

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 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791392

研究課題名（和文）性ホルモンの軟骨代謝への関与の解析、及びその組織修復への応用

研究課題名（英文）The effect of sex hormone on cartilage metabolism

研究代表者

箕田 行秀 (MINODA YUKIHIDE)

大阪市立大学 大学院医学研究科 整形外科学 講師

研究者番号：90453133

研究成果の概要（和文）：エストロゲンの軟骨への影響を調べるためには全身性の受容体 KO マウスでは不十分であり、軟骨特異的 KO マウスの作成が重要であると考え、cre-loxP システムを用いて、Col11-Cre マウスと、ER-Flox マウスを掛け合わせ、type XI collagen の発現する組織（軟骨）で ER が除去されるマウス（軟骨特異的 ER α -KO マウス）を作成した。同時に、軟骨前駆細胞株である ATDC-5 や正常マウスの肋軟骨から軟骨細胞を分離し、培養する。そして、それらの細胞の軟骨分化に対するエストロゲンの影響を調査したところ、エストロゲンの濃度依存性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The effect of sex hormone on cartilage metabolism is unclear, and little has been reported about the effects of estrogen on the cartilage differentiation. Estrogen is essential for maintaining the balance between osteoblastic and osteoclastic activity during bone remodeling in adults. To investigate the mechanism by which estrogen enhances chondrogenic differentiation, in vitro experiments were carried out using ATDC5 cells (a mouse pre-chondrogenic cell line) and primary cultured chondrogenic cells of mouse rib. Alcian blue staining for cartilage nodules and real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for the expression of genes encoding type II collagen, type X collagen and aggrecan, were performed in cells treated with estrogen. The expression level of aggrecan and type II collagen in cells, a marker of chondrogenic differentiation, was consistently elevated by low dose of estrogen (10^{-12} M) and was suppressed by high dose (10^{-6} M). ATDC5 and primary cultured chondrogenic cells treated with certain concentration of estrogen have higher expression of Col II and aggrecan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：エストロゲン、軟骨代謝、ノックアウトマウス、cre-loxP システム

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症が閉経後の女性に多いことから、女性ホルモン（エストロゲン）減弱と変形性関節症の関連が伺われ、動物実験でも卵巣摘出動物の関節軟骨変性が促進するとの報告がある。しかしながら、性ホルモンの関節軟骨に対する直接の影響については明らかにされていない。女性ホルモンであるエストロゲンは、男性ホルモンであるアンドロゲンとともに核内受容体を持つ。エストロゲン受容体（estrogen receptor; ER）ERには α と β の2種類あるが、骨組織には α が多く発現されている。全身でのER α ノックアウトマウス（knockout mouse; KOマウス）は骨へのエストロゲンシグナルが入らないために骨粗鬆症を発症すると予想されたが、実際には骨粗鬆症を生じなかった。これはER α -KOのため代償的に上昇したテストステロン（アンドロゲンの1種であるテストステロンは、アロマターゼによりエストロゲンへと変換される）の影響であった。このことから、性ホルモンの軟骨への影響を調べるためには全身性の受容体KOマウスでは不十分であり、軟骨特異的KOマウスの作成が重要であること、およびエストロゲンのみならずアンドロゲンの作用も調べる必要があることは明らかである。

本提案では、性ホルモンの関節軟骨へのin vivoの影響を明らかにするために、卵巣摘出マウス、軟骨特異的ER α -KOマウス、さらには軟骨特異的アンドロゲン受容体（androgen receptor; AR）-KOマウスを作成

し、関節軟骨の変性を検証することにより、性ホルモンの関節軟骨変性への影響を明らかにする。さらに、株化軟骨細胞、あるいは正常およびこれらのKOマウスから分離した軟骨細胞の培養系における性ホルモン関連因子の発現、各種細胞内伝達物質を調べることにより、軟骨細胞に対する性ホルモンの作用メカニズムを明らかにする。最終的には、動物実験で軟骨細胞への性ホルモンの作用を増強することによる関節軟骨への影響を明らかにし、変形性膝関節症の進行予防方法の開発の一助としたいと考える。

