伝子型を解析中である。

#### D. 考察

本年度は、引き続きキメラマウスの作製を行い、germ line transmissionを試み、約100%のキメラ率を有するマウスが得られた。germ line transmissionが確認され、現在F1マウスの遺伝子を解析中である。研究計画は著しい遅延を余儀なくされたが、germ line transmissionが得られたので、以降の行程は滞りなく進めることができるものと期待している。

本研究は目的の達成まで期間後も引き続き行う予定である。

#### E. 結論

3年間の事業として立案された本研究の3年目にあたる平成14年度では、2年目に達成できなかったキメラマウスの作製と相同組み換え遺伝子の生殖細胞系列への伝搬(germ line transmission)を引き続き試みた。キメラ率ほぼ100%のマウスが得られ、germ line transmissionにも成功した。研究計画は著しい遅延を余儀なくされたが、germ line transmissionが速やかに得られたので、以降の行程は滞りなく進めることができるものと確信している。

本研究は目的の達成まで期間後も引き続き行う予定である。作製されたノックインマウスを用いた今後の研究によって、軟骨破壊機序が解明されるものと期待される。

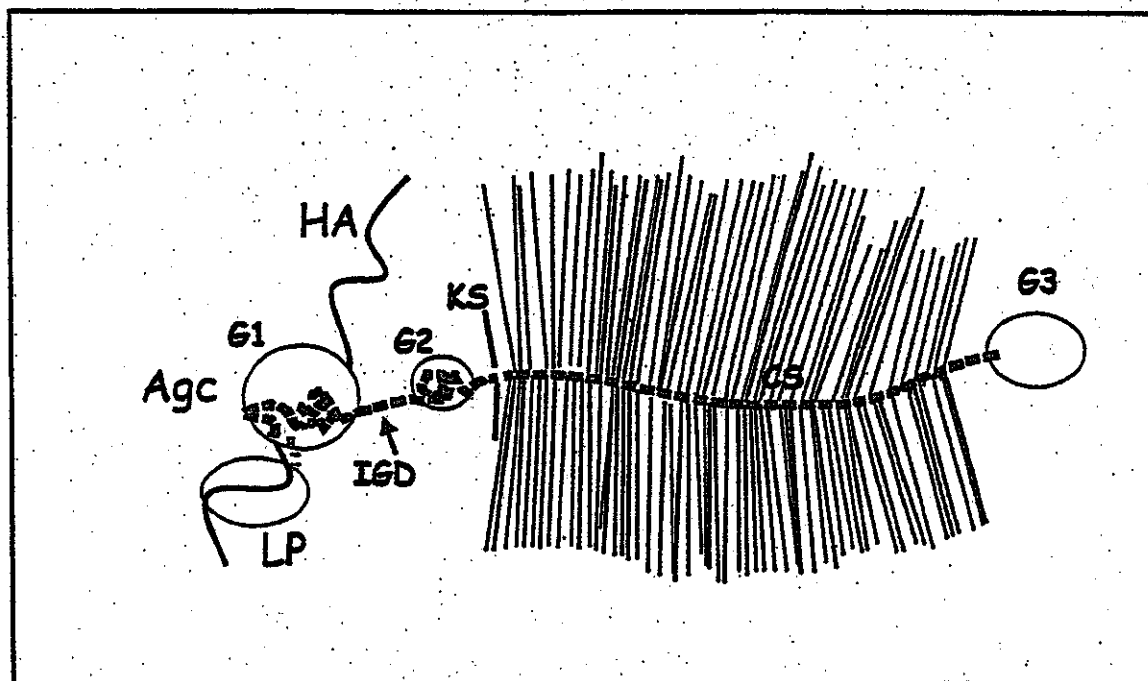


図1. プロテオグリカン会合体の模式図。 プロテオグリカン会合体はアグリカン (Agc)、リンク蛋白 (LP)、ヒアルロン酸 (HA) の三者から構成されている。アグリカンのコア蛋白は、G1, IGD, G2, KS, CS, G3等のドメインから成る。アグリカンはG1ドメインでリンク蛋白、ヒアルロン酸と結合している。CSドメインに付加する多数のコンドロイチン硫酸鎖は保水作用を通じて軟骨特有の硝子様形態と弾力性を与えている。

