

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861183

研究課題名(和文) テネascinCの軟骨変性抑制作用における遺伝子発現の解析

研究課題名(英文) Prevention of articular cartilage degeneration using TNC :Analysis of gene expression

研究代表者

松井 佑梨世(matsui, yuriyo)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・リサーチアソシエイト

研究者番号：20727680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、関節軟骨の変性を抑制する新しい治療法として、テネascinC(TNC)に着目しており、これまでin vivoにおいて、変形性膝関節症モデルマウスの膝関節内にTNCを投与することで軟骨変性抑制効果を得られたことを報告した。

今回、in vitroにおいて、ヒト軟骨の培養細胞を用いTNCを添加しreal time PCRを行ったところ、TNCを添加しない群に比べ、TNC、炎症性サイトカインであるTNF、IL-1、軟骨基質代謝におけるanabolic factorであるTGF、TIMP3が有意に上昇し、軟骨破壊に関わるとされるADAMTS5は有意に発現が低下することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis (OA) constitutes an increasingly common medical problem for aging people. Tenascin-C (TNC) is an extracellular matrix glycoprotein. Our previous studies have demonstrated that 10 µg/ml of TNC could prevent cartilage degeneration in murine models of OA.

In this study, we performed real time PCR to reveal the mechanism of preventing cartilage degeneration in vitro study. In vitro study, 10 µg/ml of TNC upregulated the expression of TNC, TNF, IL-1, TGF and TIMP3. But 10 µg/ml of TNC downregulated the expression of ADAMTS5.

研究分野：整形外科

キーワード：テネascinC 変形性膝関節症 軟骨変性抑制

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は自己修復能がほとんどないため、変性軟骨に対する治療法はいまだに確立されたものがなく、整形外科領域において早急に解決されるべき課題のひとつである。

テネイシンC(以下TNC)は主に胎生期に発現する細胞外基質糖タンパクで、成人では正常であれば限られた部位でしか発現しないが、創傷治癒・再生・悪性腫瘍などの組織リモデリングで再発現することが知られている。関節軟骨におけるTNCは器官形成期に発現するが、軟骨細胞の成熟に伴って減少し、成人するとほとんど消失すること、変形性関節症(OA)軟骨において強く再発現することが知られている。

TNCの軟骨細胞に対する作用として、われわれはこれまで、in vitroにおいて、ヒト軟骨の培養細胞に10 µg/mlのTNCを添加すると軟骨細胞の増殖、プロテオグリカンの合成、アグリカンmRNAの発現がそれぞれ増強したことから、TNCの軟骨細胞増殖作用、プロテオグリカン合成促進作用を明らかとした(Nakoshi et al: J Orthop Sci 2010)。

さらに、軟骨修復におけるTNCの効果を、TNCノックアウト(KO)マウスと野生型(WT)マウスの関節軟骨変性過程を比較し、検討したところTNCKOマウスでは軟骨修復が不良であり、軟骨修復にTNCが必要であることが明らかとなった。さらに、前十字靭帯(ACL)・内側副靭帯(MCL)切離によるOAモデルでの検討でも、TNCKOマウスはWTに比べて、OAが進行しており(図1) TNCをノックアウトすることで軟骨が変性することが示された(Okamura et al: Osteoarthritis Cartilage 2009)。

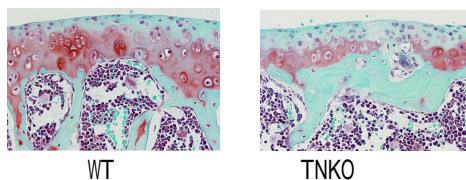


図1. OAモデル作製後4週。TNCKOマウス(右)では野生型(左)より変性が進行している。(サフラニンO染色 x 100)

また、申請者らのWTマウスを用い、ACL・MCLを切離したOA膝モデルを用いた研究で、TNC 10 µg/mlを直接関節内に投与した群ではコントロール群より良好な変性抑制効果を示したことから、in vivoにおいてTNCを関節内に投与することで軟骨変性抑制効果を持ち、TNCがOAの軟骨変性抑制に利用できる候補分子であると考えた。

2. 研究の目的

TNCが軟骨変性を抑制する分子メカニズムを明らかにするとともに、TNCの新しいOAの予防薬となるよう、基礎と臨床を橋渡しできる研究を行うことである。

3. 研究の方法

in vitroにおいて、ヒト軟骨の培養細胞を用い、外因性のTNC(10 µg/ml)を添加することにより、内因性のTNCの発現、サイトカイン(IL-1, TNF)の発現、Growth Factor(TGF, bFGF)の発現、軟骨基質分解酵素(ADAMTS-4 (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs-4), ADAMTS-5)の発現を、real time PCRを行い、TNCを添加しないものと比較し、軟骨変性抑制によるメカニズムを検討する。

(1)患者からの軟骨組織は、変形性膝関節症に対して人工膝関節置換術を行うときに得られた関節軟骨に酵素処理を加え、軟骨細胞を採取し単層培養を行う。

(2)軟骨細胞培養の方法は、患者の関節軟骨を採取し、細かく刻み、0.8% Pronase solution (Calbiochem)を用い、37度で1時間インキュベートした後、0.4% collagenase (Roche Diagnostics)を用い、37度で90分インキュベートする。その後、70-µm pore size nylon filter (BD Biosciences)を通した細胞を1200 rpmで5分間3回遠心し、細胞を単離した。