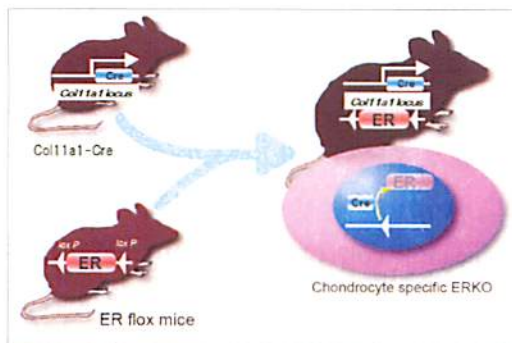
我々は、細胞移植を必要としない修復方法として、これまで骨形成蛋白（bone morphogenetic protein; BMP）のシグナル伝達系を研究し、その促進により骨軟骨欠損修復の研究を行ってきた（J Bone Min Metab 26(2):152-158,2008）。さらに細胞内cAMP濃度を上昇させる薬剤（[Phosphodiesterase{PDE}の阻害剤{pentoxifylineやrolipram、PDEのsiRNAなど}]がBMPと協調して骨軟骨形成を促進することを明らかにしてきた（Bone 41(4):543-548,2007）。この研究を核内受容体を持つ性ホルモンに広げ、これらのシグナルとBMPシグナルの相互関係（クロストークなど）を明らかにし、細胞移植を必要としない組織修復促進方法を開発する。

2. 研究の目的

In vivoでの性ホルモンの関節軟骨への作用を調査するために卵巣摘出マウス、全

身性 ER α -KO マウスの関節軟骨の組織学的解析を行ってきた。今後、軟骨特異的 ER α -KO マウスおよび軟骨特異的 AR-KO マウスの関節軟骨の組織学的解析を行う。また、軟骨代謝における性ホルモンなどの関与については、これらの軟骨特異的性ホルモン受容体 KO マウスの発生過程の軟骨の異常を調べることにより、前駆細胞から軟骨、骨への分化修復過程におけるアンドロゲンあるいはエストロゲンの役割を明らかにする。さらに、これらのマウスから分離した軟骨細胞を使って性ホルモンの軟骨代謝に関与するシグナル伝達系との関連を明らかにして、性ホルモンの軟骨代謝に及ぼす影響を明らかにする。さらには、これらの物質投与による骨軟骨欠損自然修復促進方法の開発のため、上記で明らかになった軟骨特異的性ホルモン受容体 KO マウスの軟骨代謝への影響を利用して、それらを促進する性ホルモン自体あるいは関連する薬剤 (Selective ER modulator; SERM 等) を投与することでの関節軟骨変性、あるいは修復に及ぼす影響を、動物実験で明らかにする。

3. 研究の方法

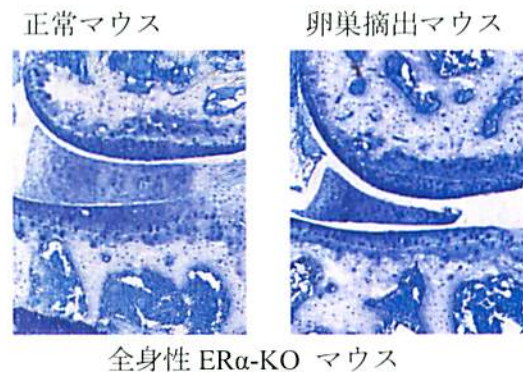


上図は当教室において作成中の、軟骨特異的 ER α KO マウスの模式図である。Col11-Cre マウスと、ER-Flox マウスを掛け合わせると、type XI collagen の発現する組織 (軟骨) で ER が除去されるマウス (軟

骨特異的 ER α -KO マウス) が生まれる。現在、AR、ER α 、PPAR γ の flox マウスは作成済みである。軟骨 Cre マウス作成のため Col11-Cre を基盤研究所から譲渡いただいて作製する予定である。

①卵巣摘出マウス、全身 ER α -KO マウスの膝関節の組織学的変化を経時的にフォローする。

全身 ER α -KO マウスの膝関節組織は東大分生研加藤教授より分与いただき、組織標本を作製した。卵巣摘出マウスも作成し、組織標本を作成した。そのトルイジンブルー染色の組織像を示す。