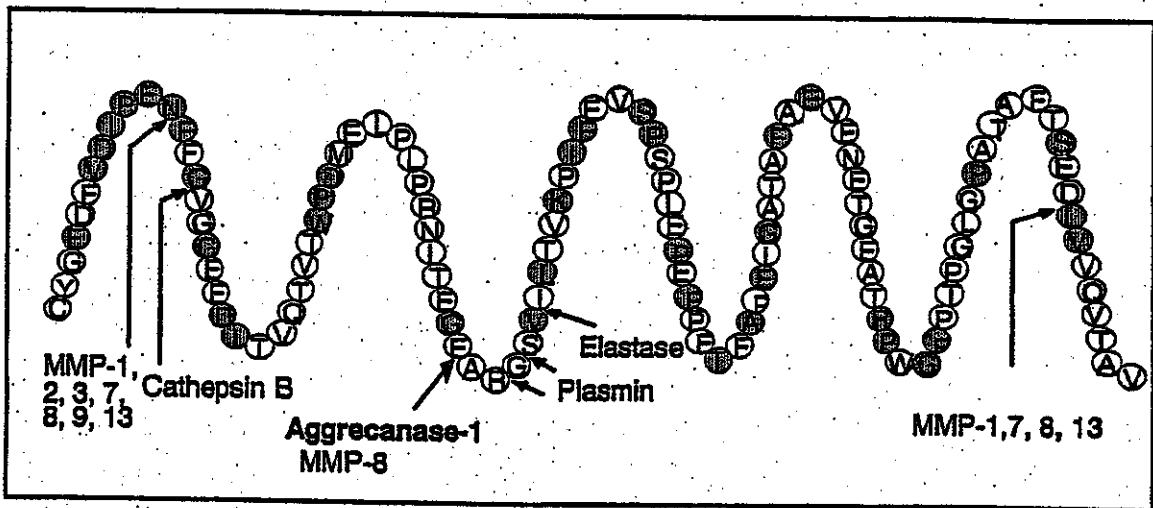


図2. Interglobular domain (IGD)のアミノ酸配列と各蛋白分解酵素による切断部位。アグリカンコア蛋白はマトリックスメタロプロティナーゼ (MMP) 群とアグリカナゼ-1によって分解される。IGD 内の各プロティナーゼによる切断部位を示す。

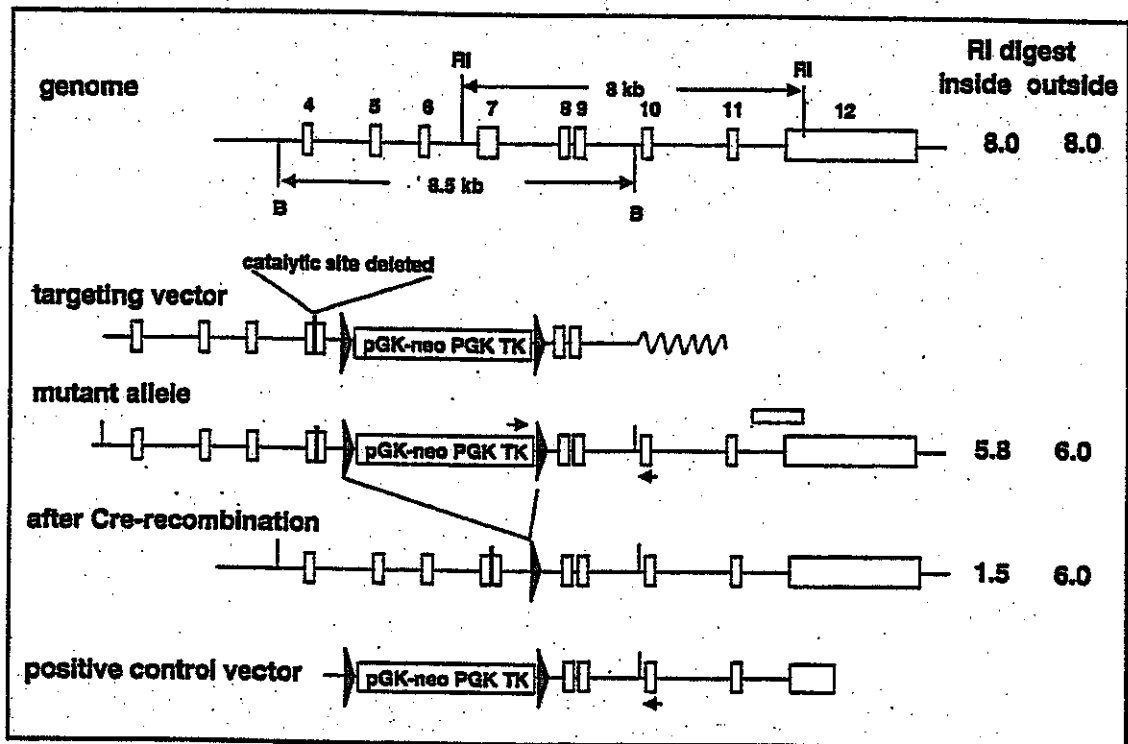


図3. ノックインマウス作製の行程。アグリカン遺伝子は18個のエクソンを含む。IGDはエクソン7によってコードされている (genome)。図2のアグリカナーゼ-1の切断部位の前後各2アミノ酸残基を除去する変異をゲノムDNAのエクソン7に作製し、イントロン7にLoxPによって挟まれたpGK-neo-pGK-TKフラグメントを挿入したターゲティングベクターを作製した。ターゲティングベクターの長腕、短腕の長さはそれぞれ6、および2 kbである (targeting vector)。相同組換えが生じたアリルでは図の mutant allele の如く遺伝子に変異が導入される。相同組換えをおこしたES細胞クローンにCreリコンビナーゼをトランスフェクトさせるか、あるいはこの mutant allele を有するマウスにCreリコンビナーゼを発現するマウスを交配させることによって、pGK-neo-pGK-TKフラグメントのない mutant allele が得られる。本研究では、後者の方法でノックインマウスを作製する。相同組換えのスクリーニングのPCRの条件検討に用いた positive control vector の構造を最下段に示す。



