

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700532

研究課題名（和文）

発生過程の関節軟骨の力学特性とリハビリテーションの基礎的研究

研究課題名（英文）

Property of articular cartilage during maturation for a basic study of rehabilitation

研究代表者

三浦 美樹子 (MIURA MIKIKO)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：40447925

研究成果の概要（和文）：本研究は、発生過程の中で出生前日の胎児（E19）と出生後 1 日以内の新生仔（P0）から大腿骨膝関節軟骨を採取し、力学的特性が著しく変化することを示した。短い期間での力学的性質の変化の原因を探るために、組織学的、生化学的方法を用いて解析を行った。プロテオミクス解析により、発現しているタンパク構成が出生前後で大きく変わる事が示された。組織学的な観察から、成熟関節軟骨に特徴的な層構造の形成はまだ見られず、形態学的な大きな変化は関節軟骨部には見られなかった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we compared the mechanical property of femur articular cartilage from knee joint between fetus day19 (E19) and neonate (P0). As a result, it was shown that the property was dramatically changed in perinatal period. We observed the articular cartilage histologically, but we could not find the intensive change. On the other hand, we could find the dramatical change on the protein expression pattern by proteomics analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学，リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：関節軟骨・発生

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は関節軟骨の変性／損傷により起こる高齢者に多い疾患で、日本だけでも

約 1000 万人の患者がいるとされてきた。近年、非侵襲的に X 線で診断される変形性膝関節症の患者数は日本の Research on

Osteoarthritis / Osteoporosis Against Disability (ROAD) プロジェクトのベースライン調査から 2530 万人と試算され、40 歳以上の有病率にして男性 42.6%、女性 62.4%、と従来考えられていた患者数よりも遥かに多いことがわかってきた (Yoshimura et al., 2009& 2010)。しかし、関節軟骨は無神経組織であるため、変性初期は自覚症状が全くない上に再生能力にも乏しいにもかかわらず、自覚症状があっても患者は加齢とともに積極的な治療を行わない人も多いと考えられる。実際の軟骨の状態と痛みの自覚症状がでるまでの関連や損傷の広がりについては非侵襲的な方法では限界も多く、未知の部分が多いため、有効なリハビリテーション法もわかっていない。

近年、変形性関節症の原因遺伝子として Growth differentiation factor 5 (Gdf5) が明らかになり、関節軟骨の形成に必須である事が示唆された (Furuichi and Ikekawa et al., 2007)。また、軟骨の分化や増殖には Bone morphogenetic protein (BMP)、副甲状腺関連ペプチド (PTH-related peptide, PTHrP) と Indian Hedgehog (IHH) 等の分泌性タンパクが重要な役割を示し (Tabin and Kronenberg 1996)、Gdf5 の発現パターンは IHH による支配を受けるという知見がある (Koyama et al., 2007)。

関節軟骨は組織量に対する細胞数が極端に少なく、組織は成体で 60-80% 水分以外の大部分は細胞外マトリックス (ECM) からなる。それゆえ、関節軟骨の形成には ECM の産生が必須である。その主たる構成成分である、コラーゲン繊維とプロテオグリカンは組織中に不均一に分布し、成熟した関節軟骨では、層状構造を形成する事が知られている。また、関節軟骨の再生能力は成熟とともに限られたものになる事が知られている。

軟骨細胞の分化により細胞が産するコラーゲン繊維やプロテオグリカンの種類が変化するが、骨に置き換わる骨端軟骨と永久軟骨である関節軟骨とでは、軟骨が形成される軟骨発生の初期の過程からすでに、産生される細胞外マトリックス成分のコラーゲンやプロテオグリカンの種類が変化するという知見もある (Bland and Ashhurst 1996 ; Kavanagh and Asshurst 1999)。関節軟骨細胞から産生され

る ECM の種類は、成熟後も加齢とともに変わっていく事 (Adkinsson et al., 2010) や ECM を構成するプロテオグリカンの糖鎖の長さや硫酸付加が変化する (Plaas, et al., 1997) との知見がある。