正常マウスに比較して、卵巣摘出マウスあるいは全身性 ER α -KO マウスでは関節軟骨表面の変性が認められる。それらのマウスの関節軟骨で生じている軟骨基質、軟骨の分解あるいは合成に関与する因子の経時的変化を、免疫組織染色、in situ

hybridization あるいは PCR 等で調べ、in vivo の変化を明らかにする。

②軟骨特異的 ER α -KO マウスの作成、およびその組織学的観察

軟骨特異的 ER α -KO マウスの作成を進める。軟骨特異的 ER α -KO マウスにも早期から軟骨変性が生じるか検証する。軟骨特異的 ER α -KO マウスの膝関節の軟骨の変性と、卵巣摘出マウス、全身 ER α -KO マウスの差違を明らかにする。これまでの経過から (卵巣摘出マウス、全身性 ER α -KO マウスで関節軟骨変性が生じかけている)、軟骨特異的 ER α -KO マウスでも変性が生じることが予想される。もし生じない場合には、半月板切除あるいは靭帯切断により変形性関節症を誘導する。これらの関節軟骨組織の免疫組織染色を行う (2型コラーゲン、1型コラーゲン、アグリカン、TGF β 、BMPs、Runx-2、MMPs など)。

③軟骨細胞株、マウス軟骨細胞の ER α 発現の確認、細胞内情報伝達系の解析

ATDC-5、正常マウス、軟骨特異的 ER α -KO マウスの肋軟骨から軟骨細胞を分離し、培養する。これらの細胞での ER α の発現を確認する。軟骨特異的 ER α -KO マウスでは発現が無いはずである。これらの細胞を培養し、軟骨基質発現量を確認する。性ホルモンと骨軟骨形成に関与する因子 (BMP、TGF β など) の関連を明らかにするために、これらの因子の細胞内情報伝達系 (Smads など) の発現量を調べる。

4. 研究成果

文献的にヒトおよびラット、サル、ウサギ、ウシ、ブタの関節軟骨において ER α の発現は確認されているが、まず、我々はマウス由来の軟骨前駆細胞である ATDC5 において ER α の発現を確認した (図 1)。

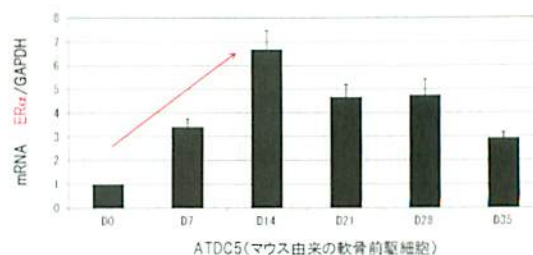


図 1

つづいて、ATDC5 におけるエストロゲン投与の影響を Alcian Blue 染色にて調べたところ高濃度 (10^{-6} M) のエストロゲンの投与にて Alcian Blue の染色性の低下を認めた。しかし、低濃度のエストロゲン投与による影響は認められなかった (図 2)。

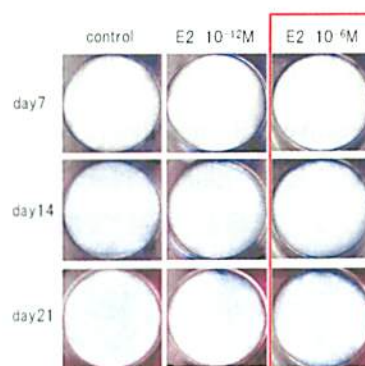


図 2

また、マウス関節軟骨から採取した初代培養軟骨細胞においてエストロゲン投与による影響を軟骨分化マーカー (aggrecan・col2・col10) についても調査したところ、aggrecan と col2 は低濃度 (10^{-12} M) のエストロゲンにより発現が有意に増強しており、また、高濃度 (10^{-6} M) のエストロゲン投与により有意に抑制されていた (図 3)。

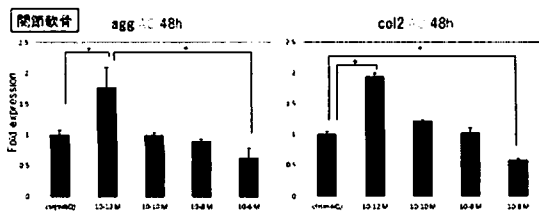


図 3

これよりエストロゲンは ER を介して軟骨分化過程において何らかの影響を及ぼしていることが分かったが、投与濃度によりその反応性が異なることが分かった。

また、同時に進めていた軟骨特異的 ER α -KO マウスの作成については、当初の予定通り Col11-Cre マウスと、ER-Flox マウスを掛け合わせ、type XI collagen の発現する組織（軟骨）で ER が除去されるマウスを作成することができた。引き続き、この軟骨特異的 ER α -KO マウスにおいても早期から関節軟骨において変性が生じるか検証するために組織学的評価を進める予定である。

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 17 件)