表1. IGDKI-14 を用いたキメラマウスの作製と同マウスの交配

IGDKI-1 #14【標頭No.00010K(I)】			Mated	Delivered	No.	Agouti	Male	Female	
Male	Female								
F1-1(70>50%) 010218Birth	C57BL/6Cr	1st(A)	010406	010504	8	-	-	-	
		2nd(B)	010406	010509	9	-	-	-	
		3rd(C)	010427	010521	5	-	-	-	
		4th(D)	010427		9	-	-	-	
		5th(E)	010529	010623	7	-	-	-	
		6th(F)	010529	-	-	-	-	-	不妊
		7th(G)	010704	010727	12	-	-	-	
		8th(H)	010704	010820	5	-	-	-	
		9th(I)	010704	010910	9	-	-	-	
		10th(J)	Iの遠いかけ交配	011004	3	-	-	-	
		11th(K)	010815	011210	6	-	-	-	
		12th(L)	010815	011130	8	-	-	-	
		13th(M)	Jの遠いかけ交配	-	-	-	-	-	不妊
		14th(N)	Kの遠いかけ交配	020107	10	-	-	-	
		15th(O)	020108	020222	7	-	-	-	
		16th(P)	020108	020308	10	-	-	-	
		17th(Q)	020131						
		18th(R)	Nの遠いかけ交配	020204	3	-	-	-	
C57BL/6Cr	F1-2(70>50%) 010218Birth	1st(A)	010406	010426	9	-	-	-	
		2nd(B)		010601	11	-	-	-	
		3rd(C)		010625	12	-	-	-	
		4th(D)		010717	7	-	-	-	
		5th(E)		010809	12	-	-	-	
		6th(F)		010924	1	-	-	-	
		7th(G)	011015	011027	7	-	-	-	
		8th(H)		011204	3	-	-	-	
		9th(I)		020115	4	-	-	-	
		10th(J)		020207	3	-	-	-	

表2. IGDKI-78 を用いたキメラマウスの作製と同マウスの交配

IGDKI-1 #78 [課題No.00010K(3)]									
Male	x	Female		Mated	Delivered	No.	Agouti	Male	Female
R01-1 (100>>70%) 010820Birth		C57BL/6J	1st(A)	011009	011029	7	-	-	-
			2nd(B)	011008	011115	8	-	-	-
			3rd(C)	011009	011115	8	-	-	-
			4th(D)	011109	011203	7	-	-	-
			5th(E)	011128	011231	10	-	-	-
			6th(F)	011128	020103	10	-	-	-
			7th(G) Fとの混血交配	020131	020131	8	-	-	-
			8th(H)	020117	020220	11	-	-	-
			9th(I)	020218	020313	8	-	-	-
R01-2 (100>>70%) 010820Birth		C57BL/6J	1st(A)	011009					
			2nd(B)	011009					
			3rd(C)	011009					
R02-1 (100>>70%) 010820Birth		C57BL/6J	1st(A)	011009					
			2nd(B)	011009					
			3rd(C)	011009					
R04-1 (70>>50%) 010820Birth		C57BL/6J	1st(A)	011017					
			2nd(B)	011017					
			3rd(C)	011017					

未交配キメラ

R01-3  
(30%)  
010820Birth

R01-4  
(50>>30%)  
010820Birth

R03-1  
(30%)  
010820Birth

1. P53 ノックアウトマウス由来軟骨系細胞株 N1511 の樹立と性状解析

渡辺秀人 (愛知医科大学分子医科学研究所助教授)

軟骨には他の組織にはない大きな特徴が3つある。第1に血管と神経支配がない。第2に種々の分化段階があるとはいえ細胞成分は1種類、すなわち軟骨細胞から成る。第3に特有の分子によって構成されるマトリックスを持つ。生体における軟骨機能の本体は軟骨マトリックスであり、特徴的マトリックス分子を合成する故に軟骨細胞分化に関する研究が重要視されている。我々は、P53 ノックアウトマウス由来軟骨系細胞株 N1511 を樹立し、その性状解析を行った。本細胞株は BMP-2 とインシュリンによる分化誘導では細胞は同期して分化し、肥大軟骨にまでの過程に至った。一方、PTH/Dex による分化誘導ではアルシャンブルー陽性の軟骨様結節を形成して分化したが、肥大軟骨細胞への分化には至らなかった。同細胞株に人為的に p53 発現を回復させると細胞増殖が抑制できることがわかった。同細胞は軟骨分化機構の解明に役立つのみならず、増殖を人為的に制御できるという観点から軟骨の再生医療にも繋がるきわめて有効な細胞株であることが示された。

分担研究者

木全弘治

(愛知医科大学分子医科学研究所)

A. 研究目的

軟骨には他の組織にはない大きな特徴が3つある。第1に血管と神経支配がない。第2に種々の分化段階があるとはいえ細胞成分は1種類、すなわち軟骨細胞から成る。第3に特有の分子によって構成されるマトリックスを持つ。生体における軟骨機能の本体は軟骨マトリックスであり、特徴的マトリックス分子を合成するゆえに軟骨細胞分化に関する研究が重要視されている。