細胞は6-well tissue culture plates (Becton Dickinson Labware)に播種し、培養液はDMEM/F12(10% FBS, 10 µg/ml gentamicin

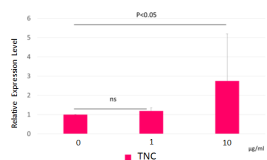
(GIBCO), 25 µg/ml ascorbic acid (Sigma) を用い、2~3日毎に培養液を交換した。

(3) 単離した軟骨細胞を6-well プレートで培養し、コンフルエントに達したところで TNC を添加する。TNC 濃度は 1 µg/ml と 10 µg/ml とする。コントロールとして、TNC を加えないものを作る。コントロールに比べて結果に差が出ないときには、より高濃度の TNC を用いた検討を追加する。反応時間は 12 時間とし、反応後に ISOGEN (Nippon-Gene) を用いて細胞を回収し、total RNA を抽出し、1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR [AMV] (Roche 社) を用いて cDNA を作成する。

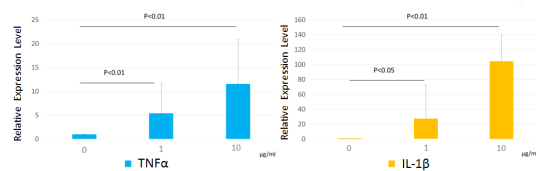
PCR は TaqMan assay (Ambion) にて TaqMan probe (Applied Biosystem) を用いて、TNC、bFGF、IL-1、TNF、ADAMTS-4、ADAMTS-5 を ABI PRISM 7700 にて定量的解析を行う。

4. 研究成果

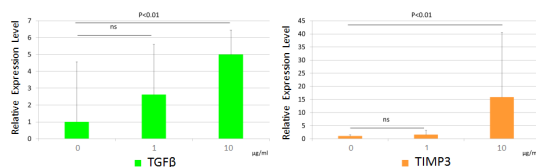
(1) 培養軟骨にを投与したところ、TNC 10 µg/ml 投与で、有意に内因性 TNC の発現が増加した。



(2) 炎症性サイトカインである TNF、IL-1 は TNC 1 µg/ml, 10 µg/ml 投与にて有意に発現が増加した。

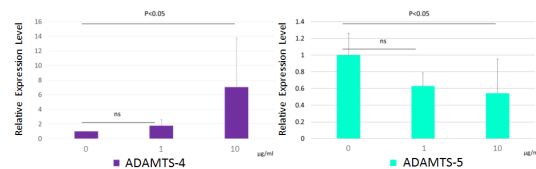


(3) 軟骨基質代謝における anabolic factor である TGF、TIMP3 では、TNC 10 µg/ml 投与にて発現が有意に上昇した。



(4) catabolic factor については、ADAMTS4

は TNC 10 µg/ml 投与にて有意に発現が増加したが、軟骨破壊に強く関するとされる ADAMTS5 は TNC 10 µg/ml 投与群で有意に発現が低下した。



今後は、in vivo において、TNC の変性抑制効果を調べるために、マウス OA 膝モデルを作製し、TNC 投与群とコントロール群それぞれマウス膝関節組織を採取し、PCR、PCR アレイの手法を用いて、TNC 投与により変化する遺伝子を検討する予定である。

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 2 件)

矢田祐基、松井佑梨世、堤秀樹、松田理、中瀬古健 転位型大腿骨頸部骨折に対する骨接合術の治療経験 中部日本整形外科災害外科学会雑誌 58(1):41-42 2015 査読有

松井佑梨世、長谷川正裕、若林弘樹、宮本憲、宮崎晋一、須藤哲広 人工膝関節全置換術におけるトラネキサム酸静脈内投与の効果の検討 日本人工関節学会誌 44: 429-430 2014 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Repairing mechanism for the cartilage using tenascinC. Hironori Unno, Masahiro Hasegawa, Yuriyo Matsui, Naoya Ito, Yoshiaki Suzuki, Kyoko Imanaka-Yoshida, Toshimichi Yoshida, Akihiro Sudo European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology May 27-29 2015 チェコ共和国 (プラハ)

テネイシン C 投与による軟骨変性抑制効果とそのメカニズム 海野宏至、長谷川正裕、鈴木慶亮、松井佑梨世、今中-吉田恭子、吉田利通、須藤哲広 2015 年 11 月 5-6 日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌)

Intra-articular injections of tenascinC prevent cartilage degeneration in murine osteoarthritis models. Yuriyo Matsui, Masahiro Hasegawa, Hiroki Wakabayashi, Noriki Miyamoto, Akihiro Sudo European

Federation of National Associations of
Orthopaedics and Traumatology Jun 4-6
2014 イギリス(ロンドン)

テネイシン C の関節内投与はマウス変形
性関節症モデルでの軟骨変性を抑制する
松井佑梨世、長谷川正裕、飯野隆大、今
中(吉田)恭子、吉田利通、須藤哲広 2014
年 10 月 9-10 日 城山観光ホテル(鹿児
島県・鹿児島市)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井佑梨世 (MATSUI Yuriyo)

三重大学 医学系研究科 リサーチアソシ
エイト

研究者番号: 20727680

(2) 研究協力者

長谷川正裕 (HASEGAWA Masahiro)

三重大学 医学部附属病院 講師

研究者番号: 40308664

吉田利通 (YOSHIDA Toshimichi)

三重大学 医学系研究科 教授

研究者番号: 80166959