

Title	Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing $\alpha 1$ (IX) collagen chains with a central deletion
Author(s)	中田, 研
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38122">https://hdl.handle.net/11094/38122</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	中 田 研
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 6 8 1 号
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing $\alpha 1$ (IX) collagen chains with a central deletion (欠損を持つ IX 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子を導入したトランスジェニックマウスにおける軟骨形成異常症と変形性関節症)
論文審査委員	(主査) 教授 小野 啓郎 (副査) 教授 高井新一郎 教授 越智 隆弘

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (目 的)

I型コラーゲンは、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 鎖よりなる heterotrimer で、軟骨や硝子体、胎生期の角膜の細胞外マトリックスを構成する分子の一つである。軟骨では、マトリックスの主要構成要素であるII型コラーゲン細線維の表面に共有結合し、II型コラーゲンと他のマトリックス成分との相互作用を仲介したり、様々な付加的機能を与えると推察されている。IX型コラーゲン分子の異常は、種々の軟骨疾患（例えば軟骨形成異常症や変形性関節症）と直接関与している可能性があるがいまだ不明である。今回、このことを明らかにするために、IX型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖に欠損をもつ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し解析を行った。

#### (方 法)

$\alpha 1$  (IX) 鎖のヒト cDNA の 5' 側約 1 kb とラット cDNA の 3' 側約 1.4 kb を in frame でつなぎ、IX型コラーゲン構造遺伝子の中央に欠損を持つ construct を作製した。これを軟骨で組織特異的に高発現させるために、ラットII型コラーゲン遺伝子の promoter/enhancer につなぎ、C57/BL6 受精卵にマイクロインジェクション法にて導入した。

得られたトランスジェニックマウスでの導入遺伝子の発現を、軟骨、眼、脳、肝臓、腎臓から抽出した mRNA を RT-PCR 法を用いて解析した。また、軟骨組織よりコラーゲンを抽出し、SDS/PAGE により分離し、 $\alpha 1$  (IX) 鎖に対するモノクローナル抗体を用いた Western blotting を行ない、異常IX型コラーゲン分子を検出した。

マウスの関節軟骨、脊椎、眼を HE 染色と、軟骨ではサフラニン O 染色も併せて組織学的検討を加え、さらに、膝関節軟骨を透過電顕にて観察した。

#### (結 果)

マイクロインジェクションした 763 個の受精卵より誕生したマウス 30 匹中の 3 匹がトランスジェニックマウスであった。導入遺伝子は、それぞれ、2 - 5 コピーが染色体中に挿入されていた。導入遺伝子の発現は、軟骨で内在性のマウス $\alpha 1$  (IX) 鎖と共に生後 2、10、28 日のいずれの時点でも組織特異的に認め、また眼でも発現を認めた。トランスジェニックマウス F1 を兄弟交配して得られた homozygote のマウスでは、heterozygote のマウスより導入遺伝子の発現は高かった。

軟骨コラーゲンの $\alpha 1$  (IX) 鎖に対するモノクローナル抗体を用いた Western blotting では、還元条件下で

105 kDa の内在性の  $\alpha 1$  (IX) 鎖以外に約 65kDa のバンドを認め、これは欠損を持つ導入遺伝子産物に相当する低分子の異常コラーゲン鎖であった。この異常  $\alpha 1$  (IX) 鎖は、非還元条件下ではより高分子であり、正常  $\alpha 1$  鎖と同様に他の  $\alpha$  鎖とジスルフィド結合により会合していることが示され、また、collagenase により分解される分子であることがわかった。

heterozygote の膝関節軟骨の光顕組織像では、6 か月齢で荷重部周辺の軟骨表層の糜爛や剥離、サフラニン O 染色による染色性の低下を認めた。この関節軟骨の変化は、9 か月、12 か月齢ではさらに進行し、Mankin らの変形性関節症の組織学的評価に準じた評価では、加齢とともに軟骨変性の憎悪を認めた。一方、正常のマウスでは明らかな変化を認めなかった。膝関節軟骨の電顕では、6 週齢で基質中のコラーゲン細線維は正常に比べて細く、径は 30 から 100nm であり、基質の超微細構造の異常を認めた。

さらに、homozygote のマウスでは、四肢短縮を伴わない小人症を認め、その脊椎には椎体前縁の骨化障害による不整が存在し、ヒトの軟骨形成異常症に類似した形態を示した。また、マウスの約 20 %で、眼に白濁や、角膜の表面の不整を認め、組織学的には角膜実質層に毛細血管浸潤を認めた。

#### (総括)

現在、細胞外基質の構成分子をコードする遺伝子の異常が様々な疾患の原因となることが解明されつつある。本研究により、IX型コラーゲンの遺伝子レベルの異常がこれらの組織の細胞外マトリックスの形成、維持の異常を引き起こすことを直接的に証明した。また、欠損を持つIX型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは導入遺伝子の発現量により軟骨形成不全症から変形性関節症にいたる様々な表現型を示すことが明らかとなった。しかし、トランスジェニックマウスの同一系統内でも軟骨や眼の異常の発症に個体差、性差があり、異常IX型コラーゲンの発現とこれら疾患の発症との間にはさらに別の因子も関与しているものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

軟骨には、II型コラーゲンやプロテオグリカンの主要成分と共に、IX型コラーゲンなどの少量構成成分の存在が分子生物学的手法により明らかになったが、その機能については不明であった。生体内にはこのような少量構成成分で重要な働きをするものが多々あると考えられるが、少量であるがゆえに解析は困難であった。

本研究は欠損を持つIX型コラーゲン遺伝子を導入し、軟骨におけるIX型コラーゲン異常が変形性関節症や軟骨形成異常症の疾患の原因となることを証明したものである。本研究は軟骨におけるIX型コラーゲンの機能の解明に有力な手掛かりを与えるものであり、さらに transgene による本方法は少量構成分子の生体内での機能を解明する適切な方法と考えられ、他の生体内の微量構成成分の役割を探るモデルともいえる意義の深い研究である。よって博士 (医学) の学位論文としての価値を有すると認められた。