軟骨細胞の分化に関する研究は主として細胞培養系を用いて解析され

てきた。現在まで、ATDC5 (マウス悪性奇形腫由来)、CDK2 (ラット軟骨細胞由来)、C3H10T1/2 (間葉系幹細胞由来) RCJ3.1C5 (ラット軟骨細胞由来) TC6 (マウス軟骨細胞由来) 等の細胞株が軟骨細胞分化の研究に用いられているが、生体内における軟骨分化の全過程を忠実に再現する細胞株はいまだ獲得されたとは言い難い。また、上記の細胞株には、人為操作による遺伝子変異にて不死化したものもあり、遺伝子変異による表現型の変化も念頭におかなければならない。

我々は、p53 ノックアウトマウスの軟骨細胞から軟骨分化を再現する細胞株の樹立をめざした。樹立される細胞は遺伝子変異が明らかであると

いう利点を持つと考えられる。

## B. 研究方法

P53 ノックアウトマウスの肋軟骨より成長板軟骨細胞を採取し、培養した。2週間後、増殖能の高い細胞のコロニーを選択し、細胞のクローニングを行った。

分化誘導剤としては、デキサメタゾン、副甲状腺ホルモン (PTH)、骨形成誘導因子 (bone morphogenetic protein, BMP) -2、インシュリン、繊維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor, FGF)、Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) を試した。

形態学的な軟骨分化は、アルシヤンブルー染色、アリザリンレッド染色、アグリカンに対する免疫染色等で評価した。生化学的には<sup>35</sup>S 硫酸のグリコサミノグリカン鎖への取り込みと、アルカリフォスファターゼ活性にて検討した。

軟骨分化マーカーの発現はノザンプロット法にて解析した。

P53 遺伝子回復実験には pp53-DsRed 発現ベクターを作製し、一過性に細胞に発現させた。細胞増殖はプロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みにて評価した。

## C. 研究結果

P53 ノックアウトマウスの肋軟骨より成長板軟骨細胞からクローニングおよび再クローニングを行い、増殖能が高く良好な結節形成を示すクローン1個を選び、N1511と命名した。

各種サイトカイン、成長因子を用いて軟骨細胞への分化誘導にかんして検討したところ、コンフルエント期の細胞に対し骨形成誘導因子 (bone morphogenetic protein, BMP) -2 とインシュリン、あるいは副甲状腺ホル

モン (PTH) とデキサメタゾン (Dex) の2剤併用により軟骨系細胞への分化が誘導された。

BMP-2 とインシュリンによる分化誘導では細胞は軟骨様結節を形成することなくアルシヤンブルー陽性、さらにはアリザリンレッド陽性となった。一方、PTH/Dex による分化誘導ではアルシヤンブルー陽性の軟骨様結節を形成したが、アリザリンレッドやアルカリフォスファターゼは陰性であった。

ノザンプロット解析では軟骨分化のマーカー遺伝子群は、BMP-2/インシュリン処理では生体内の発現パターンを再現したが、PTH/Dex では II および IX 型コラーゲン等の軟骨細胞マーカー遺伝子の発現はみられたものの、培養の全過程を通じて肥大軟骨細胞のマーカーの発現は見られなかった。

同細胞株に p53 を発現させて人為的に細胞増殖を制御できるかどうか検討したところ、p53 発現細胞では細胞増殖の有意な抑制が観察された。

## D. 考察

今回我々は、p53 ノックアウトマウスの軟骨細胞から軟骨分化を再現する細胞株、N1511 を樹立した。本細胞株は BMP-2 とインシュリンによる分化誘導では細胞は同期して分化し、肥大軟骨にまでの過程に至った。一方、PTH/Dex による分化誘導ではアルシヤンブルー陽性の軟骨様結節を形成して分化したが、肥大軟骨細胞への分化には至らなかった。

同細胞株に人為的に p53 発現を回復させると細胞増殖が抑制できることがわかった。

## E. 結論

今回我々は、p53 ノックアウトマウスの軟骨細胞から軟骨分化を再現する細胞株、N1511 を樹立した。同細胞は軟骨分化機構の解明に役立つのみならず、増殖を人為的に制御できるという観点から軟骨の再生医療にも繋がるきわめて有効な細胞株であることが示された。

#### **F. 学会発表**

1. p53 欠損マウスより樹立された軟骨分化能を有する細胞株、N1511 の解析

神谷宣広、実光章年、木全弘治、Caroline Damsky、清水克時、渡辺秀人、

第15回日本軟骨代謝学会（前橋）

平成14年3月8日

#### **G. 発表論文**

III、IVの項参照

## 2. リンク蛋白欠損マウス：ヘテロ接合体の解析

渡辺秀人 (愛知医科大学分子医科学研究所助教授)

軟骨のマトリックスには2つの主要な構成成分がある。1つはコラーゲンによる繊維成分でマトリックスに剛直性を与えている。もう1つはプロテオグリカン会合体で多量の水分を貯留する作用を持ち、軟骨に弾力性を与えている。プロテオグリカン会合体はヒアルロン酸、アグリカン、リンク蛋白の3者よりなる。リンク蛋白欠損マウスは胎生期の内軟骨骨化の遅延を呈し、その殆どは出生時呼吸困難で死亡する。リンク蛋白欠損マウスのヘテロ接合体は野生型と変わりなく成長するが、リンク蛋白を合成する対立遺伝子のうち1本しかもたないため、同分子のマトリックスへの沈着の低下により、軟骨組織が脆弱になっている可能性がある。今回、我々は同ヘテロ接合体の解析を行い、この点に関して検討した。リンク蛋白欠損ヘテロ接合体マウスにおいて同分子の沈着に有意な低下はみられず、マウスの運動負荷によっても軟骨組織に異常を認めなかった。当研究結果は軟骨マトリックス機能の研究に直接役立つものと考えられる。

