

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01821

研究課題名(和文) 新しい可溶化法を使った組織成分の定量解析に基づく関節軟骨の包括的評価法の確立

研究課題名(英文) Comprehensive evaluation of the articular cartilage based on quantitative analysis of extracellular matrix using the new solubilization method.

研究代表者

三浦 美樹子 (Kobayashi-Miura, Mikiko)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：40447925

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)：本研究は関節軟骨組織の包括的な評価方法を確立することを目的として関節軟骨組織の大部分を占める細胞外基質について当研究室で開発された完全可溶化法を用いて解析した。雄ラットの関節軟骨組織の細胞外基質の主成分、グリコサミノグリカン(GAG)とコラーゲン(COL)の定量的解析を行った。COL量はCOLに一定の割合で含まれる特異的なアミノ酸であるヒドロキシプロリン(Hyp)を測定した。乾燥重量当たりの量は成熟が進むにつれGAGは緩やかに減少するのに対しHypは一定の割合で増加していった。組成比GAG/Hypは成長段階ごとに一定の値を示し、未成熟な関節軟骨の成熟度を示す指標となりうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節軟骨の摩耗が主な原因となる変形性膝関節症は日本人の5人に1人が罹患しているといわれ、特に高齢者に多い疾患である。しかし、関節軟骨の組織を形成する成分についての一生を通じての経時的な変化などについては未知の部分も多い。成熟に伴って組織の再性能が失われていくことから、成長過程の関節軟骨の性質を知ることには変形性膝関節症の治療法の開発などに繋がる可能性がある。本研究では、関節軟骨の細胞外基質組成分量とその組成比を成長段階ごとに解析し、関節軟骨組織の構成組成比GAG/Hypが未成熟な関節軟骨の成熟度を示す指標としての有用性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to find an index for comprehensive estimation of the articular cartilage. We quantitated the glycosaminoglycan (GAG) and collagen (COL) as main extracellular matrix constituents of the articular cartilage at various growing stages during maturation in male rats. For COL quantitation, we measured hydroxyproline (Hyp), an unique modified amino acid in COL protein.

The amount of GAG was decreasing dramatically during the early maturation and then mildly at the latter half of maturation. On the other hand, the amount of Hyp was increasing constantly. The GAG/Hyp ratio is also dramatically changed during maturation and the ratio showed a unique value for each maturation stage clearly. Therefore, it is possible that the GAG/Hyp ratio may be a useful index for the estimation of the articular cartilage during maturation.

研究分野：発生生物学

キーワード：関節軟骨 グリコサミノグリカン コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 変形性膝関節症は、日本人の約5人に1人に当たる2530万人が罹患すると推測される。疾患の主な原因は、膝の関節軟骨の損傷や磨耗である。骨表面をおおうわずか数ミリの厚さしかない関節軟骨には神経が繋がっておらず、患者は関節軟骨の損傷や磨耗を早期に自覚できない。成熟した関節軟骨では再生能を持つ軟骨細胞が表層に局在するが、関節軟骨は表層から磨耗するため成熟後の関節軟骨の再生能力は低下する。軟骨細胞の再生能力が低く、初期の自覚症状のない変形性膝関節症の根本的な治療には移植した軟骨細胞を組織に定着させることが不可欠である。そのためには、軟骨組織の詳細な情報が必須である。しかし、関節軟骨組織の大部分を占め、組織の維持や軟骨細胞の定着を左右する細胞外基質の成分特性は未知の部分が多い。これは、関節軟骨組織の完全可溶化が難しく、今まで詳細な解析ができなかったことによるところが大きい。

(2) 再生能力が極めて低い成熟した関節軟骨組織と比較すると、幼若期の関節軟骨組織は再生能力や軟骨構造を維持する能力が高い。組織学的にも関節軟骨組織は成熟に伴い大きく変化し、一様な組織から層構造化する。申請者はこれまでの研究結果として、成長過程において層ごとの細胞密度、細胞外基質タンパクの種類やグリコサミノグリカン (GAG) とコラーゲン (COL) の局在が変化することを報告した (Kobayashi-Miura et al., Anat Hist Embryo, 2016)。これにより、関節軟骨組織の構成成分やその比率、局在などが発生・成熟過程で変化していくことが示唆された。

