

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10467

研究課題名(和文) 関節形態形成におけるメカニカルストレス応答機序の分子生物学的解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of mechanical stress response in joint formation

研究代表者

瀧上 伊織 (Takigami, Iori)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90610410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、メカニカルストレス負荷と関節形態形成との関連を解明しようとするものである。股関節脱臼モデルラットの解析により、組織学的、免疫組織学的に先天性股関節脱臼によるメカニカルストレスのない状態が関節形態形成に影響を与えていることが明らかになった。さらに遺伝子発現解析においてメカニカルストレス応答遺伝子を同定を現在行っている。これらの結果は適切なメカニカルストレスが加わらないことにより、軟骨形成や維持に関わる遺伝子が低下し、その結果変性に至る可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We investigated that the state without mechanical stress due to developmental dislocation of hip affects joint morphogenesis histologically and immunohistochemically through analysis of hip dislocation model rats. Furthermore, a mechanical stress response genes were identified in gene expression analysis. These results suggest that the genes involved in chondrogenesis and maintenance may be reduced due to the absence of appropriate mechanical stress, which may result in joint degeneration.

研究分野：関節軟骨

キーワード：骨・軟骨代謝学 関節軟骨 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

関節には常にメカニカルストレスが加わり、成長段階においてその構造・構成が破綻すると関節は形態形成異常をきたし、その結果、変形性関節症に至ることが知られている。

発育性股関節形成不全症(DDH)は幼少期に股関節が脱臼または亜脱臼することで、関節にメカニカルストレスがかからないことにより関節形態形成に異常をきたす疾患であり、本邦における変形性股関節症の主な原因となっている。1990年代まで、いくつかの研究がなされたが、形態変化が中心であり詳細な解析や分子生物学的なアプローチは行われていなかった。近年、DDHに関連するゲノムワイドな研究は未だ行われていないが、候補遺伝子の関連マッピング研究でCX3CR17、DKK18、HOXD99、PAPPA2を含むいくつかの関連遺伝子が報告されている。

Wangらは、ラット新生児の股関節、膝関節を伸展位で10日間固定する方法で、股関節脱臼モデルラットの作成方法を確立した。

われわれは、発育性股関節形成不全症に着目し、その解析を目的としてWangらの方法を用いて股関節脱臼モデルラットを作成した。大腿骨頭および寛骨臼の形成異常を組織学的に評価し、脱臼股関節から関節軟骨を採取して、メカニカルストレス変化によって引き起こされる遺伝子変化について調査した。

2. 研究の目的

本研究は、関節形態異常に伴うメカニカルストレス変化が、関節軟骨形成や変性に与える影響を明らかにするために、

- (1) ラット股関節脱臼モデルにおいて、大腿骨頭および寛骨臼の形態学的変化、免疫組織学的変化を明らかにする。
- (2) 同モデルラットから採取した軟骨の遺伝子学的解析を行い、関節軟骨形成や変性に関与するメカニカルストレス応答遺伝子を同定する。
- (3) (2)で同定されたメカニカルストレス応答遺伝子が軟骨細胞に与える影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 股関節脱臼モデルラットの解析

・形態学的解析：股関節脱臼モデルラットの成長段階における形態変化をX線、マイクロCTにて解析する。

・組織学的解析：モデルラットの股関節組織を組織学的に解析する。また免疫組織染色を行い詳細な解析を行う。

(2)メカニカルストレス応答遺伝子の同定
脱臼によりメカニカルストレス負荷のない状態が関節軟骨形成にどのような影響を与

えるかを明らかにするために、モデルラットおよびコントロールラットの、股関節の関節軟骨および成長軟骨(Y軟骨)を採取し、メカニカルストレス負荷のない状態における遺伝子発現プロファイリングを解析し、軟骨におけるメカニカルストレス応答遺伝子の同定を行う。

(3)メカニカルストレス応答遺伝子負荷による軟骨細胞の遺伝子発現変化の解析
ラットの関節軟骨から軟骨細胞を採取する。

(2)で同定した遺伝子をノックダウンあるいは過剰発現させて軟骨細胞を培養し、遺伝子発現量の変化について調査する。

(4)メカニカルストレス変化に伴う培養軟骨細胞における遺伝子発現変化の解析

重力可変装置を用いてラット軟骨細胞を培養し、遺伝子発現の変化について調査する。

4. 研究成果

(1)股関節脱臼モデルラットの形態学的変化：生後10日、生後4週、生後3か月においてモデルラットとコントロールラットを比較した。モデルラットでは大腿骨頭の扁平化、寛骨臼の形成不全、線維性組織の異常増殖による新臼蓋の形成を認めた(図1、2)。