分担研究者

木全弘治

(愛知医科大学分子医科学研究所)

### A. 研究目的

慢性関節リウマチ、変形性膝関節症等の進行性関節破壊疾患に於ける最も重要な問題は運動機能障害をもたらす関節軟骨の破壊である。軟骨組織の主成分であるプロテオグリカン会合体<sup>1)</sup>は、特異な三次元構造とその保水作用を通じて軟骨に物理的強度と耐久性を与えており、軟骨組織の構造と機能の維持に不可欠な構造である。この会合体は、アグリカン、ヒアルロン酸、およびリンク蛋白の三種類の分子より成る。関節破壊疾患に関するこれまでの研究から、関節破壊は、プロテオグリ

カン会合体の中心的分子であるアグリカンの分解によって進むことが知られていたが、近年、アグリカン分解能を有する種々の蛋白分解酵素が同定され<sup>2)</sup>、軟骨破壊における役割が解明されつつある。一方、軟骨の代謝と構造維持の点では、アグリカン遺伝子の個体差 (various number of tandem repeat = VNTR) が明らかとなり、軟骨構造の強度を左右する遺伝的背景の存在が示唆された。また、成長と老化に伴うアグリカンの分子修飾が近年報告され、老化に伴うプロテオグリカン会合体の変化と軟骨組織脆弱化との関連が示唆されている。しかしながら、会合体を形成するもう一つの分子であるリンク蛋白<sup>3)</sup>の生体内機能に関しては申請者の研究以外に殆ど報告がない。リンク

蛋白はアグリカンとヒアルロン酸の結合を補強するため、会合体の安定な組織沈着に不可欠な分子であると考えられているので、軟骨破壊を惹起する様々な条件下における同分子の機能を解析することは極めて重要である。

本研究者は一貫して、プロテオグリカン会合体の生体内における役割に関して研究を続けてきた。まず、マウスアグリカン遺伝子をクローニングし、そのゲノム構造を明らかにし<sup>4)</sup>、その情報をもとに、自然発症の軟骨マトリックス欠損マウス (cartilage matrix deficiency, CMD) の原因がアグリカン遺伝子の変異によることを発見し<sup>5)</sup>、この研究から、軟骨の発生と分化におけるアグリカンの決定的な役割を明らかにした。さらに、CMD ヘテロ接合体の解析から、わずかなアグリカンの減少が軽度の短趾症と若年性頸椎ヘルニア症を惹起することを明らかにした<sup>6)</sup>。一方、リンク蛋白の生体内機能を明らかにする目的で欠損マウスを作製し、同マウスを解析した<sup>7)</sup>。その結果、リンク蛋白欠損マウスは CMD より軽度の小人症を呈し、発育不全を呈する顎顔面部分の気道を正常に発育した舌が閉塞させることにより殆どが出生直後呼吸困難にて死亡することを観察した (図1)。さらに形態学的、生化学的手法により、同分子がプロテオグリカン会合体の安定した組織沈着に必要なこと、同会合体が軟骨細胞の増殖と分化に必要なシグナル分子を調節制御していることを初めて見いだした。申請者らは既に作製したマウスモデルを用いて、さらに成長後の軟骨組織維持におけるリンク蛋白の役割および軟骨破壊条件下における同分子の役割を解明すべく、

今回の研究課題を考案した。

当該研究では、同マウスのヘテロ接合体を詳細に解析するとともに運動負荷、コラーゲン誘導関節炎の惹起等を行い、軟骨の破壊過程を観察し、軟骨構造の維持と軟骨破壊における同分子の役割を明らかにすることを旨とした。また、リンクタンパク欠損ホモ接合体に関しても軟骨以外の組織に関して解析を加えた。

## B. 研究方法

### 実験マウス

作製したリンク蛋白遺伝子欠損マウスの系統は C57 Bl/6 系 129Svj とのハイブリッドであったが、C57 Bl/6 系と戻し交配を行っている。今回は戻し交配 11 代のマウスを用いた。動物実験は動物愛護の観点から定められている愛知医科大学動物実験センターの「動物実験のガイドライン」に則って行った。

### 人為的関節負荷、および軟骨破壊状況の作製

回転踏車を用いてマウスに運動負荷を加えて、単位時間あたりの自発的歩行数と軟骨組織の変化を解析した。

### 組織学的、免疫組織科学的解析

10%中性緩衝ホルマリンにて固定後パラフィン包埋した組織切片に対して、HE、safranin-o, alcian blue, 染色を行った。また、同切片を、各々アグリカン、リンク蛋白に対するモノクローナル抗体 1C6、9/30/8A4 と Histomouse SP Kit ( Zymed Laboratory) を用いて免疫染色を行った。切片を、脱パラフィンした切片を内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした後、コンドロイチナーゼ ABC 処理し、上記キットの説明書に従って染色した<sup>7)</sup>。