(3) 申請者の所属する研究室にて新しい関節軟骨組織の完全可溶化法を確立したことにより (Osago et al., Anal Biochem, 2018)、初めて定量的な軟骨組織の高分子成分の解析が可能になった。関節軟骨の細胞外基質はGAGとCOLという主に2種類の高分子からなる。GAGは成熟とともに硫酸修飾を受け、加齢とともにその修飾や長さが変化することが知られており、COLは軟骨の弾性に関係し、成熟とともに酵素的架橋 (善玉架橋) が形成される。加齢に伴い、軟骨のCOLには糖化による非酵素的架橋 (悪玉架橋) が増え、組織がもろくなるといわれている。このことから、成熟後も関節軟骨組織の成分やその比率など特性が変化する可能性が示唆された。

(4) 軟骨構造を維持する能力の高い幼若動物の関節軟骨組織と、維持能力の低い成熟動物の関節軟骨組織の構成成分の比率やその局在はちがうのだろうか? 発生・成熟・老化過程での細胞外基質の違いを明らかにすることで組織構造を維持するための要因を探り、包括的な軟骨組織の評価ができると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は関節軟骨組織の大部分を占める細胞外基質について解析することで、関節軟骨組織の包括的な評価方法を確立することである。具体的には、新しい可溶化法で可能になった組織内高分子成分の定量的解析と組織学的解析を組み合わせ、発生・成熟・老化過程の関節軟骨に対する基礎データを構築する。

3. 研究の方法

(1) 雄ラットを対象として、出生前の胎生期から成熟期(7~9 週齢)までの成長段階ごと及び加齢期(6ヶ月齢~1歳齢)の膝関節大腿骨関節軟骨を採取し、組織学的解析と生化学的解析を行った。組織学的解析に用いるために、採取した関節軟骨は4%パラホルムアルデヒドで固定した。4週齢以降の関節軟骨については脱灰処理後に固定をした。生化学的解析を行うために、

thermolysin を用いて、採取した関節軟骨の完全可溶化を行った。胎仔及び新生仔から採取した膝大腿骨関節軟骨は組織重量が極めて少ないため、乾燥重量が合計 1 mg を超えるように 3～7 匹分を合わせて可溶化を行った。

(2) 組織学的解析は、組織構造を見るために HE 染色、GAG の局在を見るためにトルイジンブルー染色、COL の局在を見るために 1 型及び 2 型の COL に対する免疫染色を行った。免疫染色は、ヒアルロニダーゼによる賦活化処理後に行った。

(3) 生化学的解析は、thermolysin による軟骨組織完全可溶化後、関節軟骨組織の細胞外基質の主成分である高分子 GAG と COL、細胞数を反映する DNA の定量的解析を行った。COL の定量的解析には、COL に特有のヒドロキシプロリン (Hyp) 量を測定した。さらに、LC-MS/MS を使って、COL の成熟とともに形成される酵素的架橋 (善玉架橋) 特有の指標とされるピリジノリンの架橋解析を行った。

4. 研究成果

(1) 雄ラット膝関節軟骨組織の乾燥重量当たりの GAG、COL、DNA 量と成長段階ごとに組織像との比較を行い、関節軟骨の包括的評価を行う指標になりうるのかを検討した。GAG、COL 量は共に、成長過程において変化していたが、その変化の仕方は異なっていた。GAG は、新生仔期 (0～1 週令) にピークになった後は幼仔期 (2～3 週令) に急激に減少するが、その後青年期 (4～6 週令) においては、一定の値を保ち、成熟期以降再び緩やかに減少した。COL は成熟期までの成長過程において一定の割合で増加していくが、成熟期以降の増加はほとんどなく一定の値に収まった。加齢期における GAG 量は新生仔期と比較して 1/5 程度、成熟期と比較して 7 割程度にまで減少していたが、COL 量は成熟期と比較してあまり減少していなかった。DNA 量は、胎仔期から新生仔期にかけて、急激に減少しそれ以降は成長段階間での差はあまりなかったが、組織の細胞数の変化を反映しているものと考えられた。乾燥重量当たりの DNA 量すなわち組織の細胞数の成長過程における変化の仕方は、GAG 量、COL 量ともに一致しているものではなかった。

