

論文要旨等報告書

氏	伊藤 慎将
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 4 3 5 2 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	軟骨組織特異的CCN2/CTGF過剰発現による加齢に伴うマウス膝関節軟骨変性の抑制
論文審査委員	教授 大原 直也 准教授 池亀 美華 教授 滝川 正春

学位論文内容の要旨

【緒言】

CCNファミリータンパク質2/結合組織成長因子(CCN2/CTGF)は共通のモジュール構造をもつ6つのメンバーから構成されるCCN遺伝子ファミリーに属し、細胞の増殖および接着、細胞外基質の産生および分解など多種多様な細胞機能を制御する。これまで申請者らのグループは*in vitro*の各種培養細胞系を用いてCCN2が内軟骨性骨形成過程における軟骨細胞の増殖・分化・成熟に関与し、基質合成を促進することを示してきた。また*in vivo*では、ラットの膝関節軟骨損傷モデルに同蛋白質を局所投与すると、関節軟骨の修復が促進されることも報告してきた。さらに、CCN2を軟骨組織特異的に過剰発現したトランスジェニックマウス(*ccn2^{tg}*)を作製したところ、内軟骨性骨形成の促進による骨伸長が誘導されること、また、*ccn2^{tg}*では軟骨でのCCN2過剰発現により基質の合成が著しく亢進していることを明らかにした。

そこで本研究では、CCN2の軟骨での過剰発現が老齢期の関節軟骨の形質維持に何らかの影響を及ぼすのではないかと考え、老齢期の*ccn2^{tg}*と野生型マウス(*wt*)の関節軟骨を比較検討した。

【材料および方法】

老齢期 CCN2 過剰発現マウス

21ヶ月齢の雄2匹 [*ccn2^{tg}* 1匹・*wt* 1匹]、雌4匹(全て*ccn2^{tg}*)、18ヶ月齢の雄3匹、雌2匹(全て*wt*)の計11匹を解析した。

X-gal(LacZ)染色

関節軟骨における外来遺伝子の発現を確認するため、60日齢までの*ccn2^{tg}*および*wt*の膝関節にX-gal染色を施した。

膝関節のエクソ線学的解析

すべてのマウスは屠殺後直ちに、大腿骨近位部を切断して自然な屈曲位のまま膝関節の矢状方向エクソ線写真を撮影した。

膝関節の組織学的解析

摘出したマウス膝関節をホルマリン固定後、通法に従ってパラフィン包埋後、前頭断切片を作製し、サフラニン-O フェーストグリーンあるいはトルイジンブルー(TB)染色を施した。さらに各種抗体を用いて免疫染色を行った。

染色度の定量および統計学的解析

TB染色、抗X型および抗I型コラーゲン免疫染色を施した膝関節内側脛骨側関節軟骨全域の染色度を測定し統計学的に解析した。さらに抗MMP-13免疫染色を施した膝関節内側部の脛骨側加重面における等面積の領域に含まれる全ての軟骨細胞を抽出し、それぞれの染色度を統計学的に解析した。

関節軟骨由来初代培養軟骨細胞の伸展刺激負荷後の遺伝子発現変化

初代培養軟骨細胞は、出生後6日齢の同腹 *ccn2^{tg}* および *wt* の骨端軟骨から関節軟骨相当部位を採取し軟骨細胞を単離した。その細胞をフレックスチャンバー内で培養し、6%伸展刺激を0.5Hz(30回/分)、12時間作用させた後RNAを回収しRT-PCRにて遺伝子発現の変化を解析した。

【結果】

1. 関節軟骨における外来遺伝子の発現および加齢後に至る蓄積

X-gal染色の結果、*ccn2*^{tg}では、出生後60日齢においても関節軟骨において外来遺伝子の発現が確認できた。また過剰発現したCCN2は免疫染色の結果、加齢後老齢期に至るまで関節軟骨組織中に蓄積されており、さらにCCN2が発現を誘導するII型コラーゲンも免疫染色の結果、*ccn2*^{tg}ではwtと比較して濃染することが観察された。

2. 老齢期*ccn2*^{tg}およびwtの膝関節におけるエックス線学的形態解析

全wt中、半数で関節裂隙の狭小化と表層の粗造化といった、関節軟骨の変性を示す所見が得られたのに対して、*ccn2*^{tg}は全ての個体で明瞭な関節裂隙が観察された。

3. *ccn2*^{tg}における膝関節軟骨の加齢に伴う基質減少の抑制

膝関節軟骨のプロテオグリカン含量を示すサフラニンOの染色性がwtと比較して*ccn2*^{tg}で上昇していた。この変化を定量的に解析するために、TB染色を行った結果、*ccn2*^{tg}群の異染色性はwt群と比較して有意に高かった。

4. 老齢期*ccn2*^{tg}の膝関節軟骨における関節軟骨の変性を示す非関節軟骨性コラーゲンおよび基質分解酵素の発現抑制

X型ならびにI型コラーゲンは、通常関節軟骨での発現はみられないが、変形性関節症(OA)発症時など関節軟骨の変性時には局所的に発現することが知られている。またMMP-13はOAにおける関節軟骨の破壊・変性を直接的に誘導する代表的な基質分解酵素である。そこでこれら非関節軟骨性コラーゲンおよびMMP-13の免疫染色を行った。X型コラーゲンの免疫染色では、wtにおいて濃染した軟骨細胞が関節軟骨下層部に存在したのに対して、*ccn2*^{tg}ではそのような所見はみられなかった。さらにI型コラーゲンについてもwtでのみ関節軟骨において細胞周囲に陽性を示す軟骨細胞が点在していた。これらのX型ならびにI型コラーゲンの免疫染色の結果には、*ccn2*^{tg}、wt両群間に統計学的に有意差があった。MMP-13の免疫染色では関節軟骨表層部に濃染した軟骨細胞がwtで多数染め出されたのに対して、*ccn2*^{tg}では極めて少数であった。設定した加重面の等量域に含まれる全ての軟骨細胞を抽出して、それぞれのMMP-13陽性度をコンピューター解析した結果、*ccn2*^{tg}群とwt群の間には大きな有意差が存在した。

5. *ccn2*^{tg}由来関節軟骨細胞における伸展刺激により誘導される非関節軟骨性コラーゲンならびに基質分解酵素の発現抑制

X型およびI型コラーゲンの発現が、wt由来の軟骨細胞では、伸展刺激負荷後に上昇したのに対して、*ccn2*^{tg}由来の軟骨細胞ではそれらの変化はみられなかった。さらにMMP-13およびMMP-9についても同様にwt由来の細胞では、伸展刺激負荷後に発現が上昇したのに対して、*ccn2*^{tg}由来の細胞では発現が抑制されていた。これらの結果は上述の*in vivo*の結果を裏付けるものであった。

【考察および結論】

ccn2^{tg}では、加齢に伴う軟骨基質の減少や、非関節軟骨性コラーゲンの蓄積といった一連の変化に抵抗性を示した。*ccn2*^{tg}において胎生期から出生後、成長期終盤に至るまで関節軟骨で過剰発現したCCN2は加齢後、老齢期に至るまで蓄積され、その持続的な効果は関節軟骨細胞の基質産生を促進するとともに、加齢に伴って引き起こされるメカニカルストレスによる関節軟骨の変性を抑制し、結果として加齢後もより健康で若々しい形質を維持したものと考えられる。