## ヒアルロン酸の定量

マウスの脳、皮膚、肋軟骨を採取し湿重量を計測したのち、凍結乾燥させ乾燥重量を測定した。このサンプルをプロティナーゼ処理し、エタノール沈殿にてグリコサミノグリカン画分を抽出し、これをサンプルとして IBA 法 (阻害 ELISA) によるヒアルロン酸定量キット (生化学工業) を用いてヒアルロン酸を定量した。

## D. 研究結果および考察

アグリカン遺伝子の自然発症ノックアウトマウスである Cartilage Matrix Deficiency (CMD) のヘテロ接合体はアグリカン産生にかかわる対立遺伝子は 1 本しか持たない。従ってもし野生型で 2 本の対立遺伝子がアグリカン合成に同等に関与しているとすれば、ヘテロ接合体ではアグリカンの合成が野生型と比較して低いと推測される。事実、CMD のヘテロ接合体ではアグリカンの合成は約 66% にまで低下し、軟骨におけるアグリカンの沈着量も 87% にまで減少する。アグリカン沈着のわずかな減少によって CMD ヘテロ接合体は軽度の小人症と老化に伴う脊椎の脆弱化とヘルニア症と呈する。リンク蛋白は軟骨組織へのアグリカンの安定な沈着に必要なので、リンク蛋白欠損ヘテロ接合体マウスではリンク蛋白合成量の低下に伴いアグリカン沈着の低下が生じ、その結果、CMD ヘテロ接合体類似の表現型が表れる可能性がある。リンク蛋白欠損マウス系は C57 Bl/6 と 129SVj とのハイブリッドであるため、微細な表現型が遺伝子型によるのか背景のマウスの系統によるのか判断しがたい。そこでリンク蛋白欠損マウス系を C57 Bl/6 と 11 代戻し交配させ、これを実験群として用

いた。

### A) 体重

生後 8 週齢および 4 週齢のオスの野生型とヘテロ接合体マウスの体重測定を行ったところ、それぞれ 8 週齢では  $22.3 \pm 3$ 、 $22.3 \pm 4$  ( $n=4$ )、週齢では  $14.6 \pm 0.6$ 、 $14.6 \pm 0.8$  ( $n=3$ ) で両者に差はなかった。また、生後 12 ヶ月のマウスに関しても差は認められなかった。

### B) 組織学的、免疫組織科学的検討

次に、生後 10 週齢、および 12 ヶ月のマウスの軟骨を組織学的に検討した。HE 染色では野生型、ヘテロ接合体とも軟骨組織に有意な差は見られず、関節表面は平滑で最外層の軟骨細胞も保たれていた。成長板の軟骨細胞の柱状構造もよく保たれていた (図 2 AB)。アルシアンブルー染色を用いて関節表面のグリコサミノグリカンの組織沈着を観察したところ、両者とも同様の染色態度を示した (図 2 AB、右下)。免疫染色ではアグリカンは主として成長板に局在し、その沈着程度は野生型とヘテロ接合体とで差がなかった (図 2 C、野生型、D、野生型、E、ヘテロ接合体)。リンク蛋白も同様に主として成長板に限局していたが、その沈着程度はヘテロ接合体 (図 2 G) において野生型 (図 2 F) と比較して有意に低下していた。

これらの結果から、リンク蛋白欠損マウスヘテロ接合体において実際に軟骨のリンク蛋白の沈着量は有意に低下していることが明らかとなった。しかしアグリカンの沈着量に有意な低下は見られなかったことから、ヘテロ接合体において合成沈着されるリンク蛋白は量的にアグリカン沈着に充分であると考えられる。関節



軟骨は野生型と同様の形態を呈しな  
んら病的所見は見られなかったの  
で、ヘテロ接合体のリンク蛋白沈着  
量の低下は関節軟骨の機能に影響  
を与えないものと考えられる。

#### C) 運動負荷による軟骨組織の変化

次に、回転車を用いて、10 日間  
にわたって毎日規定回転数 (500-1300  
回転) の運動負荷をかけた。マウス  
は野生型、ヘテロ接合体ともに自  
発的に運動を行い、1 分間当たりの  
回転数は各々 10.7、9.6 回転で有  
意な差はなかった。従ってヘテロ  
接合体においては有意な運動機能  
障害はないものと考えられた。こ  
れらマウスの軟骨組織について組  
織学的検討をおこなったが、関節  
軟骨に異常は見られなかった。

#### D) リンク蛋白欠損マウスの軟骨以外の所見

リンク蛋白欠損マウスのホモ接  
合体の表現型は主として軟骨内骨  
化の障害であるが、リンク蛋白が  
軟骨以外の脳、皮膚、血管等にも  
発現していることから、これらの  
組織に同マウスの表現型が表れ  
る可能性がある。そこで、脳、皮  
膚、血管に関して組織学的検討  
を行った。

胎生 18.5 日のホモ接合体の皮  
膚は腹部背部とも野生型と比較し  
て薄く、毛嚢数も減少していた。  
一方、ヘテロ接合体には異常は  
観察されなかった。また、ホモ  
接合体、ヘテロ接合体ともに、  
脳、血管には明らかな変化は  
認められなかった。ホモ接合体  
における皮膚菲薄化の原因はヒ  
アルロン酸含量低下に伴う水分  
の減少によるものと推測された  
が、後述のごとくヒアルロン酸  
の減少はみられなかった。ホモ  
接合体に見られた皮膚