故に、関節軟骨細胞から産生される ECM の成分および時空間分布は関節軟骨の力学的特性を決める重要な因子であると同時に、軟骨組織の維持には力学的刺激が重要な因子である。生後の関節軟骨では、関節に負荷がかかる事によって、PTHrP が発現し、PTHrP-IHH による関節軟骨の維持される事が、マウス実験で示されている (Chen et al., 2008)。軟骨細胞培養系を用いた実験でも、PTHrP によりタイプ 2 コラーゲン等の細胞外マトリックスの発現が調節される事が示されている (Hoogendam et al., 2007)。しかし、成熟過程に於いて、軟骨組織の ECM の変化にともなう力学的な特性の変化と再性能を失っていく要因などについては未知の部分が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は変形性膝関節症に対するリハビリテーションの基礎的研究として、軟骨再生能力が高く、組織の成熟が進む時期の関節軟骨に焦点を当てて、組織の発生、成熟にともなう力学的な特性の変化を明らかにする事である。

胎生期後半から幼児期にかけて関節軟骨が分化してくるが、出生後は重力負荷が加わる事により関節にかかる力学的負荷は著しく変化すると考えられる。力学的負荷の変化に対応して、出生前後の関節軟骨の特性の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

実験動物ラットの出生前の胎児期から新生児期にかけての大腿骨膝関節軟骨を用い、次の実験を行い、出生前後の比較を行った。

(1) 力学的解析

出生前後の関節軟骨に対して、万能試験機を用いて、圧縮-弛緩の反復試験を行った。硬さや圧縮-弛緩の反復による硬さの安定性を比較した。

(2) 生化学的解析

力学的性質に影響を与える組織構成(水分、ECM組成)を比較した。

①水分含量の比較

回収した膝関節軟骨の重量を測定後、凍結乾燥し乾燥後の重量を測定し、水分含量(%)を比較した。

②タンパク発現の網羅的解析

出生前後の関節軟骨をそれぞれ溶解後、nanoLCによる分画後、MALDI-タンデムTOF/MSにより網羅的にタンパク発現を比較した。

③糖鎖解析

④ECM構成の比較

出生前後の関節軟骨を可溶化し、プロテオグリカンのうち主な主成分であるグルコサミノグリカン(GAG)とコラーゲンに特徴的な4アミノ酸毎に配列するヒドロキシプロリン(HP)量を比較した。

(3) 組織学的解析

① 一般染色

ヘマトキシリン/エオジン(HE染色)

トルイジンブルー染色(硫酸付加糖鎖染色)

②免疫染色

線維軟骨のマーカーであるタイプIコラーゲン関節軟骨マーカーであるタイプIIコラーゲンについて、トリプシンおよびヒアルロニダーゼで賦活化後、ラット交差性の確認されている抗ヒトモノクローナル抗体を用いてABC法を行った。DABにより可視化した。

③細胞密度計測

出生前後の関節軟骨組織は明確な層構造が見られないが、明確な層の違いが見られない部分を等分して、表層、中間層、深層の細胞密度に付いて比較した。

4. 研究成果

(1) 力学的解析

①膝関節軟骨の力学的性質が出生前後で大きく変化した。

②生後の膝関節軟骨の力学的性質はより安定であった。

(2) 生化学的解析

①水分含量

出生前後で変化していた。

②タンパク発現の網羅的解析

出生前後で多くのタンパク発現パターンが変わった。出生前と出生後とで、多く発現しているタンパクの機能には特徴が見られた。

③糖鎖解析

成熟段階によって、糖鎖の硫酸付加修飾の位置に特徴的な傾向が見られるようであった。

④ECM構成の比較

GAG/HPも成熟段階によって、その比率が変化する傾向がみられるようであった。

(3) 組織学的解析

①一般染色

HE染色では、出生前後の関節軟骨組織で大きな変化は見られず、層構造も不明瞭で均一な構造をしていた。GAGなどの糖質を染色するトルイジンブルー染色でも比較的均一に染色されたが、成熟段階によって、層による濃淡が見られた。糖質の局在化が見られた。

②免疫染色

出生前後ではタイプIおよびタイプIIコラーゲンともに均一に発現していたが、成熟段階が進むとタイプIコラーゲンは表層に、タイプIIコラーゲンはより深い層に局在化がみられた。