(2) 関節軟骨組織の細胞外基質を構成する高分子成分の組成比である GAG/Hyp は GAG、COL 量より顕著に成長段階ごとに一定の値を示した。特に、組織学的には特徴的な層構造が形成されていない未熟で比較的均一に見える新生仔期から幼仔期の関節軟骨組織において、GAG/Hyp 比は著しく変化していた。しかし、層構造が形成される青年期から成熟期以降の成長段階間では GAG/Hyp の変化は小さくなっていった。GAG/Hyp 比の変化が大きい時期は、局所的な組織像では成長段階の判断が難しい。GAG/Hyp 比は未成熟な関節軟骨組織をより細かく評価する指標となりうることを示唆された。成熟期～加齢期においては、GAG/Hyp 比が非常に緩やかに減少する、成熟期以降の正常ラットの関節軟骨は GAG/Hyp 比 2 程度が目安となることが示唆された。

(3) COL 特有の架橋構造であるピリジノリンについての解析を行った。出生 0 日目を 1 とし、相対的に比較した。ピリジノリンの相対量は成長段階ごとのバラツキが少なく比較的安定していた。胎仔期から成熟した関節軟骨の特徴である層構造が顕著になる成熟期、さらに加齢期を通して、乾燥重量当たりのピリジノリンの相対量は増加し続けた。成長過程においては一定の割合で乾燥重量当たりの COL 量が増加するため COL 量当たりで比較した。ピリジノリンは成長過程に沿って一定の割合で増加し、加齢期においても増加していた。加齢期についてのさらなる解析を続ける必

要があるが、ピリジノリンは成熟した関節軟骨の組織学的構造の変化がなくなる成熟期以降にも増加しており、加齢の程度を判別する指標の一つとなりうる可能性が示唆された。

<引用文献>

Kobayashi-Miura M, Miura T, Osago H, Yamaguchi Y, Aoyama T, Tanabe T, Matsumoto K, Fujita Y. Rat Articular Cartilages Change Their Tissue and Protein Compositions During Perinatal Period. *Anat Hist Embryo*, 45,2016 , 9–18

Osago H, Kobayashi-Miura M, Hamasaki Y, Hara N, Hiyoshi M, Tsuchiya M. Complete solubilization of cartilage using the heat-stable protease thermolysin for comprehensive GAG analysis. *Anal Biochem*, 548,2018,115-118

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hara N, Osago H, Hiyoshi M, Kobayashi-Miura M, Tsuchiya M	4. 巻 14
2. 論文標題 Quantitative analysis of the effects of nicotinamide phosphoribosyltransferase induction on the rates of NAD+ synthesis and breakdown in mammalian cells using stable isotope-labeling combined with mass spectrometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0214000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0214000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Osago H, Kobayashi-Miura M, Hamasaki Y, Hara N, Hiyoshi M, Tsuchiya M	4. 巻 548
2. 論文標題 Complete solubilization of cartilage using the heat-stable protease thermolysin for comprehensive GAG analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anal Biochem	6. 最初と最後の頁 115-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2018.02.028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mahbub MH, Yamaguchi N, Takahashi H, Hase R, Ishimaru Y, Sunagawa H, Amano H, Kobayashi-Miura M, Kanda H, Fujita Y, Yamamoto H, Yamamoto M, Kikuchi S, Ikeda A, Kageyama N, Nakamura M, Tanabe T	4. 巻 7
2. 論文標題 Association of plasma free amino acids with hyperuricemia in relation to diabetes mellitus, dyslipidemia, hypertension and metabolic syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-17710-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi N, Mahbub MH, Takahashi H, Hase R, Ishimaru Y, Sunagawa H, Amano H, Kobayashi-Miura M, Kanda H, Fujita Y, Yamamoto H, Yamamoto M, Kikuchi S, Ikeda A, Takasu M, Kageyama N, Nakamura M, Tanabe T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Plasma free amino acid profiles evaluate risk of metabolic syndrome, diabetes, dyslipidemia, and hypertension in a large Asian population.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Environ Health Prev Med.	6. 最初と最後の頁 22-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12199-017-0642-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi-Miura M, Osago H, Hiyoshi M, Hamasaki Y, Hara N, Tsuchiya M	4. 巻 145
2. 論文標題 Quantitative analyses of rat articular cartilage matrix during the maturation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mechanisms of Development	6. 最初と最後の頁 S131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mod.2017.04.361	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mahbub MH, Yamaguchi N, Takahashi H, Hase R, Amano H, Kobayashi-Miura M, Kanda H, Fujita Y, Yamamoto H, Yamamoto M, Kikuchi S, Ikeda A, Kageyama N, Nakamura M, Ishimaru Y, Sunagawa H, Tanabe T	4. 巻 22
2. 論文標題 Alteration in plasma free amino acid levels and its association with gout	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Environmental Health and Preventive Medicine	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12199-017-0609-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Namba F, Kobayashi-Miura M, Goda T, Nakura Y, Nishiumi F, Son A, Kubota A, Yodoi J, Yanagihara I.	4. 巻 80(3)
2. 論文標題 Human thioredoxin-1 attenuates the rate of lipopolysaccharide-induced preterm delivery in mice in association with its anti-inflammatory effect.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Pediatr Res.	6. 最初と最後の頁 433-439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/pr.2016.100.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kobayashi-Miura M, Osago H, , Takano I, Okada Y, Hiyoshi M, Hara N, Tsuchiya M
2. 発表標題 The comparison of matrix component between male and female articular cartilage in rat femur of the knee joint
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原伸正, 長子晴美, 日吉峰麗, 三浦美樹子, 土屋美加子
2. 発表標題 哺乳動物初代培養細胞におけるNAD+代謝の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長子晴美, 三浦美樹子, 河野通快, 原伸正, 日吉峰麗, 土屋美加子
2. 発表標題 ラット組織におけるコラーゲン、エラスチンのクロスリンク組成の比較
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦美樹子, 長子晴美, 日吉峰麗, 原伸正, 土屋美加子
2. 発表標題 ラット硝子軟骨の各関節部位によるコラーゲン (COL) とグリコサミノグリカン (GAG) 量の比較と加齢に伴う変化
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦 美樹子、長子 晴美、高野 育子、日吉 峰麗、原 伸正、土屋 美加子
2. 発表標題 新生仔から成獣におけるラット膝関節の大腿骨および脛骨関節軟骨のマトリックス構成成分の比較
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長子 晴美、三浦 美樹子、原 伸正、日吉 峰麗、土屋 美加子
2. 発表標題 関節軟骨におけるグリコサミノグリカン組成
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原 伸正、長子 晴美、日吉 峰麗、三浦 美樹子、土屋 美加子
2. 発表標題 NAD+代謝におけるSIRT1の関与について
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi-Miura M, Osago H, Hiyoshi M, Hamasaki Y, Hara N, Tsuchiya M
2. 発表標題 Quantitative analyses of rat articular cartilage matrix during the maturation
3. 学会等名 the International Society of Developmental Biologists 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kobayashi-Miura M, Osago H, Hiyoshi M, Hara N, Tsuchiya M
2. 発表標題 Qnaititative analyses of GAG and collagen in rat articular cartilage during the maturaion
3. 学会等名 Consortium of Biological Sciences 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kobayashi-Miura M, Osago H, Hiyoshi M, Hara N, Tsuchiya M
2. 発表標題 The characterization of matrix contents in the articular cartilage of the knee at the perinatal rats
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 長子 晴美、三浦 美樹子、濱崎 由文、原 伸正、日吉 峰麗、土屋 美加子
2. 発表標題 定量的オミクス解析のための結合組織の完全可溶化の試み
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考