菲薄化および毛嚢の減少の原因  
に関しては現在検討中である。

次に軟骨、脳、皮膚に関してヒ  
アルロン酸の定量を行ったところ  
、いずれの組織においても野生型  
、ヘテロ接合体、ホモ接合体の  
三者で有意な差は見られなかつ  
た (図 3)。従って、リンク蛋白  
の減少あるいは欠損は組織のヒ  
アルロン酸量に有意な影響を  
あたえないものと考えられる。

#### E. 結論

本研究では、リンク蛋白欠損マ  
ウスの主としてヘテロ接合体に  
関して、軟骨組織の構造変化の  
有無を解析した。リンク蛋白の  
軟骨への沈着は実際低下してい  
たが、体重、運動負荷による差  
、ヒアルロン酸値、組織学的  
変化等には有意な差は確認で  
きなかった。本研究期間では実  
験群として用いたマウス数が少  
なく、定量値の統計学的解析が  
できなかった。また、当初予定  
していたコラーゲン関節炎の作  
製による軟骨組織の脆弱性の  
検討も遂行できなかった。今後  
は実験群のマウス個体数を増  
やして検討していきたいと考  
えている。

#### F. 参考文献

- 1) Watanabe H, Yamada Y, and Kimata K: Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan of the cartilage (review). *J. Biochem.* 124: 687-693, 1998.
- 2) Tortorella MD et al: Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 284: 1664-6, 1999

- 3) Neame PJ and Bary FP: The link proteins. *Experientia* 49: 393~402, 1993
- 4) Watanabe H, Gao L, Sugiyama S, Doege K, Kimata K, and Yamada Y: Mouse aggrecan, a large cartilage proteoglycan: Protein sequence, gene structure and promoter sequence, *Biochem. J.* 308: 433-440, 1995.
- 5) Watanabe H, Kimata K, Line S, Strong D, Gao L, Kozak C, and Yamada Y: Mouse cartilage, matrix deficiency (cmd) caused by a 7 bp deletion in the aggrecan gene. *Nature Genet.* 7: 154-157, 1994.
- 6) Watanabe H, Nakata K, Kimata K, Nakanishi I, and Yamada Y: Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote cmd mice defective in aggrecan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 6943-6947, 1997.
- 7) Watanabe H and Yamada Y: Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. *Nature Genet.* 21: 225-229, 1999.

