

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462257

研究課題名(和文) 損傷軟骨治癒過程におけるシンデカン-4の役割の解析

研究課題名(英文) Functional role of Syndecan-4 in the process of osteochondral repair

研究代表者

小野寺 智洋 (ONODERA, TOMOHORO)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：70547174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は幼若個体を用いることで、C57Bl/6マウスにおける軟骨全層修復モデルの確立に成功した(Matsuoka M, Onodera T et al., Tissue Eng. 2015)。本モデルは我々が独自に開発したモデルであり、本申請から発展した骨軟骨修復過程の病態解析として、糖脂質欠損マウスを用いた解析を行った(Matsuoka M, Onodera T et al., Sci Rep. 2017)。また、我々が本モデルを用いてシンデカン4欠損マウスを用いて検討を行ったところ、予想に反して野生型と比べシンデカン4欠損マウスの軟骨修復は促進される傾向を示した。

研究成果の概要(英文)：We successfully developed novel osteochondral repair model by using young C57Bl/6 mice (Matsuoka M, Onodera T et al., Tissue Eng. 2015). This novel animal model made us to clarify the cartilage repair mechanisms in glycosphingolipid depletion mice (Matsuoka M, Onodera T et al., Sci Rep. 2017). In addition, we applied this animal model to Syndecan-4 knockout mice. Surprisingly, osteochondral repair in Syndecan-4 knockout mice is enhanced compare with wildtype mice.

研究分野：整形外科

キーワード：整形外科 軟骨損傷 軟骨再生 骨軟骨修復 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節軟骨病変を持つ患者は、55-70歳の70%に達することが知られており、社会的に重要な問題である。ケモカイン Stromal cell-derived factor-1(SDF-1)/pre-B cell growth-stimulating factor(以下 SDF-1)は、さまざまな組織の修復過程において重要な役割を担うことが知られている。研究分担者らはこれまで、腱・軟骨の修復過程における SDF-1 の役割に関して研究を行い、軟骨組織の修復において SDF-1 の発現が重要であることを明らかにしてきた(Tissue Eng Part A.2009, 2011)。SDF-1 が軟骨再生を実現させるうえで極めて重要な分子であることは明らかである。しかし、軟骨修復における SDF-1 の分子メカニズムは未だ不明である。

(2) シンデカン 4 は生体内に広く分布しているプロテオグリカンであり、軟骨代謝との関連が指摘されている (Echtermeyer F, Nature medicine 2009)。しかしシンデカン 4 の欠損は、変形性関節症の発症を増悪させるという報告がある一方、創傷治癒や骨折治癒に対しシンデカン 4 は促進的に働くという報告もあり(Bass MD, Development Cell 2011; Bertrand J, Arthritis Rheum. 2013)、関節軟骨の修復過程に対する役割は明らかとなっていない。また、シンデカン 4 は、SDF-1 に対するシグナル分子の一つであることは知られているが(Brue S, Glycobiology 2006)、その生体内における役割も明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、シンデカン 4 が関節軟骨損傷の修復過程において、ケモカイン SDF-1 を介した役割を解明することである。関節軟骨修復過程において、SDF-1 との分子相互作用を持つシンデカン 4 に着目し、関節軟骨修復メカニズムの更なる解明を目指す。本研究では、(1)関節軟骨損傷の修復過程の解析に必須なマウス軟骨修復モデルを作製し、(2)シンデカン 4 遺伝子の欠損が SDF-1 の機能に与える影響を調査することである。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウス骨軟骨損傷モデルの開発
動物実験では、KO マウス、野生型マウスにおける軟骨損傷モデルの作製、並びに KO マウス、野生型マウスの修復過程の解析を目標とする。我々はこれまで家兎軟骨損傷モデルや、マウス靭帯切離モデルなどを用いており、それらの技術を基盤として確立していく。近年、報告されたマウス骨軟骨損傷モデル (Eltawi NM Osteoarthritis and Cartilage 2008) は、遺伝子欠損マウスとして用いられることが最も多い C57BL/6 では適さなかったため、C57BL/6 軟骨修復モデルを独自に開発する。実験群は野生型マウス 36 匹を用いた。軟骨修復能の異なる、生後 3 週、4 週、6 週

の 3 群を用いた。Pentobarbital 腹腔内投与による全身麻酔下に 2.5 倍のサージカルルーペで観察を行いながら膝関節を展開し、大腿骨滑車部に、27G 針を用いて直径約 150 μ m、深さ 60 μ m の骨軟骨損傷を作製した (図)。逆側膝は関節の展開のみとし (Sham operation) 術後 3、4 週および 12 週にて各群 (n=6 at each time point) の再生組織を採取し、肉眼的評価および HE、Safranin-O 染色による組織定量評価を行った。各群 12 匹 24 膝 (4 週 12 膝、12 週 12 膝) に対して、同手技を施行した。

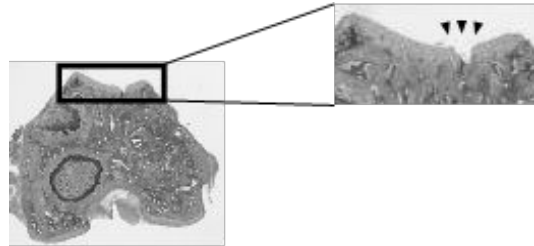


図1 C57BL/6 マウス骨軟骨欠損モデル
：作製された骨軟骨損傷

このモデルの妥当性・再現性を検討するために軟骨全層欠損を作製したマウスを day0 で安楽死させ、組織切片を作製した。軟骨の厚み、軟骨損傷の深さ、幅、面積を計測し、さらに軟骨の厚みと軟骨損傷の深さの比 (%depth) も算出した。また、術後 4 週 (n=6) および 8 週 (n=10) で組織切片を作成し HE 染色、Safranin O 染色を行った。軟骨修復の評価として、Wakitani らの Joint surface repair score を用いた (Wakitani S JBJS AM 1994)。

(2) C57BL/6 軟骨修復モデルに至適な週齢は、生後 4 週および 8 週に確立された。至適週齢の野生型マウスならびにシンデカン 4 遺伝子欠損マウスを用いて、軟骨修復モデルを作製した。術後 8 週で屠殺し、各 10 匹に対して組織学的評価 (Saf-0) を行った。

4. 研究成果

(1) 軟骨修復モデル開発

C57BL/6 マウスにおける軟骨全層欠損モデルの再現性について

Day0 における軟骨の厚み ($P < 0.01$)、軟骨損傷の深さ ($P < 0.01$) は週齢が若い程、有意に大きくなっていったが、幅に関しては各群間に有意差を認めなかった (図 2)。損傷面積は週齢が若い程、有意に大きくなっていったが ($P < 0.01$)、軟骨の厚み / 軟骨損傷の深さ (%depth) において各群間に有意差はなかった ($P = 0.13$) (図 3)。また、%depth の変動係数は 2 群とも 10% 以下であり軟骨損傷の再現性は 3 週齢 CV=6.17%、4 週齢 CV=7.62%、8 週齢 CV=7.45% といずれの週齢においても高い再現性を認めた (表 1)。

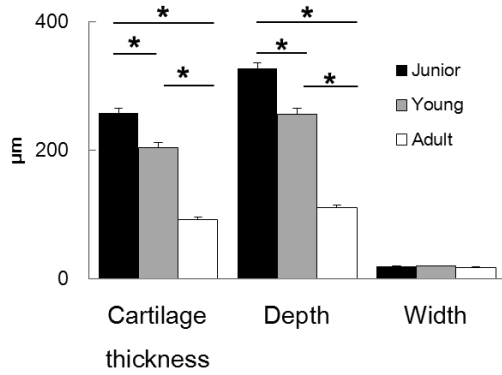


図 2 各週齢における軟骨厚 (Cartilage thickness)・作製された軟骨損傷の深さ (Depth)・幅 (Width) (Junior 生後 3 週、Young 生後 4 週、Adult 生後 8 週)

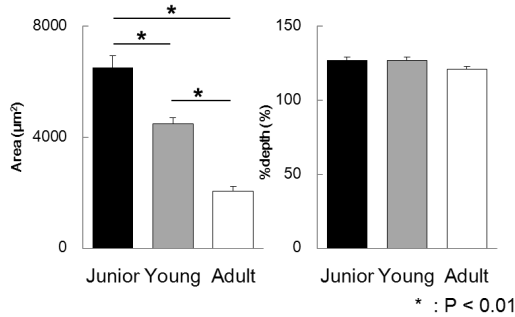


図 3 各週齢における軟骨損傷の面積 (Area)・軟骨の厚み/軟骨損傷の深さ (%depth) (Junior 生後 3 週、Young 生後 4 週、Adult 生後 8 週)

表 1

	Cartilage thickness (μm)	Depth (μm)	Width (μm)	Area (μm²)	%Depth (%)
Junior	258.05 ± 7.91 CV = 13.00%	327.03 ± 9.18 CV = 11.91%	20.29 ± 0.69 CV = 14.40%	6508.64 ± 425.37 CV = 27.73%	127.12 ± 1.85 CV = 6.17%
Young	203.76 ± 8.66 CV = 18.04%	256.64 ± 9.27 CV = 15.33%	20.12 ± 0.48 CV = 10.07%	4601.50 ± 210.00 CV = 19.36%	126.86 ± 2.28 CV = 7.62%
Adult	92.07 ± 7.91 CV = 16.79%	110.91 ± 4.36 CV = 16.69%	18.05 ± 0.93 CV = 21.90%	2051.98 ± 170.54 CV = 35.26%	120.82 ± 2.12 CV = 7.45%

これらの結果から、各週齢における軟骨全層欠損の作製手技の高い再現性が示された (Junior 生後 3 週、Young 生後 4 週、Adult 生後 8 週)

C57Bl/6 マウスにおける軟骨全層欠損モデルの妥当性について

術後 4 週および 8 週における軟骨修復を組織学的に検討したところ、8 週齢マウスにおいては、ほとんどのサンプルでは、一部線維性組織による修復が見られるものの軟骨全層欠損が残存しており、軟骨修復はほとんど見られなかった。4 週齢のマウスにおいては、8 週齢と比べて良好な軟骨修復を認められたものの、組織学的には修復組織はサフラニン O の染色性に乏しく、主に線維軟骨による修復と考えられた。一方で 3 週齢のマウスでは、4

週齢と比べ、更に良好な組織修復を認め、組織修復部はサフラニン O 染色に濃染する硝子軟骨様組織で修復されていた (図 4 - 6)。

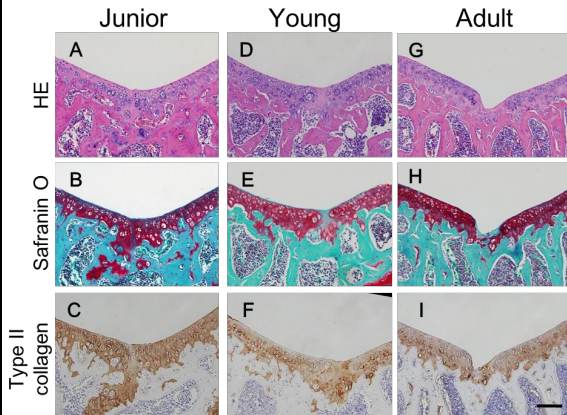


図 4 各週齢における代表的な軟骨修復 (Junior 生後 3 週、Young 生後 4 週、Adult 生後 8 週)

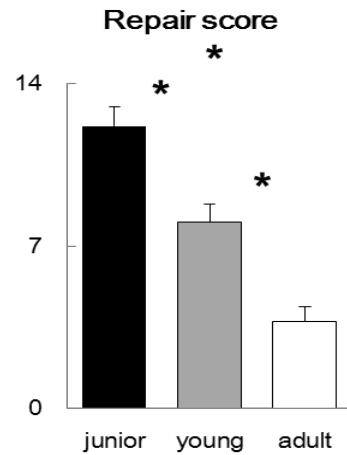


図 5 各週齢における軟骨修復スコア (Junior 生後 3 週、Young 生後 4 週、Adult 生後 8 週)

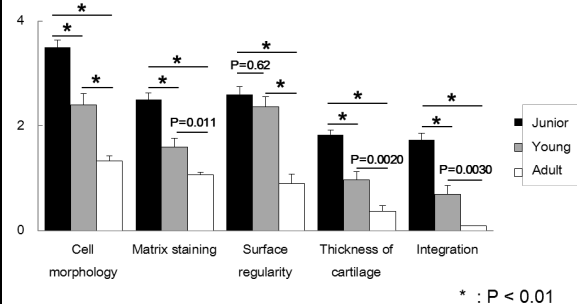


図 6 各週齢における軟骨修復スコアの内訳 (Junior 生後 3 週、Young 生後 4 週、Adult 生後 8 週)

これまで過去の報告において、これらの結果から、各週齢における軟骨全層欠損の作製手技の高い再現性が示された。

(2)軟骨修復モデルを用いたシンデカン - 4 遺伝子欠損マウスの解析

シンデカン - 4 遺伝子欠損マウスの軟骨修復

生後 4 週齢および 8 週齢の野生型マウス・シンデカン - 4 欠損マウスに対して、前述の新規関節軟骨修復モデルを用いて軟骨修復の解析を行った。

生後 4 週齢において、シンデカン 4 欠損マウスでは野生型マウスと比べ、統計学的優位に良好な軟骨修復を認めた ($P=0.0067$) (図 7)。

4 weeks (Juvenile)

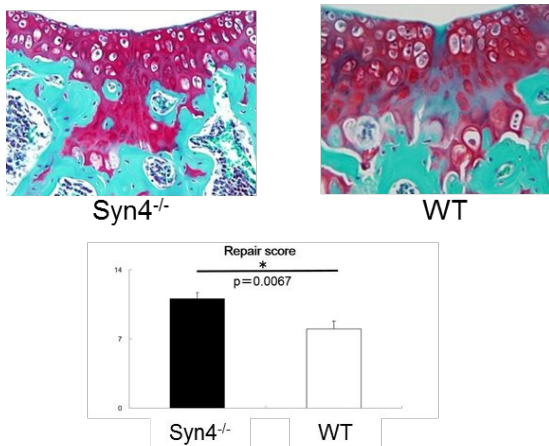


図 7 4 週齢マウスにおける軟骨修復 (Syn4^{-/-} シンデカン - 4 欠損マウス、WT 野生型マウス)

一方で生後 8 週齢においては、シンデカン 4 欠損マウスでは野生型マウスと比べて、同等の組織修復を認めた ($P=0.1873$) (図 8)。

8 weeks (Adult)

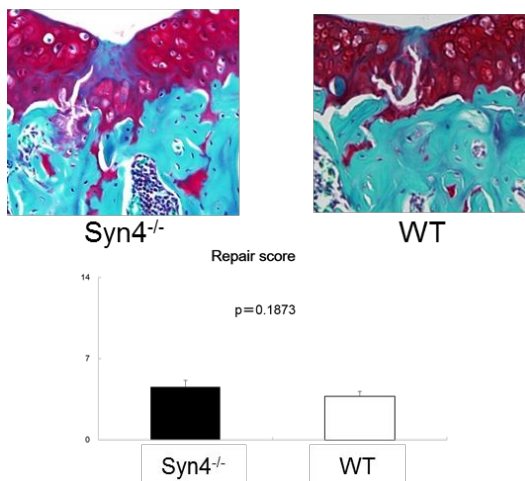


図 8 4 週齢マウスにおける軟骨修復 (Syn4^{-/-} シンデカン - 4 欠損マウス、WT 野生型マウス)

以上の結果から、本プロジェクトにおいて我々は幼若な個体を用いることによって、

C57Bl/6 マウスにおける軟骨全層欠損モデルの確立に成功した。本モデルは申請者が独自に開発したモデルであり、本申請から発展した骨軟骨修復過程の病態解析として、糖脂質欠損マウスを用いた解析を行い、国際的評価を得ている (Matsuoka M, Onodera T et al., Sci Rep. 2017)。また、我々が独自に開発したモデルを用いてシンデカン 4 欠損マウスを用いて検討を行ったところ、予想に反して野生型と比べシンデカン 4 欠損マウスの軟骨修復は促進される傾向を示した。今後はシンデカン 4 欠損マウスにおける軟骨修復促進のメカニズムに関して、詳しく調査していく予定である。

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 2 件)

1. Depletion of Gangliosides Enhances Articular Cartilage Repair in Mice. Matsuoka M, Onodera T, Homan K, Sasazawa F, Furukawa JI, Momma D, Baba R, Hontani K, Joutoku Z, Matsubara S, Yamashita T, Iwasaki N. Sci Rep. 2017 Mar 2;7:43729. 査読あり
2. An Articular Cartilage Repair Model in Common C57Bl/6 Mice. Matsuoka M, Onodera T, Sasazawa F, Momma D, Baba R, Hontani K, Iwasaki N. Tissue Eng Part C Methods. 2015 Aug;21(8):767-72. Epub 2015 Mar 18. 査読あり

[学会発表](計 8 件)

Matsuoka M, Onodera T, Homan K, Sasazawa F, Momma D, Baba R, Hontani K, Joutoku Z, Matsubara S, Iwasaki N: Depletion of Gangliosides Enhanced Articular Cartilage Repair by Suppressing the Chondrocyte hypertrophy Surrounding Repair Tissue. The 63th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Convention center (San Diego, USA) 2017.3.19-22

Matsuoka M, Onodera T, Sasazawa F, Momma D, Baba R, Hontani K, Joutoku Z, Matsubara S, Homan K, Iwasaki N: Depletion of Gangliosides Accelerated the Articular Cartilage Repair through Indian hedgehog pathway. The 62th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Disney's Coronado Spring Resort (Orlando, FL, USA) 2016.3.5-8

松岡正剛、小野寺智洋、笹沢史生、門間太輔、馬場力哉、本谷和俊、上徳善太、

松原新史、宝満健太郎、岩崎倫政：ガングリオシド欠損は Indian Hedgehog pathway を介し軟骨の肥大化を抑制する，第 29 回日本軟骨代謝学会，広仁会館(広島県広島市)，2016.2.19-20

松岡正剛、小野寺智洋、笹沢史生、門間太輔、馬場力哉、本谷和俊、岩崎倫政：ガングリオシド欠損は軟骨の肥大化を抑制することにより関節軟骨修復を促進する，第 30 回日本整形外科基礎学術集会，富山国際会議場（富山県富山市），2015.10.22-23

Matsuoka M, Onodera T, Sasazawa F, Momma D, Baba R, Hontani K, Iwasaki N: Depletion of the gangliosides accelerated the articular cartilage repair in mice. The 12th International cartilage repair society World congress, Sheraton Chicago Hotel & Towers (Chicago, IL, USA) 2015.5.8-11
Matsuoka M, Onodera T, Sasazawa F, Momma D, Baba R, Hontani K, Iwasaki N: Depletion of the gangliosides accelerated the articular cartilage repair in mice. The 61th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, MGM Grand Hotel (Las Vegas, NV, USA) 2015.3.28-31

松岡正剛、小野寺智洋、笹沢史生、門間太輔、馬場力哉、本谷和俊、岩崎倫政：ガングリオシド欠損は軟骨の肥大化を抑制することにより関節軟骨修復を促進する，第 28 回日本軟骨代謝学会，東京医科歯科大学(東京都文京区)，2015.3.16-17

松岡正剛、小野寺智洋、笹沢史生、門間太輔、馬場力哉、本谷和俊、岩崎倫政：汎用性の高い C57Bl/6 マウスにおける軟骨全層欠損モデルの確立，第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会，城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)，2014.10.9-10

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
小野寺 智洋 (ONODERA, Tomohiro)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号：70547174

(2)研究分担者
岩崎 倫政 (IWASAKI, Norimasa)
北海道大学・医学研究科・教授
研究者番号：30322803

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：