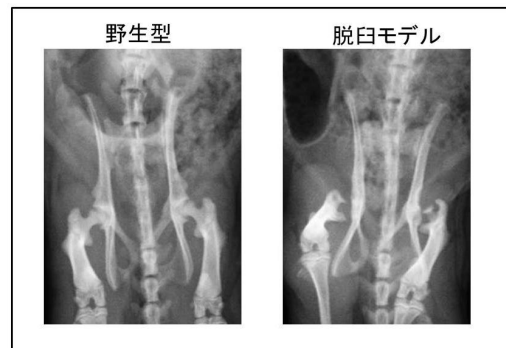


図1: 股関節脱臼モデルラットの単純X線像

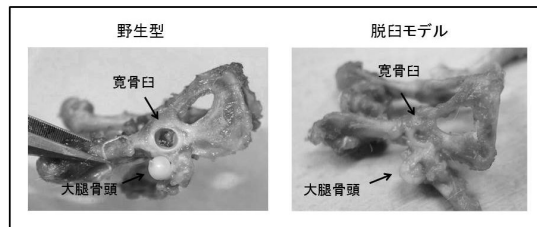


図2: 股関節脱臼モデルラットの股関節マクロ画像

(2)股関節脱臼モデルラットの組織学的変化：HE染色では骨頭の扁平化と寛骨臼の形成不全が確認された。さらに、Y軟骨および寛骨臼軟骨では軟骨細胞数の減少と軟骨細胞の配列異常を認めた。サフラニン0-ファストグリーン染色では大腿骨頭の軟骨基質の染色性の低下を認めた(図3、4)。

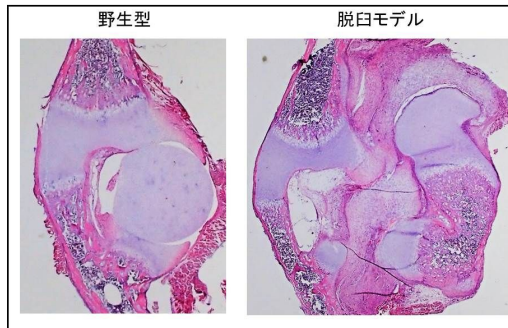


図3: HE染色

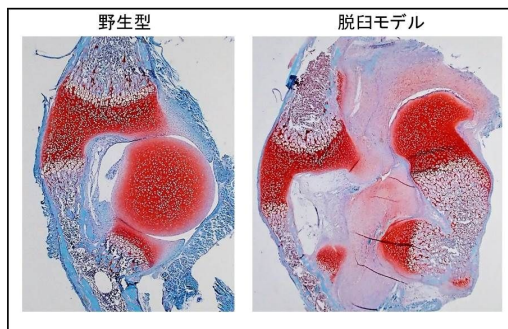


図4: サフラニン-O-ファストグリーン染色

(3) 股関節脱臼モデルラットの免疫組織学的変化: 関節軟骨のタイプ II コラーゲンの染色が低下していた(図5)。

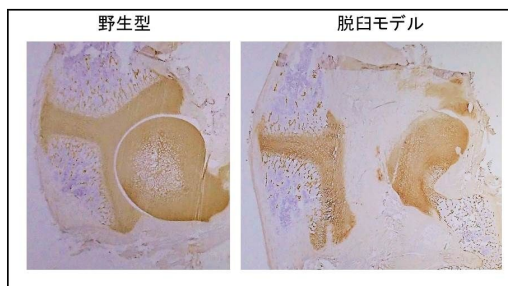


図5: タイプIIコラーゲン免疫染色

(4) EdU アッセイ: モデルラットの寛骨臼関節軟骨と骨頭軟骨において EdU 陽性細胞の減少を認めた。

(5) TUNEL 染色: モデルラットの大腿骨頭における TUNEL 陽性細胞が増加していた。

(6) メカニカルストレス応答遺伝子解析: モデルラットとコントロールラットから寛骨臼関節軟骨と Y 軟骨を採取し、次世代シーケンサーを用いて遺伝子発現解析を行っている。

さらに、モデルラットとコントロールラットの寛骨臼から関節軟骨を採取し、mRNA を抽出して real-time RT-PCR を行い、次世代シーケンサーで確認された結果と比較、解析を行う予定である。

これらの結果より、先天性股関節脱臼によるメカニカルストレスのない状態が関節形態形成に大きな影響を与えていることが明らかとなった。さらに遺伝子発現解析をすすめる、メカニカルストレス応答遺伝子を同定し、変性に至るメカニズムを解明したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

灌上 伊織 (TAKIGAMI Iori)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90610410

(2) 研究分担者

秋山 治彦 (AKIYAMA Haruhiko)

岐阜大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 60402830

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()