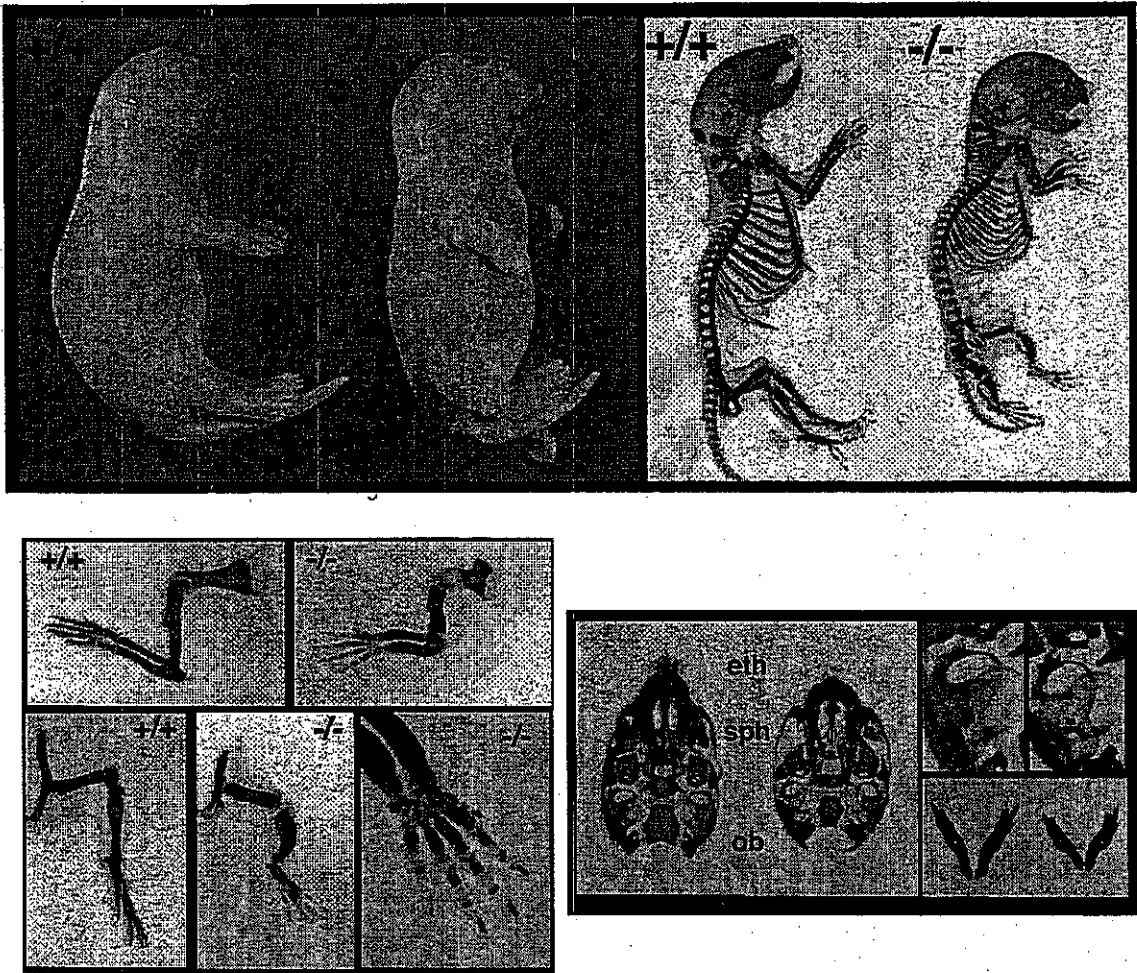


図1 出生時のリンク蛋白欠損マウスと野生型マウス

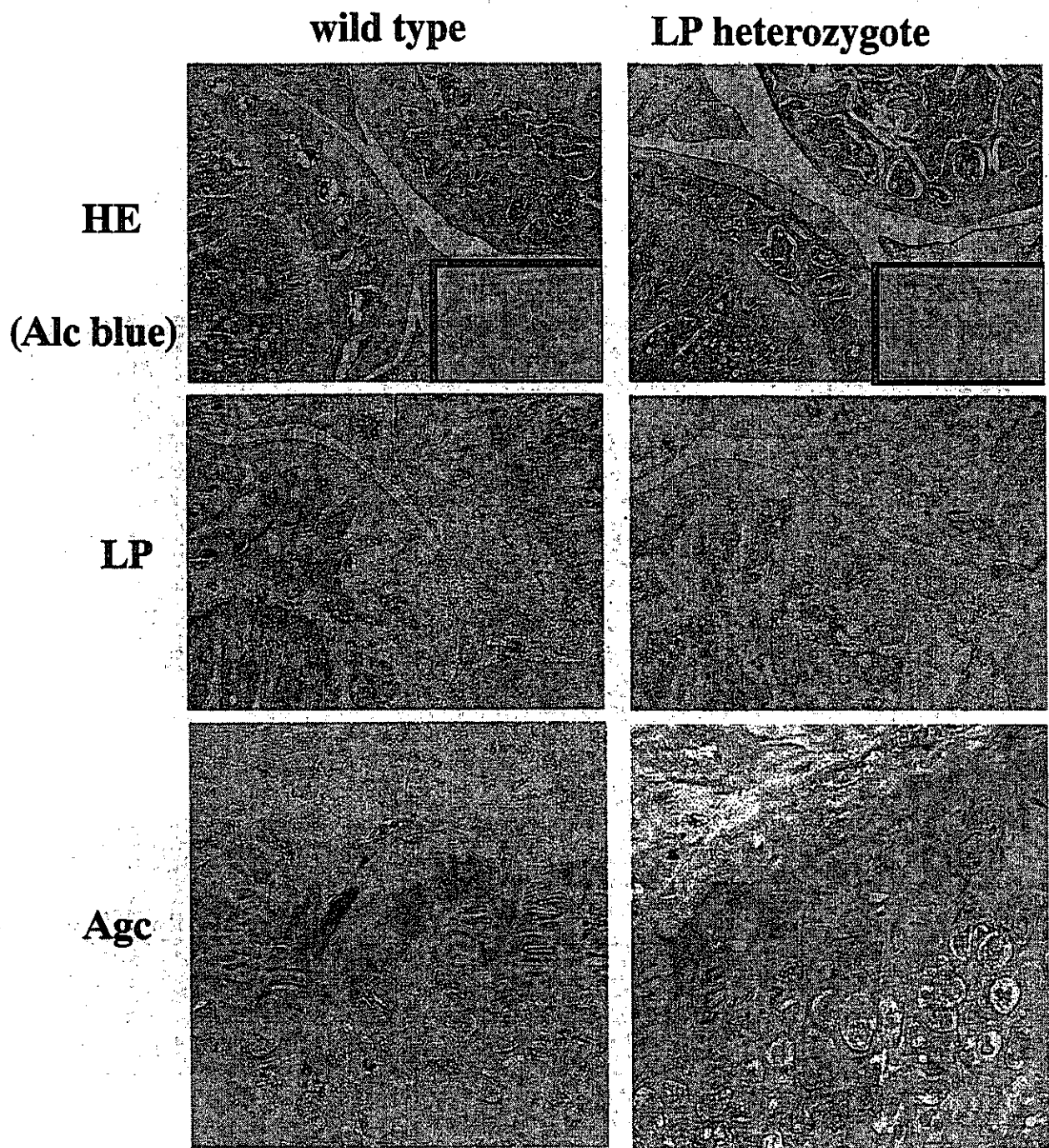


図2 野生型とリンク蛋白欠損ヘテロ接合体の軟骨組織。生後 10 週例の膝関節。ヘマトキシリン・エオジン染色 (A、野生型、B ヘテロ接合体、x20) およびアルシャンブルー染色 (各々右下、x200)、アグリカンの免疫染色像 (C、野生型、x20)、成長板のアグリカン免疫染色像 (D、野生型、E、ヘテロ接合体、x200)、リンク蛋白の免疫染色像 (F、野生型、G ヘテロ接合体、x20)。