

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Chondromodulin-I Derived from the Inner Meniscus Prevents Endothelial Cell Proliferation

(半月板 inner 領域における Chondromodulin-I の血管内皮細胞増殖抑制効果)

藤井政孝, 古松毅之, 横山裕介, 金澤智子, 梶木裕矢, 阿部信寛, 尾崎敏文

Journal of Orthopaedic Research 31:538-543, 2013

平成 24 年 10 月 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会に発表

【緒言】

ヒト膝半月板は線維軟骨様組織で膝の安定性や衝撃吸収など重要な役割を担っている。半月板は辺縁 3 分の 1 (outer 領域) で豊富な血行があるが, 自由縁 (inner 領域) は無血行野である。outer 領域では I 型コラーゲンが豊富で細胞は線維芽細胞様の形態をしている。それに対し inner 領域では II 型コラーゲンが豊富で細胞は軟骨細胞様の形態をしており, 圧迫力に対抗する軟骨様の役割をしていると考えられている。

半月板 inner 領域が無血行野を保っているのは, Endostatin などの血管新生抑制因子が関与していると考えられる。本研究では, 軟骨組織特異的に発現するとされる血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) が半月板に存在していると仮定し, 半月板におけるその局在を調べた。また, ChM-I の半月板における役割について検討した。

【材料と方法】

組織・細胞培養

内側型変形性膝関節症に対する人工膝関節置換術時に, 術前 MRI と術中の肉眼所見で変性を認めない外側半月板を採取した。古松らの方法に準じて半月板に付着している滑膜や関節包を切除し, 半月板表層を注意深く切除した。inner/outer 領域に半割し, コラゲナーゼ処理にて取り出した inner/outer 細胞を 10%FBS 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養し Passage 1~2 の細胞を使用した。inner/outer 細胞は 0%, 1%, 5%FBS 含有 DMEM で 24 時間培養した。Inner/outer 領域の組織を 10%FBS 含有 DMEM で培養し, それぞれの培養上清を収集した。

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) は 2% low serum growth supplement 含有 Medium 200S で培養し Passage 2~4 の細胞を使用した。

RT-PCR

半月板組織，細胞から得られた RNA サンプルを使用し，I/II/III 型コラーゲン・ChM-I・Endostatin の発現を RT-PCR にて評価した。

免疫組織学的評価

表層を切除していない半月板組織を用い，rabbit 抗 ChM-I 抗体，mouse 抗 Endostatin 抗体で染色し ChM-I，Endostatin の局在と染色濃度を調べた。

Western blotting

表層を除去した半月板の組織溶解液に対し抗 ChM-I 抗体，抗 Endostatin 抗体，mouse 抗 β アクチン抗体を用いタンパクを検出した。

ELISA と免疫沈降

組織/細胞培養液中への ChM-I，Endostatin タンパクの分泌量を ELISA により定量した。また，Inner/outer 両細胞を異なる血清濃度下で培養し，それぞれの ChM-I，Endostatin 分泌量を比較した。Inner/outer 組織培養上清に mouse 抗 ChM-I 抗体を添加し免疫沈降法で ChM-I を除去した上清を ELISA に使用した。コントロールとして mouse IgG を用いた。

細胞増殖試験

ChM-I を含む半月板組織培養上清と免疫沈降により ChM-I を除去した培養上清を用い，HUVECs の増殖活性に対する影響を検討した。

【結果】

免疫組織学的評価では ChM-I 染色強度は inner 領域において有意に強かったのに対し，Endostatin では inner・outer 領域で同等であった。RT-PCR では軟骨組織特異的に発現する COL2A1，ChM-I は inner 領域のみで発現していた。それに対し Endostatin は outer 領域優位に発現を認めた。ELISA では半月板組織培養上清中の ChM-I は inner 領域において有意に多く分泌しているのに対し，Endostatin の分泌量は少なく inner・outer 領域とも同等であった。Inner・outer 両細胞を異なる血清濃度下で培養すると，無血清培養下の inner 細胞のみで ChM-I の検出量が著明に増加していた。HUVECs の細胞増殖活性に対する影響では，免疫沈降により ChM-I を除去した半月板培養上清中では，control と比べ細胞増殖が有意に促進された。また，ChM-I を含む半月板培養上清に抗 ChM-I 中和抗体を添加することにより HUVECs の増殖が促進された。

【考察】

我々は ChM-I が半月板 inner 領域に多く局在し、inner 領域の無血行野を保っている可能性を示した。Pufe らは Endostatin が半月板 inner 領域において濃度が高く、それが血管侵入障害の主因子ではないかと報告している。しかし、本研究の結果から ChM-I は半月板 inner 領域に有意に多く含まれていたこと、Endostatin 濃度は inner outer 領域で差がみられなかったことが明らかとなった。このことから、我々は ChM-I が inner 領域の無血行野を保っているのではないかと考えた。

RT-PCR では Endostatin が outer 領域で多く発現していたのに対し、ELISA では Inner 領域に多かった理由として、Endostatin は 18 型コラーゲンの C 末端側フラグメントであり、PCR では 18 型コラーゲンの mRNA を検出していたのに対し、ELISA では純粋に Endostatin タンパクの分泌量を検出したことが原因と考えた。

Furumatsu らは Endostatin の作用として HUVECs の Migration は阻害するが Proliferation は阻害しないと報告した。本研究では ChM-I が HUVECs の細胞増殖を有意に抑えていたことから、ChM-I が血管内皮細胞の増殖活性を阻害することで inner 領域の無血行野を保っていると考えた。

【結論】

ChM-I は半月板 inner 領域に多く局在し、血管内皮細胞の増殖活性を阻害することにより inner 領域の無血行野を保っている可能性が示唆された。