- ① Conventional or navigated total knee arthroplasty affects sagittal component alignment. Sugama R, Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ikebuchi M, Takaoka K, Nakamura H. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2012 Jan 20. [Epub ahead of print] 査読有
- ② Early biological fixation of porous implant coated with paste-retaining recombinant bone morphogenetic protein 2. Fukunaga K, Minoda Y, Iwakiri K,

Iwaki H, Nakamura H, Takaoka K. J

Arthroplasty. 2012;27:143-149. 査読有

- ③ Mid-term Mid-term clinical results of alumina medial pivot total knee arthroplasty. pivot total knee arthroplasty. Iida T, Minoda Y, Kadoya Y, Matsui Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Nakamura H. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2011 Nov 5. [Epub ahead of print] 査読有
- ④ Sagittal alignment of the lower extremity while standing in female. Sugama R, Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ikebuchi M, Hashimoto Y, Takaoka K, Nakamura H. (ア) Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2011 ;19:74-9. 査読有
- ⑤ A cemented mobile-bearing total knee prosthesis prevents peri-prosthetic bone mineral density loss around the femoral component -a matched cohort study- Minoda Y, Ikebuchi M, Kobayashi A, Iwaki H, Inori F, Nakamura H. J Bone Joint Surg Br. 2010;92:794-8. 査読有
- ⑥ Comparison of the bone mineral density between porous tantalum and cemented tibial components after total knee arthroplasty. Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ikebuchi M, Inori F, Takaoka K. J Bone Joint Surg Am. 2010 ; 92:700-6. 査読有
- ⑦ Analysis of sex and race and the size and shape of the distal femur using virtual surgery and archived computed tomography images. Barnes CL, Iwaki H, Minoda Y, Green JM 2nd, Obert RM.

J Surg Orthop Adv. 2010

Winter;19(4):200-8. 査読有

- ⑧ Are acetabular component alignment guides for total hip arthroplasty accurate? Minoda Y, Ohzono K, Aihara M, Umeda N, Tomita M, Hayakawa K. J Arthroplasty. 2010;25:986-9. 査読有
- ⑨ The risk of notching the anterior femoral cortex with the use of navigation systems in total knee arthroplasty. Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Mitsuhiko I, Kadoya Y, Ohashi H, Takaoka K, Nakamura H. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2010;18:718-22. 査読有
- ⑩ In vivo polyethylene wear particle analysis of improved material and design in TKA. Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Iwakiri K, Inori F, Sugama R, Ikebuchi M, Kadoya Y, Takaoka K. J Bone Joint Surg Am. 2009 ;91 Suppl 6:67-73. 査読有
- ⑪ In vivo comparison of wear particles between highly crosslinked polyethylene and conventional polyethylene in the same design of total knee arthroplasties. Iwakiri K, Minoda Y, Kobayashi A, Sugama R, Iwaki H, Inori F, Hashimoto Y, Ohashi H, Ohta Y, Fukunaga K, Takaoka K. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009;91(2):799-804. 査読有
- ⑫ Positive nasal culture of methicillin-resistant Staphylococcus aureus is a risk factor for surgical infection in orthopaedic surgeries. Yano K, Minoda Y, Sakawa A, Kuwano Y, Kondo K, Fukushima W, Tada K. Acta Orthop. 2009 80:486-90. 査読有

- ⑬ High incidence of patellar clunk syndrome in a recently designed mobile bearing posterior stabilized total knee prosthesis. Fukunaga K, Kobayashi A, Minoda Y, Iwaki H, Hashimoto Y, Takaoka K. J Bone Joint Surg Br. 2009;91(4):463-8. 査読有
- ⑭ Comparison between highly cross-linked and conventional polyethylene in total knee arthroplasty. Minoda Y, Aihara M, Sakawa A, Fukuoka S, Hayakawa K, Tomita M, Umeda N, Ohzono K. Knee. 2009;16(5):348-51. 査読有
- ⑮ TKA sagittal alignment with navigation systems and conventional techniques vary only a few degrees. Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ohashi H, Takaoka K. Clin Orthop Relat Res. 2009;467(4):1000-6. 査読有
- ⑯ Range of Motion of Standard and High-Flexion Cruciate Retaining Total Knee Prostheses. Minoda Y, Aihara M, Sakawa A, Fukuoka S, Hayakawa K, Ohzono K. J Arthroplasty. 2009;24(5):674-80. 査読有
- ⑰ Acetabular component orientation in intra- and postoperative positions in total hip arthroplasty. Hayakawa K, Minoda Y, Aihara M, Sakawa A, Ohzono K, Tada K. Arch Orthop Trauma Surg. 2009;129(9):1151-6. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Intra-Operative Assessment Of Mid-Flexion Instability In Total Knee Arthroplasty Minoda Y, Nakagawa S, Kadoya Y, Kobayashi A, Tomari H, Kondo M, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida

- T, Matsui Y, Sumitomo A, Sugama R, Mizokawa S, Higuma Y, Noguchi T, Hirakawa H, Nakamura H. Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (ORS) 2012.2.4. San Francisco, CA, USA.
- ② Minoda Y, Nakagawa S, Kadoya Y, Kobayashi A, Tomari H, Kondo M, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Matsui Y, Sumitomo A, Sugama R, Mizokawa S, Higuma Y, Noguchi T, Hirakawa H, Nakamura H. The Extension Gap Becomes Tight and Valgus After Implantation of Mobile-bearing Total Knee Prosthesis. Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (ORS) 2012.2.4. San Francisco, CA, USA.
- ③ Minoda Y, Nakagawa S, Kadoya Y, Kobayashi A, Tomari H, Kondo M, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Matsui Y, Sumitomo A, Sugama R, Mizokawa S, Higuma Y, Noguchi T, Hirakawa H, Nakamura H. Operative Technique Affected The Intra-operative Joint Kinematics Of Total Knee Arhtroplasty. Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (ORS) 2012.2.4. San Francisco, CA, USA.
- ④ Minoda Y, Hata K, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Miyazaki N, Miyake Y, Nakamura H. *In Vivo* Wear Particles of Annealed Highly Cross-Linked Polyethylene in Total Hip Arthropolsty. Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (ORS) 2012.2.4. San Francisco, CA, USA.
- ⑤ Hata K, Minoda Y, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Miyazaki N, Miyake Y, Nakamura H. *In Vivo* Wear Particles of Annealed Highly Cross-Linked Polyethylene in Total Hip Arthropolsty. Annual meeting of Orthopaedic Reserch Society (ORS) 2012.2.4. San Francisco, CA, USA.
- ⑥ Minoda Y, Watanabe K, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Iida T, Ikawa T, Hashimoto Y, Nakamura H. Annual meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS). 2011.2.7. San Diego, CA, USA.
- ⑦ Minoda Y, Watanabe K, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Iida T, Ikawa T, Hashimoto Y, Nakamura H. High incidence of anterior femoral cortex notching using navigation system in TKA. Annual meeting of American Association of Orthopaedic Surgeons. 2011.2.15. San Diego, CA, USA.
- ⑧ Minoda Y, Kobayashi A, Ikebuchi M, Iwaki H, Inori F, Hashimoto Y, Yoshida T, Iida T, Ikawa T, Yamasaki S, Nakamura H. Comparison of BMD around the Knee between Trabecular Metal and Cemented Tibial Component; Four-year Follow-Up Study. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2011.1.13. Long Beach, CA, USA.
- ⑨ Minoda Y, Iwaki H, Ikebuchi M, Yoshida T, Iida T, Ikawa T, Yamasaki S, Hirokai N. Flexion Gap Preparation Opens Both the Extension and Flexion Gap during Total Knee Arthroplasty. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2011.1.13. Long Beach, CA, USA.
- ⑩ Minoda Y, Kobayashi A, Ikebuchi M, Iwaki H, Inori F, Hashimoto Y, Yoshida

T, Iida T, Ikawa T, Yamasaki S, Nakamura H. A Cemented Mobile-Bearing Total Knee Arthroplasty Prevents Periprosthetic Loss of Bone Mineral Density around the Femoral Component; Four-year Follow-Up Study. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2011.1.13. Long Beach, CA, USA.

⑪ Minoda Y, Kadoya Y, Kobayashi A, Iwaki H, Iwakiri K, Iida T, Matusi Y, Ikebuchi M, Yoshida T, Nakamura H. Invited lecture; Future expectation of TKA. 24th Annual meeting of the International Society for Technology in Arthroplasty. 2011.9.20. Brues, Belgium.

⑫ Minoda Y, Hiroyoshi I, Ikebuchi M, Yoshida T, Nakamura H. BMD Change Under Bisphosphonate Therapy -Comparison Between Mobile and Fixed Bearing TKA Prostheses-. 24th Annual meeting of the International Society for Technology in Arthroplasty. 2011.9.20. Brues, Belgium.

6. 研究組織

(1)研究代表者

箕田 行秀 (Minoda Yukihide)

大阪市立大学大学院医学研究科 整形外科学・講師

研究者番号 : 90453133

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし