

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659680

研究課題名(和文) 先進的遺伝子工学と革新的生体光イメージングによる軟骨での TGF β 調節機構の解析研究課題名(英文) Analysis of the TGF- β signaling in cartilage by nonlinear optics imaging combined with genetic engineering techniques

研究代表者

三浦 裕正 (Miura, Hiromasa)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10239189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンを主成分とする軟骨基質を酵素処理により分解し、多光子励起顕微鏡を用いて SHG シグナルが経時的に変化する様子を捉えた。また、H2B-GFP ラインマウスを用いて、靭帯切除により変形性関節症を誘発する動物モデル系を確立し、これを多光子励起顕微鏡で観察することによって、軟骨細胞と軟骨基質の変化を経時的に評価することに成功した。さらに、老齢マウスにおける自然発症に近い変形性膝関節症の評価にも成功した。本研究成果は、非線形光学効果と遺伝子工学を組み合わせ、軟骨変性のメカニズムに迫るという点で画期的であり、治療の標的分子の同定や軟骨変性の評価のためのツールとして臨床応用に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Multi-photon microscopy enables to characterize and evaluate alternation of collagen matrix in vivo and in vitro based on second harmonic generation (SHG) signal. We performed SHG imaging of the cartilage degeneration induced by enzyme treatment. In the result, changes in SHG signal intensity were observed in the experimental samples. We also established an animal osteoarthritis model by syndesmeotomy using H2B-GFP line mice. We successfully evaluated over time the changes in cartilage matrix and chondrocytes by SHG and two-photon excited fluorescence. Furthermore, the articular cartilages of aged mice were observed as the same manner. In comparison with those of young mice, it was possible to evaluate them as spontaneous knee osteoarthritis. Our technique that combined genetic engineering and nonlinear interaction between the molecules and photons to approach the mechanism of cartilage degeneration is promising as a translational research leading to clinical application.

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：TGF- β 軟骨 軟骨変性 変形性関節症 SHG 2光子励起 Smurf

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症は、関節軟骨の変性や消失を来し、疼痛や機能障害などを引き起こす疾患である。我が国でも症状のある患者数は820万人と多く、今後も増加の一途をたどると予測される。しかしエビデンスのある予防法は少なく、軟骨再生の方法もない。その背景には軟骨変性の分子メカニズムが詳細に解明されていないという大きな問題が存在する。

そこで我々は、軟骨代謝のホメオスタシスにおいて重要な役割を果たしている分子のひとつである Transforming growth factor (TGF)- のシグナル調節機構を解析することによって、軟骨変性の分子メカニズムを明らかにしようと考えた。しかし、TGF- が骨・軟骨代謝に重要な働きを担っていることは分かっているが、このシグナルが骨・軟骨代謝以外の様々な生命現象に重要で、発生においても機能しているため、関連するノックアウトマウスの殆どは胎生致死となり軟骨変性の詳細な解析はできない。そこで TGF- シグナルの fine tuning に重要な Smad ubiquitin regulatory factor1(Smurf 1)と Smurf2 に焦点を絞り解析を進めることとした。

さらに、生体内における時空間的な分子の挙動を明らかにするため、多光子励起蛍光や第二高調波発生 (Second Harmonic Generation : SHG) などの生体分子と光の非線形な相互作用を利用した *in vivo* 光イメージングに着目した。このような非線形光学現象を利用することによって、軟骨基質を無染色で描出することが可能である。多光子励起顕微鏡による軟骨変性の観察の報告は少ないが、この技術を生体に応用することで、生体深部の観察や同一個体を経時的に観察することができる。

2. 研究の目的

これまでの軟骨の研究では、関節症などの変化を捉えるために病理標本に頼ることが必要不可欠であり、同一個体を *in vivo* で経時的に観察することが不可能であった。二光子励起蛍光や SHG などの非線形光学過程に基づいた光イメージング技術や多光子励起顕微鏡を利用して、従来までは捉えることが困難だった関節症極初期の微小変化を可視化し、モデル動物を用いた軟骨組織の *in vivo* 光イメージングを実現する。

TGF- シグナルは発生から免疫、癌まで様々な生命現象や疾患に関与しており、*in vivo* で特定の組織での役割を明らかにすることは困難である。特に硬組織である骨・軟骨は細胞生物学的研究が遅れている。本研究では骨軟および骨の代謝研究の問題点を克服するため、組織特異的に遺伝子の機能を失

わせたコンディショナルノックアウトマウスを作製し、Smurf 1/2 を介した TGF- シグナル調節系が軟骨代謝のホメオスタシスの破綻と、軟骨変性にどのように作用するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスの大腿骨を酵素により処理し、軟骨基質の分解を多光子励起顕微鏡を用いてモニタリングした。これにより軟骨基質の変化と基質中のコラーゲンに由来する SHG シグナルの強度にどのような相関があるのかを解析した。

(2) 関節症モデルは亀倉ら (OARS, Osteoarthritis Research Society, 2005, 13, 632-641) によって紹介された手法に準じて作製した。マウスの膝関節の靭帯、半月板を処置し、関節不安定性により変形性関節症を誘発し、X線写真および明視野観察および病理標本によって、発症を確認した。さらに、このモデル系を多光子励起顕微鏡を用いて観察し、変性軟骨の観察における SHG シグナルの強度や分布パターンを評価することの有用性を検討した。

(3) Smurf 1 と Smurf 2 の軟骨細胞特異的ダブルノックアウト (DKO) マウスを得るため、Smurf1 の flox マウスを作製し、既存の Smurf2 の KO マウスと、バッククロスを試みた。Smurf1/2 DKO マウスが樹立したのち、Col2-Cre トランスジェニックマウスを交配することにより軟骨特異的 Smurf1/2 DKO マウスを作製することを試みた。しかしながら、Smurf1 コンディショナルノックアウトマウスの作製途中で、遺伝子の欠失が判明し、当初目標としていた Smurf 1 と Smurf 2 の軟骨細胞特異的ダブルノックアウト (DKO) マウスを得ることができず、野生型マウスを用いた解析のみに研究の焦点を絞ることとした。

4. 研究成果

(1) 酵素による軟骨変性の定点観察
マウスの大腿骨を摘出し、*ex vivo* にてコラーゲナーゼによる酵素処理を行い、軟骨基質を酵素処理前と酵素処理後 0.5、1、2、4、6、8 時間で観察した結果、未処理の正常軟骨基質と比較し、処理軟骨では、肉眼的所見においては著変を認めないが (図 1 参照)、軟骨基質が分解されるにつれ、SHG シグナルは減弱し、軟骨基質表面が不整となった (図 2 参照)。

また、全身の細胞核 GFP を発現している H2B-GFP マウスを用いて、二光子励起蛍光と SHG を組み合わせることにより、軟骨細胞と軟骨基質の二色同時イメージングに成功した。酵素処理の結果、軟骨基質が分解され、軟骨細胞が軟骨基質の小腔から遊離する様子も観察された。一部では軟骨基質の何らかの構造物が残存するが SHG シグナルを発生さ

せない部分も観察された。SHG シグナルはコラーゲン含む軟骨基質由来であり、SHG シグナルにより正常軟骨と処理軟骨が判別でき、軟骨基質の分解がシグナルの減弱に反映されることが示唆された。

以上の観察結果より、酵素処理による軟骨変性を多光子励起顕微鏡を用いることで、SHG シグナルの強度や局在のパターンの変化として捉えることに成功した。

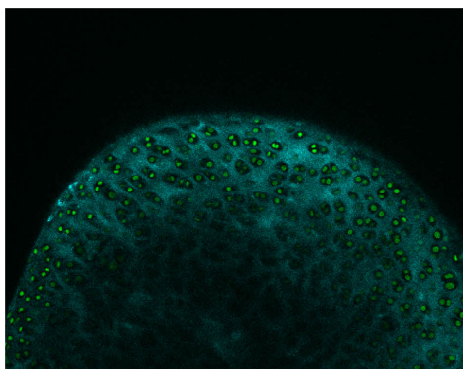


図 1 正常軟骨の多光子励起顕微鏡画像 (青：SHG, 緑：緑色蛍光蛋白 GFP)

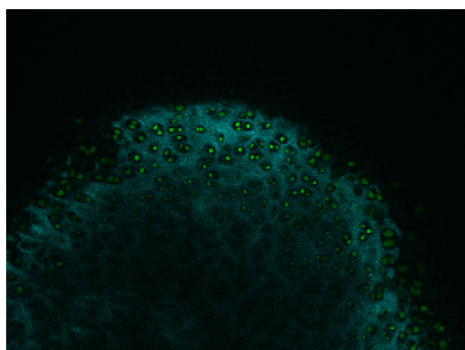


図 2 変性軟骨の多光子励起顕微鏡画像

(2) 酵素による軟骨変性の経時的観察

同様に、マウスの大腿骨を摘出し、*ex vivo*にてコラーゲナーゼによる酵素処理を行い、経時的に同一サンプルを同一視野にて、軟骨基質を観察した。その結果、PBS で処理した Control のサンプルと比較すると、経時的に SHG シグナルが減弱し、軟骨基質表面が不整になることが明らかになった。

軟骨基質の表面構造が不整になる様子および、基質そのものが分解される様子を同一サンプル，同一視野にて経時的に、軟骨の変性に由来すると考えられる SHG シグナルの変化を捉えること成功した。

(3) 変形性関節症モデルの観察

外科的手術により靭帯不安性を生み出し、変形性関節症を誘発するマウスを作製した。このマウスを経時的に観察することにより、X線写真では判別することができない、質的なあるいは微小な変化を多光子励起顕微鏡を用いて、解析を行った。その結果、軟骨に生じた質的な変化が SHG シグナルの強度や分布

のパターンに反映されることが示唆された。具体的には、軟骨細胞の減少や軟骨基質表面の不整像を認めた(図 4 参照)。一部では軟骨基質に微小な亀裂 (micro crack) を認めた(図 5 参照)。また、同様の処置をした別のサンプルにおいて、線維軟骨様の SHG シグナルの増強を認めたものもあった(図 6 参照)。

以上の研究結果より、多光子励起顕微鏡を用いて、靭帯不安性により誘発された変形性膝関節症モデルにおける軟骨変性を SHG シグナルの変化として捉えることに成功した。

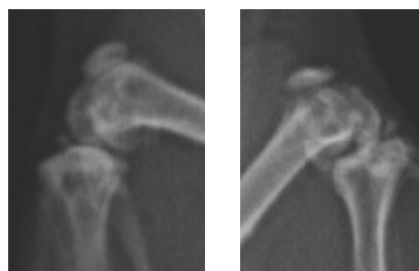


図 3 関節症モデルの X 線写真による観察
左) 正常関節
右) 靭帯不安性による関節症

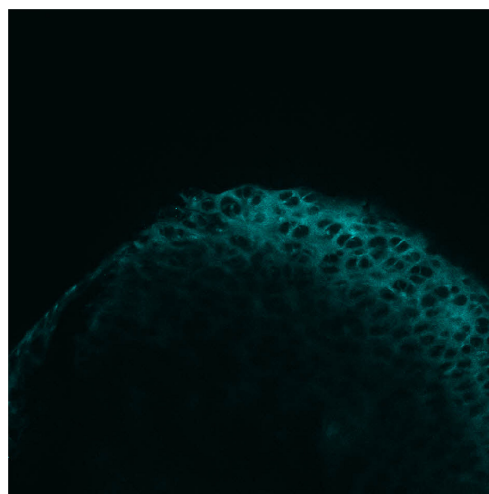


図 4 軟骨基質表面の不整像

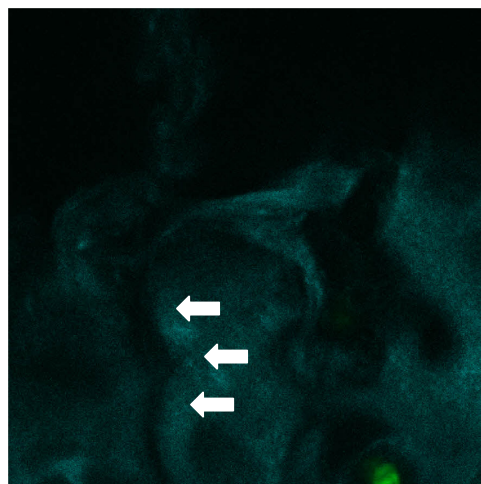


図 5 軟骨基質の微小な亀裂 (矢印)

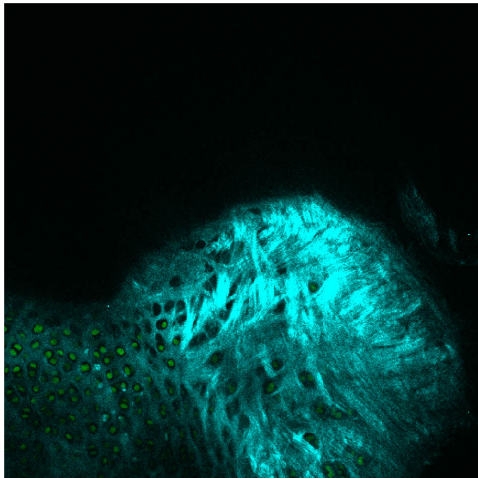


図 6 線維軟骨様の SHG シグナルの

(4)老齡マウスの軟骨基質の観察
 C57BL6 マウスの老齡個体(24 ヶ月齡)と若年個体(3 ヶ月齡)を入手し観察した。若年個体では、正常軟骨基質と著変は認めないが、老齡個体では、若年個体と比較し、軟骨基質表面は不整であり、SHG シグナルが弱いものや、著しいシグナルの増強を認めるものがあった。老齡マウスの加齡性軟骨変性を SHG シグナルで捉え、自然発症に近い関節症を観察することの成功した。

これらの研究成果より、非線形光学顕微鏡は、変形性関節症の分子メカニズムを明らかにする有用なツールとなり得、治療の標的分子の同定や、新しい軟骨変性の評価方法として期待できる。

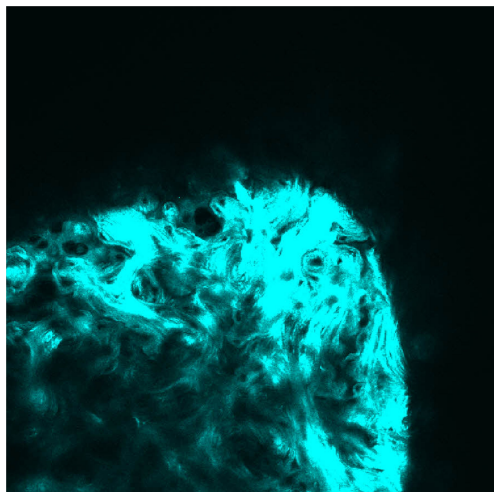


図 7 強い SHG シグナル発生する軟骨基質

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 7 件)

1. Hiroshi Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Tadahiro Imura, Takashi Saito, Tsuyoshi Miyazaki, Hiromasa Miura, Takeshi Imamura

Evaluation of cartilage based on second harmonic generation microscopy
 American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting 2014
 2014.9.12-15

2. 清松悠、大嶋佑介、疋田温彦、三浦裕正、今村健志

Evaluation of osteoarthritis based on second harmonic generation (SHG) imaging
 第 6 回 大学院専攻研究発表会
 2014.3.6-7 東温市

3. 清松悠、大嶋佑介、疋田温彦、三浦裕正、今村健志

Evaluation of osteoarthritis based on second harmonic generation (SHG) imaging
 第 4 回 Vivid Workshop
 2014.2.20-22 金沢市

4. Hiroshi Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, Takeshi Imamura

Evaluation of osteoarthritis based on SHG imaging
 TGF- family Signal Network and Live Imaging
 2013.10.28-30 Matsuyama

5. Hiroshi Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, Takeshi Imamura

Evaluation of osteoarthritis based on second harmonic generation microscopy
 American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting 2013
 2013.10.4-7 Baltimore, USA

6. Hiroshi Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, Takeshi Imamura

Evaluation of articular cartilage degeneration in mice based on second harmonic generation microscopy
 Conference on Laser Surgery and Medicine
 2013.4.23-26 Yokohama

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 裕正 (Miura, Hiromasa)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10239189

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

今村 健志 (Imamura Takeshi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70264421

疋田 温彦 (Hikita Atsuhiko)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60443397

飯村 忠浩 (Imura Tadahiro)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20282775

大嶋 佑介 (Yusuke Oshima)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20362717

宮崎 剛 (Miyazaki Tsuyoshi)

東京都健康長寿医療センター・東京都健

康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：50376480