③細胞密度

成熟段階が進むに連れて、深部ほど細胞密度が有意に減少した。また、表層部の細胞密度は出生前後で大きく変化したものの(p<0.05)、生後の細胞密度は有意な変化はみられなかった。

重力付加が生じる出生前後の短期間に、関節軟骨の性質は、水分含量、細胞密度やECMの組成が顕著に変化するとともに力学的特性も変化している事が示された。ECMを構成するタンパク群の発現の変化がどのようなメカニズムで進むのか、力学的な付加がどのように関わるのか等明らかでない。また、短期間での力学的な特性の変化の要因を解明するには、ECMを構成するプロテオグリカンの糖鎖長や硫酸付加やコラーゲン線維の重合度等などのさらなる解析が必要である。現在、解析を進めている。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

①三浦美樹子, 太谷浩, 安井幸彦, 三浦岳,

青山朋樹, 田邊剛, 藤田委由 S 大学篤志献体者に対する教育解剖後の膝関節軟骨の剖検と疫学的調査, 第 118 回日本解剖学会, 平成 25 年 3 月 28 日, 香川 サンポートホール高松・かがわ国際会議場

②三浦美樹子, 三浦岳, 山口佳美, 松本健一, 今出真司, 内尾祐司, 青山朋樹, 田邊剛, 藤田委由, 重力負荷が変化する出生前後のラット膝関節軟骨の軟骨マトリックスの変化, 第 117 回日本解剖学会, 平成 24 年 3 月 26-28 日, 山梨 山梨大学

③Mikiko Kobayashi-Miura, Takashi Miura, Yoshimi Yamaguchi, Tsuyoshi Tanabe, Tomoki Aoyama, Akira Ito, Hiroki Amano, Shinji Imade, Yuji Uchio, Yasuyuki Fujita Changing mechanical specificity of cartilage matrix between fetus and newborn animals, 第 44 回日本発生物学会, 平成 23 年 5 月 18-21 日, 沖縄 沖縄コンベンションセンター

④土本浩司, 三浦美樹子, 青山朋樹, 伊藤明良, 橋本幸次郎, 小倉祥子, 三井裕人, 石橋誠, 黒木裕士, フーリエ変換赤外分光光度計による半月板の解析, 第 24 回軟骨代謝学会, 平成 23 年 3 月 4-5 日, 福岡 九州大学医学部百年講堂

⑤伊藤明良, 三浦美樹子, 青山朋樹, 橋本幸次郎, 小倉祥子, 三井裕人, 石橋誠, 黒木裕士, 関節軟骨に対する低出力超音波の即時効果, 第 24 回軟骨代謝学会, 平成 23 年 3 月 4-5 日, 福岡 九州大学医学部百年講堂

⑥Mikiko Kobayashi-Miura, Tomoki Aoyama, Hiroto Mitsui, Makoto Ishibashi, Hiroshi Kuroki, Development and regeneration of the articular cartilage 関節軟骨の発生と再生, 第 43 回日本発生物学会, 平成 22 年 6 月 21-22 日, 京都 宝ヶ池国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 美樹子 (MIURA MIKIKO)
島根大学・医学部・助教
研究者番号: 40447925

(2) 連携研究者

青山 朋樹 (AOYAMA TOMOKI)
京都大学・医学部・准教授

研究者番号: 90378886

内尾 祐司 (YUJI UCHIO)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 20223547

大谷 浩 (OHTANI HIROKI)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 20160533

黒木 裕士 (KUROKI HIROSHI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 20170110

田邊 剛 (TANABE TSUYOSHI)
山口大学・医学部・教授
研究者番号: 80260678

土屋 美加子 (TSUCHIYA MIKAKO)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 90188582

藤田 委由 (FUJITA YASUYUKI)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 70173440

三浦 岳 (MIURA TAKASHI)
九州大学・医学部・教授
研究者番号: 10324617

安井 幸彦 (YASUI YUKIHIKO)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 30174501

(3) 研究協力者

長子 晴美 (OSAGO HARUMI)
島根大学・医学部・研究員

山口 佳美 (YAMAGUCHI YOSHIMI)
九州大学・医学部・技術補佐員