

平成 22 年 2 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791526
 研究課題名（和文） 関節軟骨維持におけるマスピンの役割と DDS を利用した関節炎治療薬としての可能性
 研究課題名（英文） Investigation of physiological role of maspin on the maintenance of integrity of articular cartilage and the possibility of maspin as a novel therapeutic agent for arthritis
 研究代表者
 徳山 麗子 (TOKUYAMA REIKO)
 徳島大学・大学院ヘルスパイオサイエンス研究部・助教
 研究者番号：20380090

研究成果の概要（和文）：

現在まで、セリンプロテアーゼインヒビターであるマスピンと正常軟骨との関連についての研究はほとんど無い。本研究ではマスピンが関節軟骨の永久軟骨に発現していることを確認した。さらにラット膝関節において関節腔内でマスピン蛋白質を阻害することにより著明な関節破壊が起こることを組織学的に確認した。また、作製したマスピン蛋白質を関節炎モデルラットに投与することで関節炎治療薬としての可能性が示唆された。今後はこの成果を元に、マスピンを実際に治療薬として用いることができるかについてさらに検討を重ねる予定である。

研究成果の概要（英文）：

Maspin is a serine protease inhibitor. Little is known on maspin expression on skeletal and cartilage tissue. In this study, we confirmed that maspin was expressed on chondrocyte of articular cartilage. Moreover, after injection of anti-maspin antibody into knee joints of rats, articular cartilage tissues were destructed following inflammatory reactions. Then, recombinant maspin protein injection may prevent the destruction of tissues by arthritis. To elucidate this, more focused studies will be necessary in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：マスピン、TGF- β 、セリンプロテアーゼインヒビター、関節軟骨、関節炎、関節炎治療薬

1. 研究開始当初の背景

現在、日本の人口の約0.4~0.5%、30歳以上の人口の1%にあたる人が関節リウマチに罹患し、また1000万人以上が変形性関節症に罹患している。関節リウマチや変形性関節症などは、何らかの原因による関節軟骨の破壊に起因し、現在までに多数の対症療法は行われているが、根本的な治療法はないのが現状である。これらの疾患は全身に症状が現れることも少なくなく、顎関節を含む顎顔面領域にも様々な症状を呈する。これらの疾患の病態解明とともに根本的治療となりうるような新規治療法の開発が強く望まれており大きな課題の一つである。

一方、マスピンはセリンプロテアーゼインヒビターの一つであり、現在までに多くの正常組織においてその発現が確認されている。その生物学的作用として現在までに腫瘍抑制作用、血管新生抑制作用が知られている。これらはプラスミンやプラスミノゲンアクチベーターなどを介して発揮すると考えられている。このプラスミン/プラスミノゲンアクチベーターシステムはTGF- β の細胞外基質への蓄積に大きく関与しており、これは骨組織においても重要な役割を果たすシステムである。そこでこれまで報告のほとんどなかったマスピンと骨組織の関連について検討すると、マスピンが骨組織の成熟過程において重要な役割を担っていることを示唆する結果が得られた。この実験過程において、さらに関節軟骨の永久軟骨にマスピンが強く発現していることを確認した。そこで、マスピン蛋白質が関節軟骨の恒常性維持に何らかの重要な生理的役割を担っている可能性について研究を行った。

2. 研究の目的

マスピンが関節軟骨の恒常性維持に必須であるということが分かれば、マスピンは軟骨代謝に重要な役割を担っているということである。マスピンはセリンプロテアーゼインヒビターであることから、関節炎などの関節関連疾患において破壊される細胞外基質に関して、マスピンが、関節軟骨の細胞外基質の蓄積などを介してその破壊を防いでいる可能性を検討することにより、実際の関節炎モデルに対してマスピンを補充するためにマスピン蛋白質を治療薬として用いることでその予防、進行抑制、治療薬となりうる可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* および *in vitro* におけるマスピンの発現の検討:

ラット膝関節を用いて関節軟骨におけるマスピンの発現について免疫組織化学的手法により解析した。また、初代培養ラット軟骨細胞を用いてRT-PCR法によりマスピンmRNAの発現を解析すると共に免疫細胞化学的手法およびウェスタンブロット法によりマスピン蛋白質の発現を検討した。

(2) マスピン蛋白質の機能阻害が関節軟骨組織に及ぼす影響の検討:

ラット膝関節腔内にマスピンに特異的な中和抗体を注入することによりマスピン蛋白質の機能を阻害し、このラット膝関節の経時的变化を組織学的に観察することで、マスピンの機能阻害が関節軟骨組織に及ぼす影響を検討した。

(3) マスピン蛋白質の作製:

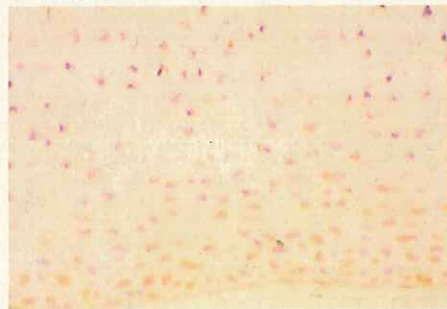
マスピン遺伝子を組み込んだマスピン遺伝子発現ベクターを作製し、それを大腸菌内で発現させることにより、マスピン蛋白質を作製した。

(4) マスピン蛋白質の関節炎に及ぼす影響の検討:

ラットにニワトリII型コラーゲンを用いてII型コラーゲン誘発関節炎を惹起し、このラットの膝関節に先に作製したマスピン蛋白質を投与することにより関節炎、関節破壊の発症・進行に対するマスピン蛋白質の影響につき、組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) ラット膝関節の永久軟骨にマスピンの発現を認めた。また、初代培養ラット軟骨細胞にmRNAレベルおよび蛋白質レベルでマスピンの発現を認めた。



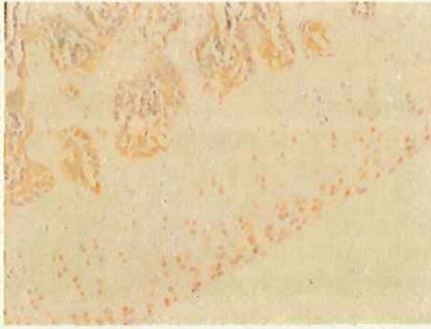


図1 ラット膝関節におけるマスピンの発現

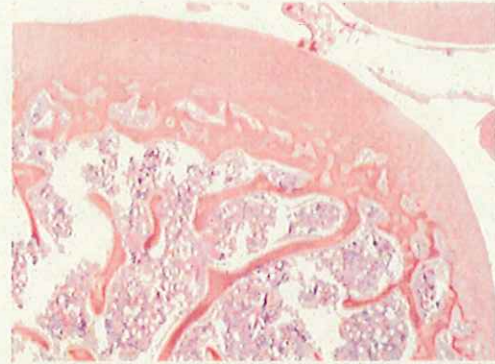


図2 初代培養ラット軟骨細胞とマスピン蛋白質の発現

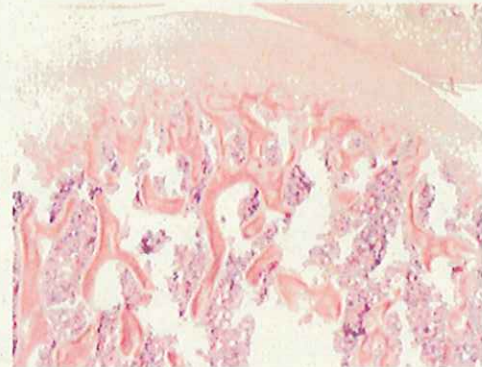
(2) ラット膝関節にマスピンに特異的な中和抗体を注入したところ、2週間後には膝関節に炎症が起こり組織破壊が認められた。



図3 関節破壊の起こった膝関節組織



同様に関節破壊の起こった膝関節



コントロール群の正常関節

(3) 人工的に作製したマスピン蛋白質を、関節炎モデルラットの膝関節に注入することで関節炎の進行抑制、予防につながる可能性が認められた。今後さらに、実際にマスピン蛋白質が関節炎や関節破壊性疾患の進行予防や新規治療薬として用いることが可能かどうか詳細な検討を重ねる必要がある。

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1件)

- ① 徳山麗子 マスピンは潜在型 TGF- β の蓄積を介して骨基質の成熟に関与している 四国歯学会雑誌、21(2): 341-348、2009、査読あり

[学会発表] (計4件)

- ① Tokuyama R, Purevsuren D, Kudoh K, Satomura K. Maspin, a serine protease inhibitor, is involved in bone

matrix maturation, integrity of articular cartilage and tooth development. The 26th NAITO Conference on osteobiology, 2009, Awaji, Hyogo

- ② 徳山麗子、プレブスレンダワドルジ、工藤景子、里村一人 歯の発生過程におけるマスピンの関与 第63回日本口腔科学会学術集会 2009 浜松、静岡
- ③ プレブスレンダワドルジ、徳山麗子、工藤景子、里村一人 Possible involvement of maspin in tooth development. The International Symposium on Oral Sciences to Improve the Quality of Life, 2009 Tokushima, Tokushima
- ④ 徳山麗子、里村一人、プレブスレンダワドルジ、ほか 骨組織成熟過程に関与するマスピンは軟骨組織形成や歯の発生にも影響している。第62回日本口腔科学会学術集会。2008。福岡、福岡。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳山 麗子 (TOKUYAMA REIKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：20380090

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：