

関節軟骨細胞の機能制御に及ぼす  
細胞外基質分子の影響に関する研究

甲第36号

中谷 祥恵

關節軟骨細胞の機能制御に及ぼす  
細胞外基質分子の影響に関する研究

中谷祥恵

# 目次

## 総論の部

緒言	1
第1章 細胞外基質分子であるミネラルが関節軟骨細胞の機能 制御に与える影響	5
第1節 細胞外カルシウム及びマグネシウムが培養軟骨細胞株 ATDC5の分化制御に及ぼす影響	6
第2節 リン濃度増加に伴う軟骨細胞分化誘導作用に細胞外 マグネシウムが与える影響	13
第3節 高リン食及び高マグネシウム食摂取がマウス関節軟骨 に与える影響	16
第4節 本章の小括および考察	21
第2章 細胞外基質分子であるグリコサミノグリカン代謝産物が 関節軟骨細胞の機能制御に与える影響	25
第1節 グリコサミノグリカン代謝産物を用いた軟骨細胞機能 調節因子のスクリーニング	26
第2節 グルコサミンの軟骨細胞分化調節メカニズムの解明	31
第3節 グルコサミン及びN-アセチルグルコサミンがマウス 後足関節軟骨に与える影響	34
第4節 本章の小括および考察	36

第3章	細胞外基質分子であるコラーゲン代謝産物が関節軟骨細胞の機能制御に与える影響	39
第1節	コラーゲンペプチドが培養軟骨細胞株 ATDC5 の増殖・分化・成熟・石灰化に与える影響	39
第2節	コラーゲンペプチドの軟骨細胞分化調節メカニズムの解明	43
第3節	コラーゲンペプチドがマウス後足関節軟骨に与える影響	45
第4節	本章の小括および考察	47
総括		50
謝辞		53
実験の部		55
引用文献		76

## 本論文で使用した略語一覧

AB; アルシアンブルー

ALP; アルカリフォスファターゼ

AR; アリザリンレッド

BMP; Bone morphogenetic protein

BGP; Bone gla protein

Ca; カルシウム

Col2; Type II コラーゲン

CP; コラーゲンペプチド

ECM; 細胞外基質

FCP; 魚鱗コラーゲンを酵素処理して得た魚鱗由来 CP

GAG; グリコサミノグリカン

GalcNAc; N-アセチルガラクトサミン

Gal-Glc; ラクトース

Gal-GlcN; ラクトサミン

Gal-GlcNAc; N-アセチルラクトサミン

Glc; グルコース

GlcN; グルコサミン

(GlcN)<sub>2</sub>; キトサンダイマー

GlcNAc; N-アセチルグルコサミン

(GlcNAc)<sub>2</sub>; キトビオース

GlcU; グルクロン酸

Gly; グリシン

Hyp; ヒドロキシプロリン

Mg; マグネシウム

MGP; Matrix gla protein

MTT; テトラゾリウム塩

OA; 変形性関節症

P; リン

pCP; 酸処理した豚皮ゼラチンを酵素処理して得た豚皮由来 CP

Pro; プロリン

Pro-Hyp; プロリルヒドロキシプロリン

Pro-Hyp-Gly; プロリルヒドロキシプロリルグリシン

PTH; parathyroid hormone

Runx1; runt related transcription factor 1

Runx2; runt related transcription factor 2

Sox9; SRY-box containing gene 9

TGF- $\beta$ ; transforming growth factor beta

## 総論の部

## 総論の部

### 緒言

関節軟骨は、弾力性及び圧縮低抗性を有する組織として、骨と骨の摩擦を防ぎ、関節に可動性を与えている[1]。関節軟骨は約2%の軟骨細胞と98%の細胞外基質(ECM)で構成されている。軟骨の弾力性及び圧縮低抗性は、軟骨細胞によるヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカン(GAG)、コラーゲンなどECMタンパク質の産生によって維持されている。すなわち、関節軟骨に存在する軟骨細胞が正常な軟骨ECM代謝を行うことは、軟骨組織の維持に極めて重要である[2]。

正常な関節軟骨は、特異的な三層構造を有している。関節腔に面した最表層を形成する浅層は、扁平な軟骨細胞が高密度に配列している。浅層の下部の中間層は、ECM中に低密度で軟骨細胞が散在する中間層があり、下部に移行するに従って、軟骨細胞が縦整列し、軟骨柱を形成している。類骨と接する最下層の深層は、中間層と比較して、肥大化した軟骨細胞を有する[3]。これら3層の軟骨層のそれぞれの役割は、まだ不明な点が多いが、各軟骨層に存在する軟骨細胞が正常な軟骨代謝を行い、軟骨組織が維持されていると考えられている。

加齢、食生活の乱れ、疾病及び薬物の影響、メカニカルストレスなど、様々な要因で変性した軟骨組織は、ECMの代謝異常を起こし、軟骨の異所石灰化が誘導される[4, 5]。軟骨組織の異所石灰化は、変形性関節症(OA)の一因となる[6]。OAは、主に加齢に伴う軟骨変性を基盤とし、変性した関節軟骨にメカニカルストレスが加わることによって、関節軟骨が磨耗する疾患である[7, 8]。OAは関節の機能障害及び疼痛を惹起するため、QOLを著しく低下させる疾患として高齢化社会において解決すべき課題となっている。

OAの発症メカニズムは不明な点が多いが、GAGや細胞外基質タンパク質の代謝異常、



ECM の石灰化など、様々な要因が複合的に働き発症に至ると考えられている[9]。OA の危険因子としては、遺伝的要因、肥満などの生活習慣、骨密度や筋肉の低下などが報告されているが、具体的な予防法及び治療法が確立されていないのが現状である[10]。また、OA の有効な薬物が未だ開発されていないため、OA 患者の処置として、NSAIDS の処方、ヒアルロン酸注射、骨切り術などの対症療法が行われているのが現状である。そのため、多くの OA 患者は、軟骨修復作用を目的として、軟骨構成成分であるグルコサミン、コラーゲン、コンドロイチン、軟骨抽出物、カルシウム(Ca)・マグネシウム(Mg)剤など、いわゆる健康食品を摂取している。しかし、これらのいわゆる健康食品の科学的根拠はあいまいである[11-13]。

内軟骨性骨化は、軟骨細胞が間葉系幹細胞から分化し、増殖軟骨細胞、成熟軟骨細胞、肥大化軟骨細胞の分化過程を経て、石灰化軟骨となり骨組織に置換される骨形成過程である[14]。生体内において、骨形成に利用される多くの軟骨細胞は、石灰化軟骨へ分化が進行する。一方、関節軟骨や肋軟骨など、一部の軟骨組織は骨に置換せず成熟軟骨のまま維持される。成熟軟骨細胞の分化維持の詳しいメカニズムは不明な点が多いが、軟骨及び骨の形成過程は、遺伝子レベルで様々な軟骨・骨特異的転写因子によって調節を受けており、これらを介し、細胞間基質などの代謝が調節され、軟骨細胞の増殖及び分化が制御されている[15-17]。

成熟した軟骨細胞は、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などの GAG を産生し、軟骨細胞の性質を維持する役割を担っている[18-21]。Type II コラーゲン (Col2) は、軟骨特異的コラーゲンで、軟骨形成過程の増殖軟骨細胞期及び肥大化軟骨細胞期の細胞間基質に存在し、石灰化軟骨細胞期及び骨形成の過程では消失することが報告されている[22, 23]。アルカリフォスファターゼ(ALP)は、軟骨が石灰化する前の段階において、活性が上昇していることが知られている[24, 25]。したがって、ALP 活性の増加は、前肥大化軟骨細胞への分化の指標として用いられている。Matrix gla protein

(MGP) は、ビタミンK 依存性の翻訳後修飾によって合成される軟骨細胞間基質タンパク質である[26]。MGP は、血管内皮細胞の動脈硬化部においても観察されていることから、石灰化に深く関与するタンパク質の一つであると考えられている[27-29]。Bone gla protein (BGP) は骨特異的基質タンパク質で、軟骨形成及び骨形成過程の進行に伴い、増加し、骨基質を維持するために重要なタンパク質であると考えられている[30]。

軟骨細胞の増殖・分化を制御する増殖因子は、Bone morphogenetic protein (BMP) 群や transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) がよく知られている[31]。これら TGF- $\beta$  / BMP ファミリーは、細胞膜に存在するレセプターに結合後、転写調節因子の Smad をリン酸化し、軟骨特異的遺伝子の発現を調節する[32-34]。Smad 2 は、骨・軟骨形成因子の一つである TGF- $\beta$  の下流に存在し、軟骨の分化を促進する転写因子の一つと考えられている[35]。また、Smad2 は SRY-box containing gene 9 (Sox9) や runt related transcription factor 2 (Runx2) などとヘテロ二量体を形成することにより、Sox9 や Runx2 の下流に存在する軟骨特異的遺伝子の発現を調節すると考えられている[36-38]。Smad4 はリン酸化された Smad2 や Smad3 とヘテロ二量体を形成し、様々な転写因子と相互作用することによって、軟骨の分化を制御していると考えられている[39, 40]。Sox9 は Sox family に属する転写因子の一つで、間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化の誘導と、肥大化軟骨細胞への分化の抑制を調節する軟骨特異的転写因子と考えられている[17, 41, 42]。runt related transcription factor 1 (Runx1) は肥大化軟骨に発現し、内軟骨性骨化に必要な転写因子の一つと考えられている[43]。Runx2 は成熟軟骨に発現し、骨細胞への置換に必要な骨特異的転写因子の一つと考えられている[44-46]。

軟骨細胞株 ATDC5 は、内軟骨性骨化の過程を再現するモデル細胞株として、骨の発生の研究において現在広く利用されている[47, 48]。内軟骨性骨化の過程で、骨へ

置換されるために石灰化軟骨へ分化が進行する軟骨細胞と、関節軟骨など永久軟骨細胞として石灰化せず分化が維持される軟骨細胞は、共に間葉系幹細胞から分化する。すなわち、永久軟骨細胞は、内軟骨性骨化の過程において、成熟軟骨に分化した後、分化が停止している細胞である可能性を示している。したがって、関節軟骨細胞の ECM 中には、分化を停止させ、成熟軟骨細胞を維持する因子が含まれている可能性が考えられた。そこで本研究では、培養過程において、ATDC5 の分化が石灰化軟骨の方向へ経時的に進行する特性を利用し、ECM の代謝産物中に、成熟軟骨を維持する因子及び軟骨の石灰化を促進する因子が存在する可能性を検討した。すなわち、ATDC5 を関節軟骨維持に重要な分子をスクリーニングするアッセイ系として用いた (Fig. 1)。

本実験では、今まで不明な点の多かった生体内における関節軟骨代謝を明らかにすることを研究の目標としている。すなわち、関節軟骨細胞において組織の細胞外基質構成分子がシグナルとして作用し、関節軟骨の維持に関与するか否かを *in vitro* 及び *in vivo* で検討している。さらに、関節軟骨代謝を明らかにすることにより、関節機能障害のリスクを低減あるいは治療に有効な分子の探索を行っている。

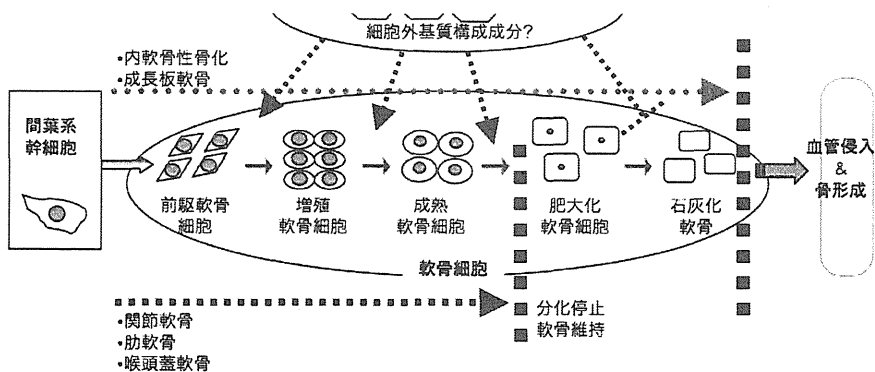


Figure 1. How does articular cartilage maintain the mature chondrocyte?

## 第1章 細胞外カルシウム及びマグネシウムが培養軟骨細胞株 ATDC5 の分化制御に及ぼす影響[49]

Ca、Mg、リン(P)は硬組織である軟骨や骨を構成する主要ミネラルである[50]。細胞外液中に含まれる Ca イオン濃度と骨組織の石灰化は厳密に制御されている[50, 51]。胎児の軟骨は、複数の分化方向に分かれる。つまり、内軟骨性骨化の過程で、骨の鋳型として分化する軟骨と、関節軟骨や肋骨、口喉蓋軟骨、耳軟骨など、軟骨が維持される方向である[52]。成体の軟骨組織は、石灰化軟骨へ分化せず、成熟軟骨の段階で分化が維持される。内軟骨性骨化において、各転写因子によって分化が進行した軟骨細胞は、細胞外 Ca 及び P 濃度が共に上昇することで、肥大化軟骨細胞のアポトーシスが最終的に誘導され、骨組織に置換される可能性が報告されている[53, 54]。したがって Ca・Mg・P は、硬組織を構成する主要ミネラルであるが、軟骨の分化における役割は、まだ不明な点が多い。

1993年、Brownらによって、牛副甲状腺の細胞表面にカルシウムセンシングレセプター (CaSR) が同定された[55]。CaSR は生体内の Ca の恒常性を維持する過程で重要な機能を有している[56]。つまり、副甲状腺の CaSR は、細胞外の Ca イオンを感知し、細胞内シグナル伝達を経て parathyroid hormone (PTH) の分泌を介し、細胞外 Ca 濃度を調節している。最近の研究で、腎臓や骨、軟骨などで、組織の周辺の狭い両域において、Ca センシングメカニズムが存在し、細胞外の Ca イオンを感知し、細胞内に情報を伝達していることが報告されている[57-61]。CaSR は細胞外  $Ca^{2+}$  や  $Mg^{2+}$  濃度を調節すると、応答が変化する可能性が報告されている[62]。さらに、CaSR は軟骨組織の成長板に発現し、ECM の石灰化に関与している可能性が報告されている[63]。すなわち Ca は、基質分子となるだけでなく、直接シグナル分子として作用することが明らかとなっている。

関節軟骨の異所石灰化は、変形性関節症の一因となることが報告されている[5, 6, 64]。また、動脈血管壁の異所石灰化は、冠動脈疾患の一因となることが報告されている[65, 66]。疫学調査の結果、Ca 摂取量に対する Mg の摂取量比率の低下は、心臓疾患の危険性が増昇することが報告されている[67]。クロトー遺伝子変異マウスは、動脈血管壁の異所石灰化や、異常な骨代謝など、老化に伴う症状を示す老化モデルマウスとして報告されている[68]。クロトー遺伝子変異マウスに低P食を摂取させると、このマウス特有の老化症状が抑制されることが報告されている[69]。これらの研究は、Ca、P、Mg の摂取比率は、異所石灰化の発生の一因となることを示唆している。しかし、P や Mg の摂取量が、関節軟骨の維持にどのような影響を与えているかは、不明な点が多い。

我々は、初めに、軟骨細胞株 ATDC5 において、細胞外 Ca、P、Mg が軟骨 ECM の石灰化への影響を与える可能性を検討した。また、*in vivo* における P と Mg の摂取が関節軟骨にどのような影響を与えるか検討した。

## 第1節 カルシウム及びMgが軟骨細胞の分化に与える影響

軟骨 ECM の石灰化は、ECM における無機的作用ではなく、軟骨細胞を介した能動的な作用である可能性を検討した。DMEM/F12 培地に塩化 Ca を各 1 mM, 3 mM, 6 mM, 9 mM, 12 mM, and 24 mM 添加し、リン酸カルシウムの沈澱が形成される濃度を調べた。その結果、1 mM から 24 mM すべての Ca 濃度において、DMEM/F12 培地中にリン酸カルシウムの結晶は生じなかった(data not shown)。さらに、293T 細胞を 6 mM 塩化カルシウムを添加した DMEM/F12 培地中で 7 日間培養し、アリザリンレッド(AR)染色を用いて Ca 沈着を測定した。その結果、293T 細胞の ECM に Ca 沈着は形成されなかった(data not shown)。ATDC5 において、細胞外 Ca が、ATDC5 に増殖に与える影響を検討した。ATDC5 の培地中に終濃度が 1 mM, 3 mM, 6 mM, 9

mM, 12 mM, 及び 24 mM となるように Ca を添加し、3 日間培養後、MTT アッセイを行った。その結果、実験したすべての濃度において、ATDC5 の増殖に影響を与えなかった (data not shown)。これらの結果から、ATDC5 において、6 mM Ca は、培地中のリン酸カルシウムを無機的に形成せず、且つ ATDC5 の増殖に影響を与えない濃度であると判断した。したがって、本実験では 6 mM の Ca 濃度で実験を行った。

細胞外 Ca 及び Mg が ATDC5 の石灰化への分化の指標である ALP 活性に与える影響を、ALP 染色を用いて検討した。DMEM/F12 培地中に Ca 源として塩化カルシウム二水和物及び Mg 源として塩化マグネシウム六水和物を添加し、通常培地 (N; 1 mM Ca, 0.7 mM Mg)、高 Ca 培地 (Ca; 6 mM Ca, 0.7 mM Mg)、高 Mg 培地 (Mg; 1 mM Ca, 4.2 mM Mg)、高 Ca/高 Mg 培地 (Ca/Mg; 6 mM Ca, 4.2 mM Mg) を用いて ATDC5 を培養した。5 日間培養した後、ALP 染色を行った。その結果、細胞外 Ca 及び Mg は、ATDC5 の ALP 活性に影響を与えなかった (data not shown)。

次に、細胞外 Ca 及び Mg が、ATDC5 の石灰化に与える影響を検討した。ATDC5 を Ca 及び Mg 添加培地を用いて、7 日間、14 日間、21 日間、28 日間各々培養した後、AR 染色を行い、石灰化面積を比較した。その結果、Ca 培地で培養した ATDC5 は、N 培地で培養した ATDC5 と比較して、7 日間早い 21 日目に Ca 沈着が観察された。培養 28 日後、Ca 培地で培養した ATDC5 の Ca 沈着面積は、N と比較して約 5 倍に増加した。Mg 及び Ca/Mg で培養した ATDC5 は、28 日間の培養期間中、Ca 沈着は観察されなかった (Figure 2. A)。また、培養 28 日後の典型的な顕微鏡写真を Figure 2. B に示した。これらの結果から、ATDC5 が肥大化軟骨細胞に分化が進行した段階において、Ca は ATDC5 の石灰化を促進し、Mg は Ca による石灰化を抑制することを明らかにした。

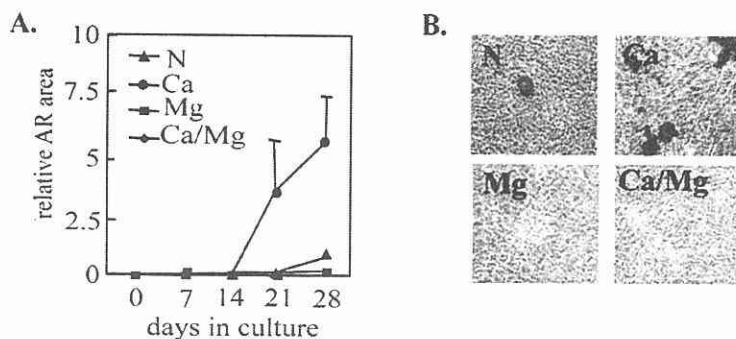


Figure 2. Effect of extracellular calcium and magnesium ions on mineralization of ATDC5 cells. ATDC5 cells were plated at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates and cultured up to 28 days in medium containing the normal ion concentrations or in that having other calcium and magnesium concentrations. Every 7 days periods, parts of stained dishes were counted under a light microscope, and alizarin red stained area was quantified by densitometric analysis. *A*: Changes in Ca deposition under the various medium conditions. *B*: Twenty-eight day cultures were stained with alizarin red to identify calcium deposits. (*N*): 1 mM calcium and 0.7 mM magnesium, (*Ca*): 6 mM calcium and 0.7 mM magnesium, (*Mg*): 1 mM calcium and 4.2 mM magnesium, (*Ca/Mg*): 6 mM calcium and 4.2 mM magnesium. Results represent mean  $\pm$  SD derived from three independent experiments, each experiment carried out 3 or 4 culture wells. Photographed were showed a typical data in these experiments.

石灰化軟骨へ分化が進行する前の成熟軟骨細胞は、GAGを産生している。細胞外Ca及びMgが、ATDC5のECMにおけるGAG量に与える影響を検討した。ATDC5をCa及びMg添加培地を用いて、7日間、14日間、21日間、28日間各々培養した後、アルシアンブルー（AB）染色を行い、GAGの染色面積を比較した。Ca及びCa/Mg培地で培養したATDC5は、N培地で培養したATDC5と比較して、7日間早くABで染色された（Figure 3.A）。また、培養28日目のGAGの染色面積を比較した結果、Ca培地で培養したATDC5は、N培地で培養したATDC5の約2倍に染色面積が増加した。一方、Mg培地で培養したATDC5のGAG染色面積は、N培地の約1/2に減少した。さらに、Ca/Mg培地で培養したATDC5のGAG面積はCa培地の約1/2に減少した（Figure 3.B）。これらの結果から、成熟軟骨細胞において、細胞外Caは軟骨細胞の石灰化過程への分化を促進し、Mgは軟骨細胞の石灰化過程への分化を抑制することを明らかにした。

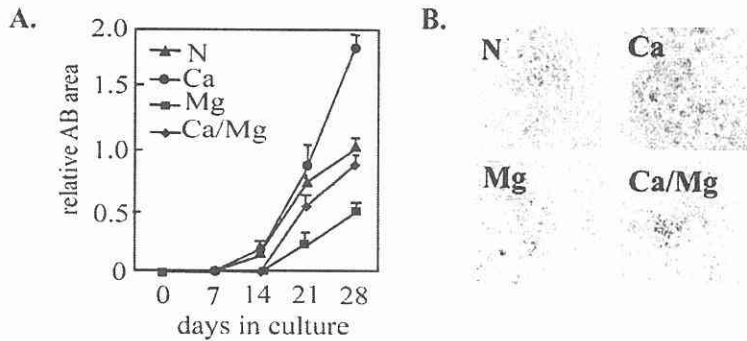


Figure 3. Effect of extracellular calcium and magnesium ions on maturation of ATDC5 cells. ATDC5 cells underwent differentiation for 28 days in the various medium indicated in the legend of Figure 2. Every 7 days periods, parts of stained dishes were counted under a light microscope, and alcian blue stained area area was quantified by densitometric analysis. *A*: Graphic depiction of changes in GAG production by ATDC5 cells under the various medium conditions. *B*: Twenty-eight day cultures were stained with alcian blue to identify glycosaminoglycan. Results represent mean  $\pm$  SD derived from three independent experiments, each experiments carried out 3 or 4 culture wells. wells. Photographed were showed a typical data in these experiments.

Ca 及び Mg による ATDC5 の分化調節メカニズムに、CaSR が関与している可能性を検討した。初めに、ATDC5 の分化段階における CaSR の mRNA 発現レベルを調べた。培養 0 日目の ATDC5 は CaSR mRNA の発現が確認できなかったが、培養 3 日目に、少量の CaSR mRNA の発現が確認できた。その後、培養 7 日目、14 日目、21 日目及び 28 日目における ATDC5 の CaSR mRNA の発現レベルは、経時的に増加した (data not shown)。次に、細胞外 Ca 及び Mg が、肥大化軟骨細胞における ATDC5 の CaSR の発現に与える影響を検討した。ATDC5 を各々の Ca 及び Mg 添加培地を用いて、28 日間培養した後、Total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて、CaSR の mRNA 発現レベルを比較した。その結果、Ca は、CaSR の mRNA 発現レベルを通常と比較して、約 1.5 倍に増加させた。しかし、Mg は CaSR の mRNA 発現レベルに影響を与えなかった (Figure 4)。

さらに、Ca イオンに結合し、且つ石灰化に関与する可能性がある分子である MGP 及び BGP や内軟骨性骨化における転写因子である Sox9 及び Runx2 の遺伝子発現レベルを検討した。ATDC5 を各々の培地を用いて、28 日間培養した後、Total RNA



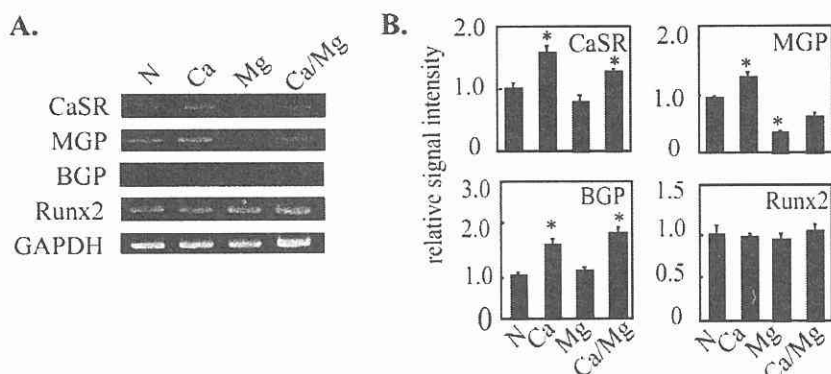


Figure 4. Excess extracellular calcium and magnesium ions change mRNA levels of chondrocyte-associated genes in ATDC5 cells. ATDC5 cells underwent differentiation for 28 days in the various medium indicated in the legend of Figure.2. Total RNA was then isolated and was used for RT-PCR analysis of calcium-sensing receptor (*CaSR*), matrix gla protein (*MGP*), bone gla protein (*BGP*) and Runx2. mRNAs. PCR products were electrophoresed through agarose gels. All gels were digitally imaged flat head scanner and Adobe PhotoShop Elements. Band intensities of these digitally imaged were determined using ImageJ software from autoradiographs obtained from these digitally imaged gels at least 3 different experiments and the signals were normalized by those of GAPDH transcripts. Results represent mean  $\pm$  SD derived from three independent experiments, each experiments carried out 3 culture wells. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.

を抽出し、RT-PCR 法を用いて、MGP、BGP、Runx2 (Figure 4), and Sox9 の mRNA 発現レベルを比較した。その結果、Ca は、Ca は MGP mRNA レベルを約 1.4 倍増加させ、Mg は MGP mRNA レベルを約 1/2 に減少させた。さらに Mg は Ca による MGP mRNA 発現レベルの増加を約 1/2 に抑制した。また、Ca は BGP の mRNA 発現レベルを約 1.5 倍に増加させたが、Mg は BGP の mRNA 発現レベルには影響を与えなかった。また、Ca 及び Mg は転写因子である Sox9 及び Runx2 の mRNA 発現レベルには影響を与えなかった。この結果から、Mg による Ca 誘導性石灰化抑制メカニズムは、MGP が深く関与している可能性が高いと考えた。

Ca 及び Mg による MGP 調節作用を抗 MGP 抗体を用いてタンパク質レベルで検討した。ATDC5 を通常培地を用いて培養し、各分化段階における MGP タンパク質の発現を調べた。その結果、培養 0 日目及び 1 日目の ATDC5 の ECM に MGP タンパク質は発現しなかった。培養 2 日目の ATDC5 は、細胞の周囲に、少量の MGP タンパク質が発現した。さらに、培養 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目における MGP タンパ

ク質の発現レベルを調べた結果、経時的に MGP タンパク質の発現レベルが増加した(data not shown)。

次に、Ca 及び Mg が、ATDC5 の MGP タンパク質発現レベルに与える影響を検討した。ATDC5 を各々の培地を用いて、21 日間培養した後、抗 MGP 抗体を用いて MGP タンパク質レベルを比較した。その結果、Ca は MGP タンパク質レベルを顕著に増加させ、Mg は MGP タンパク質レベルを減少させた。さらに Mg は Ca による MGP タンパク質の増加を抑制した (Figure 5. A)。染色強度の相対値のグラフを Figure 5. B に示した。その結果、Ca は MGP タンパク質の発現レベルを通常の約 2 倍に増加させ、Mg は MGP タンパク質の発現レベルを通常の約 1/2 に減少させた。また、Mg は Ca による MGP タンパク質発現レベルの増加も約 1/2 に減少させた (Figure 5. B)。この結果は、mRNA 発現レベルの結果と同様の傾向を示した。

石灰化前の分化段階である培養 21 日目の ATDC5 において、Ca は MGP タンパク質を増加させ、Mg は MGP タンパク質を減少させた。この結果は、Ca 及び Mg が石灰化に与える影響と同様の傾向を示した。したがって、MGP は石灰化を促進するタンパク質として機能し、Ca 及び Mg は MGP の代謝を介して石灰化を調節している可能性が示唆された。MGP と石灰化の関係を調べるために、二重染色を行った。ATDC5 を Ca 培地を用いて 28 日間培養した後、AR 染色を用いて石灰化部を調べた (Figure 6. A)。次に、AR 染色を行った ATDC5 を抗 MGP 抗体を用いて染色した。その結果、ATDC5 の ECM の石灰化部と MGP タンパク質が発現した箇所が一致した (Figure 6. B)。この結果から、MGP は ATDC5 の石灰化を促進し、Ca 及び Mg は MGP を介して石灰化を調節している可能性が高いと考えられた。

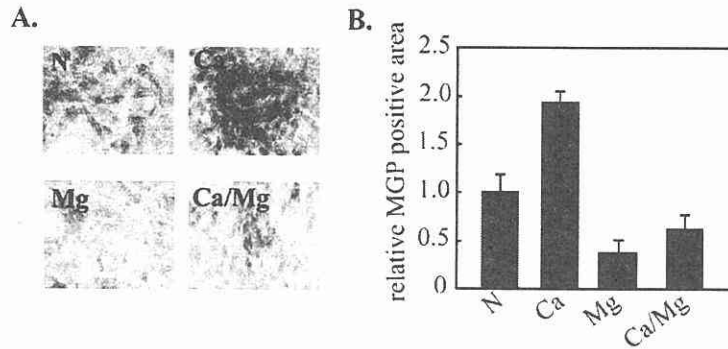


Figure 5. Excess extracellular calcium and magnesium ions change the expression of immunodetected MGP protein in ATDC5 cells. *A*: ATDC5 cells underwent differentiation for 21 days in the various medium described in the legend of Figure 2. The cells were used for immunodetection of MGP protein. Then the cells were counterstained with Mayer's-hematoxylin solution for light microscopy. *B*: Graphic presentation of the changes in MGP protein expression caused by excessive extracellular calcium ion and/or magnesium ion during ATDC5 cells differentiation. Results represent mean  $\pm$  SD derived from three independent experiments, each experiment carried out 3 or 4 culture wells. Photographs showed a typical data in these experiments. \*,  $p < 0.05$  using Student's *t* test.

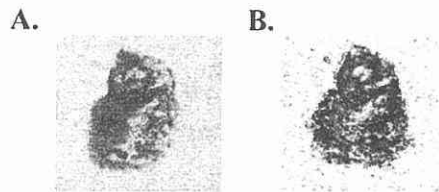


Figure 6. Double staining of alizarin red staining and the expression of immunodetected MGP protein in ATDC5 cells. ATDC5 cells underwent differentiation for 28 days in the high Ca media described in the legend of Figure 2. The cells were used for alizarin red staining to identify calcium deposits (A). Then the cells were double-stained used for immunodetection of MGP protein and counterstained with Mayer's-hematoxylin solution (B). Photographs showed a typical data in these experiments.

## 第2節 リン濃度増加に伴う軟骨細胞分化誘導作用に細胞外マグネシウムが与えるの影響

P は内軟骨性骨化の過程で軟骨細胞の分化を誘導することが報告されている [70]。そこで、Mg が P による石灰化を抑制する可能性を検討した。コントロール培地 (C; 6 mM Ca, 0.7 mM Mg, 1 mM P)、高 P 培地 (P; 6 mM Ca, 0.7 mM Mg, 2 mM P)、高 Mg 培地 (Mg; 6 mM Ca, 4.2 mM Mg, 1 mM P)、高 P・高 Mg 培地 (P/Mg; 6 mM Ca, 4.2 mM Mg, 2 mM P) を用いて ATDC5 を 21 日間培養し、AR 染色を用いて石灰化に与える影響を検討した。その結果、P は顕著に石灰化を促進し、Mg は P による石灰化を抑制した (Figure 7)。

P 及び Mg が、成熟軟骨細胞が産生する GAG に与える影響を検討した。ATDC5 を P 及び Mg 添加培地を用いて、21 日間培養した後、AB 染色 (pH 2.5) を行い、総 GAG の染色面積を比較した。その結果、P は C と同程度の総 GAG 量だった。一方、Mg は総 GAG 量を C の約 2/3 に減少させた。また、有意な差はなかったが、P/Mg 培地で培養した ATDC5 は、P と比較して、総 GAG 量が増加傾向を示した (Figure 8)。この結果は、石灰化の結果と一致しなかった。したがって、P 及び Mg が GAG に与える影響を、AB 染色 (pH 1.0) を用いて、さらに検討した。ATDC5 を P 及び Mg 添加培地を用いて、21 日間培養した後、AB 染色 (pH 1.0) を行い、硫酸基特異的 GAG の染色面積を比較した。その結果、P は硫酸基特異的 GAG 量を C の 1/5 以下に減少させた。一方、Mg は硫酸基特異的 GAG 量を C の約 5 倍に増加させた。さらに、Mg は P による硫酸基特異的 GAG 量の減少を抑制した (Figure 9)。この結果から、P はヒアルロン酸の存在量に影響を与えないが、コンドロイチン硫酸の存在量を顕著に減少させる可能性が示唆された。また、Mg はヒアルロン酸量をわずかに減少させるが、コンドロイチン硫酸の量を増加させる可能性が示唆された。これらの結果から、ATDC5 において、Mg は Ca 及び P による石灰化を抑制し、その抑制メカニズム

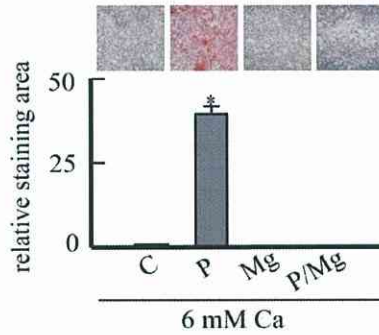


Figure 7. Effect of P and Mg ions in the medium on mineralization of ATDC5 cells. The cells were plated at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates in high calcium medium containing the normal ion concentration or in that having high P and/or Mg concentration. Twenty-one day cultures were stained with alizarin red to identify calcium deposits. (C): normal P and Mg concentrations in the medium (1mM P and 0.7 mM Mg), (P): high P medium (2mM phosphorus and 0.7 mM magnesium), (Mg): high Mg medium (1mM phosphorus and 4.2 mM magnesium), (P/Mg): high P/high Mg medium (2mM phosphorus and 4.2 mM magnesium). These cell-culture experiments were conducted 3 times, and 3 or 4 culture wells were used for each experiment. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test. Photographs of typical results obtained in these experiments are shown.

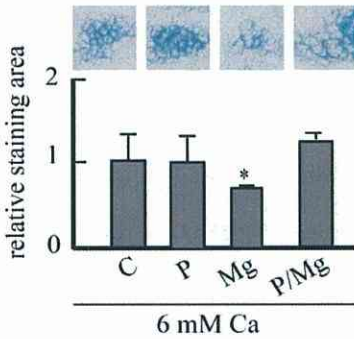


Figure 8. Effect of P and Mg ions in the medium on amount of extracellular total GAG of ATDC5 cells. ATDC5 cells underwent differentiation for 21 days in the various media indicated in the legend of Figure 7. Twenty-one day cultures were stained with alcian blue (pH 2.5) to identify production of total GAG. These cell-culture experiments were conducted 3 times, and 3 or 4 culture wells were used for each experiment. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test. Photographs of typical results obtained in these experiments are shown.

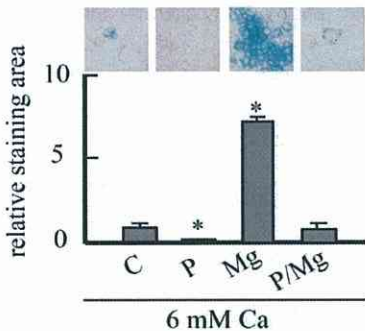


Figure 9. Effect of P and Mg ions in the medium on amount of extracellular sulfated GAG of ATDC5 cells. ATDC5 cells underwent differentiation for 21 days in the various media indicated in the legend of Figure 7. Twenty-one day cultures were stained with alcian blue (pH 1.0) to identify production of total GAG. These cell-culture experiments were conducted 3 times, and 3 or 4 culture wells were used for each experiment. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test. Photographs of typical results obtained in these experiments are shown.

にはコンドロイチン硫酸が関与している可能性が考えられた。

Caによる石灰化促進作用は、MGPを介し誘導され、MgはMGPの発現量を抑制することで、Caによる石灰化を抑制することを示した。そこで、P及びMgによる石灰化調節作用にMGPが関与する可能性を検討した。ATDC5をP及びMg添加培地を用いて、7日間培養した後、抗MGP抗体を用いて免疫組織染色を行い、MGPタンパク質の染色面積を比較した。その結果、PはMGPタンパク質の発現をCと比較して、約8倍促進した。MgはMGPタンパク質の発現をCと比較して、約1/2に減少させた。さらにMgはPによるMGPタンパク質の発現量の増加を約1/8に減少させた(Figure 10)。

以上の結果から、PはCaによる石灰化をさらに促進させることを明らかにした。また、MgはCaのみではなくPによる石灰化も抑制できることを明らかにした。P及びMgの石灰化調節作用は、コンドロイチン硫酸及びMGPタンパク質の代謝を介して行われている可能性を見出した。

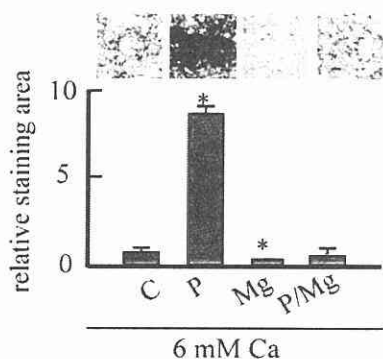


Figure 10. Effect of P and Mg ions in the medium on MGP protein expression of ATDC5 cells. ATDC5 cells underwent differentiation for 7 days in the various media indicated in the legend of Figure 7. Seven-day cultures were used for immunodetection of MGP protein. These cell-culture experiments were conducted 3 times, and 3 or 4 culture wells were used for each experiment. \*,  $p < 0.05$  using Student's *t* test. Photographs of typical results obtained in these experiments are shown.

### 第3節 高リン及び高マグネシウムの摂取が、マウス関節軟骨の機能制御に与える影響

P 及び Mg が、*in vivo* において関節軟骨に与える影響を検討した。10 週齢の C57BL/6J 雄性マウスは、急激な体重増加及び骨成長が終了しているとの報告から、本実験では、9 週齢 C57BL/6J 雄性マウスを用いた[71]。一週間の予備飼育後、C57BL/6J 雄マウスを通常食群 (C; 0.05% Mg・0.3% P)、高 P 食群 (P; 0.05% Mg・1.5% P)、高 Mg 食群 (Mg; 0.8% Mg・0.3% P)、高 P・高 Mg 食群 (P/Mg; 0.8% Mg・1.5% P) の 4 群(n=6)に分け、3 週間飼育を行った。

各群すべてのマウスの体重を経時的に測定し、本飼育開始時と本飼育終了時の体重を Table 1 に示した。本飼育終了時の体重は、高 P 及び高 Mg を摂取させた 3 群は、N 群と比較して有意に減少した。また、本飼育終了時の血清中の P 濃度は、本実験で行った 4 群のマウスにおいて、有意な差は生じなかった。一方、P 群は N 群と比較して血清中の Mg 濃度が約 1/2 に減少し、Mg 群は N と比較して血清 Mg 濃度が約 2 倍に増加した。P/Mg 群の血清 Mg 濃度は、N 群の血清 Mg 濃度と比較して、有意な差は生じなかった (Table 1)。

Table 1. Body weight and serum phosphorus and magnesium concentration

	N	P	Mg	P/Mg
initial weight (g)	24.27±0.80	23.97±0.75	23.70±0.65	24.61±0.88
final weight (g)	28.66±2.13 <sup>a</sup>	26.55±1.02 <sup>b</sup>	24.19±1.10 <sup>b</sup>	24.46±0.85 <sup>b</sup>
serum phosphorus (mg/dl)	9.71±1.31	10.78±2.10	9.81±0.59	9.74±2.45
serum magnesium (mg/dl)	3.37±0.35 <sup>a</sup>	1.48±0.25 <sup>b</sup>	6.71±0.03 <sup>c</sup>	3.51±1.30 <sup>a</sup>

Different superscripts for values within a row denote a significant difference ( $p < 0.05$ ) by turkey's test between each group.

P 及び Mg がマウス関節軟骨に与える影響を検討する目的で、各群の後足膝関節の組織切片を作製した。切片をマイヤー・ヘマトキシリン染色及び AB (pH1.0) 染色を行った後、顕微鏡下で観察し、P 及び Mg がマウスの関節軟骨の厚さ、成長版軟骨の厚さ及び ECM における硫酸基特異的 GAG 量に与える影響を検討した。P 及び Mg がマウスの関節軟骨の厚さ、成長版軟骨の厚さ、ECM における硫酸基特異的 GAG 量に与える影響を検討した。

その結果、P は関節軟骨層を減少させ、硫酸基特異的 GAG 量も減少させた。一方、Mg 及び P/Mg は関節軟骨及び硫酸基特異的 GAG 量に影響を与えなかった (Figure 11. A)。硫酸基特異的 GAG の結果は、*in vitro* の結果と同様の傾向を示した。関節軟骨層の厚さと、成長板軟骨の厚さを各々3ヶ所ずつ計測し、通常マウスに対する各々の層の厚さの相対値を Figure 11. B. C に示した。その結果、P は関節軟骨層の厚さを通常と比較して約 1/2 に減少させた。Mg は通常マウスと同程度の関節軟骨層を保持した。さらに、Mg は P によって誘導された関節軟骨層の減少を抑制した。この時、成長板軟骨の厚さは、4 群間に有意な差は生じなかった。これらの結果から、成長したマウスにおいて、P の過剰摂取は成長板軟骨には影響を与えないが、関節軟骨層を減少させ、ECM におけるコンドロイチン硫酸の量を減少させることを明らかにした。一方、Mg の過剰摂取は、成長板軟骨及び関節軟骨の厚さ及び硫酸基特異的 GAG 量に影響を与えないが、P の過剰摂取が関節軟骨に与える影響を Mg は相殺し、通常の状態の維持に作用することを明らかにした。

*In vitro* において、Mg による P の分化調節作用は、MGP が関与している可能性が示唆された。したがって、次に、生体内における MGP タンパク質の発現を検討した。初めに、内軟骨性骨化の過程における軟骨組織の MGP タンパク質の局在を、抗 MGP 抗体を用いてマウスの免疫組織染色法で検討した。内軟骨性骨化が進行し



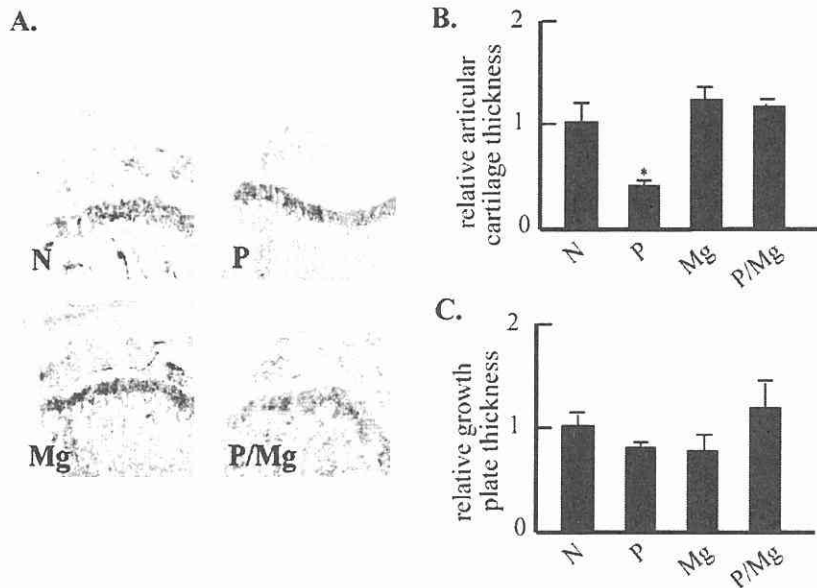


Figure 11. Effect of P and Mg on thickness and amounts of sulfated GAG of articular cartilage in C57BL/6 mice. Shown are sections of articular cartilage from mice fed the normal diet (N), the high P diet (P), the high Mg diet (Mg), and the high P/high Mg diet (Mg/P). *A*: The longitudinal sections of the mouse tibia were stained with alcian blue (pH 1.0) and counterstained with Mayer's hematoxylin solution for light microscopy. *B*: The relative thickness of articular cartilage by dietary P and Mg in this bar graph. *C*: The relative thickness of growth plate by dietary P and Mg in this bar graph. Photographs representative of the typical results found for each group ( $n=6$ ) are shown. \*,  $p<0.05$  using Student's *t* test.

ているマウス 14 日胚の頸骨を摘出し、縦断面の切片を作成後、免疫組織染色及び核染色をし、軟骨組織の形態と MGP タンパク質の局在を調べた。Figure 12. A は、一次抗体を用いなかったなかつたネガティブコントロールの結果を示した。頸骨において軟骨組織が密集した増殖軟骨(P)、丸い細胞を有する成熟軟骨(m)、核にたいして細胞が肥大化した肥大化軟骨(h)、核が消失した石灰化軟骨(c)が観察された。この時の MGP の局在を、Figure 12. B に示した。その結果、増殖軟骨では、細胞増殖部に MGP は観察されず、肥大化軟骨の ECM から石灰化軟骨の ECM において、MGP タンパク質が局在した。

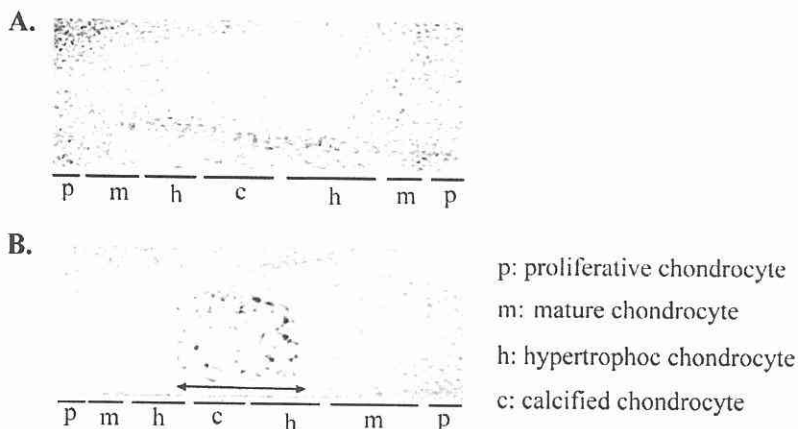


Figure 12. Immunolocalization of MGP protein in cartilage *in vivo*. (A, B) Immunolocalization of MGP protein in longitudinal sections of the hind limb tibia of E12.5 mouse embryos. *A*: Mayer's hematoxylin stain as a control, *B*: anti-MGP antibody stain and Mayer's hematoxylin stain. Lower case letters beneath the horizontal bars: p, proliferating chondrocytes; m, mature chondrocytes; h, hypertrophic chondrocytes; c, calcified mineralized chondrocytes. Double-headed arrows indicate the area of MGP protein. Photographs are representative of the results typically obtained from 6 mice in each group.

次に、成体の関節軟骨組織における MGP タンパク質の発現部位を比較した。本実験では、8 週齢の若齢マウスと 52 週齢の老齢マウスを用いて比較を行った。Figure 13. A の点線両矢印は、関節軟骨を示した。Figure 13. A の両矢印は、関節軟骨における MGP タンパク質の発現した層の割合を示した。関節軟骨層に対する MGP 層が占める割合の相対値を Figure 13. B に示した。その結果、8 週齢と比較して 52 週齢のマウス関節軟骨では、関節軟骨層に占める MGP 層の割合が、約 2 倍に増加した。この結果から、関節軟骨組織における MGP タンパク質は加齢に伴い増加することを明らかにした。

P 及び Mg がマウス関節軟骨の MGP タンパク質の発現に与える影響を検討した。各群の後足膝関節の組織切片を作製し、免疫組織染色法を用いて MGP タンパク質の局在を比較した (Figure 14. A)。Figure 13 と同様に、関節軟骨層に対する MGP タンパク質発現層を割合のグラフを Figure 14. B に示した。その結果、P は MGP タンパク質の発現層を通常と比較して、約 1.5 倍に増加させた。Mg は MGP タンパク

質の発現層の割合に影響を与えなかった。しかし、Mg はP による MGP タンパク質の発現層の増加を抑制した。この結果は、P 及びM が *in vitro* において MGP タンパク質の発現に与えた影響と一致した。

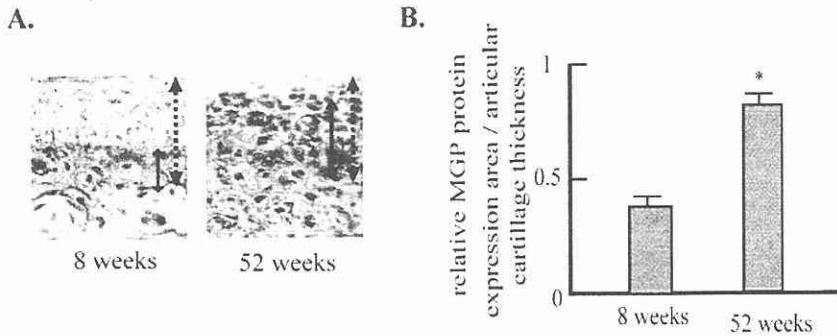


Figure 13. Immunolocalization of MGP protein in articular cartilage in vivo. *A*: Age-related distribution of MGP in the mouse articular cartilage. Sections of articular cartilage from 8-week-old and 52-week-old mice are shown. Double-headed dotted arrows indicate the area of articular cartilage. Double-headed arrows indicate the area of MGP protein. *B*: The relative thickness of articular cartilage and MGP protein expression area. Photographs are representative of the results typically obtained from 6 mice in each group. \*,  $p < 0.05$  using Student's *t* test.

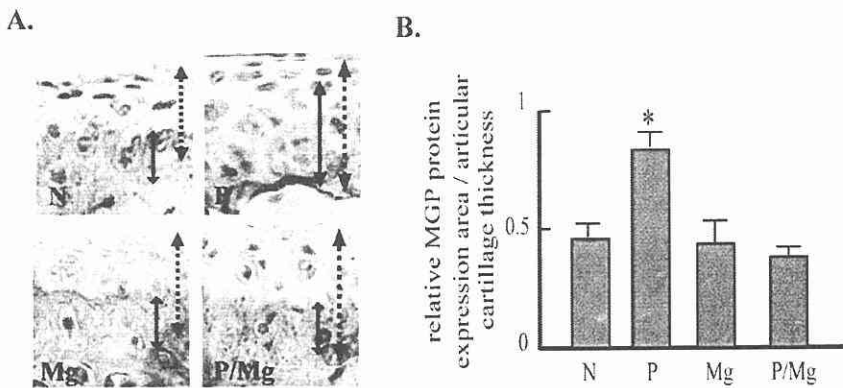


Figure 14. Effect of P and Mg on immunodetected MGP protein of articular cartilage in C57BL/6J mice. Articular cartilage of mice fed the normal diet (N), high P diet (P), high Mg diet (Mg), and high P/high Mg diet (P/Mg) are shown. Double-headed dotted arrows indicate the area of articular cartilage. Double-headed arrows indicate the area of MGP protein. *B*: The relative thickness of articular cartilage and MGP protein expression area. Photographs are representative of the results typically obtained from sections from 6 mice in each group. \*,  $p < 0.05$  using Student's *t* test.

#### 第4節 本章の小括および考察

胎児中の軟骨組織は、いくつかの発生過程を有する。すなわち、関節軟骨や肋軟骨など永久軟骨として維持される軟骨組織と、内軟骨性骨化の過程で、骨形成の鋳型となり、消失する軟骨に分類することができる[16, 52]。成体において、関節軟骨は、非石灰化軟骨組織として維持されている。一方、成長板軟骨は、正常な骨形成を誘導されるために、軟骨細胞が石灰化する。関節軟骨の石灰化は、変形性関節症の一因となり、成長板軟骨の非石灰化は、骨軟化症の一因となる[72, 73]。本実験の結果、細胞外 Ca 及び Mg は、ECM の石灰化を調節しているのみならず、軟骨細胞の GAG 代謝を調節していることを見出した。そのメカニズムとして、細胞外 Ca 及び Mg は、軟骨特異的遺伝子の発現に影響を与えていることを、RT-PCR の結果から明らかにした。CaSR は CFK2 細胞株及び成長板軟骨の肥大化軟骨細胞に発現していることが報告されている[63, 74]。本実験で、軟骨細胞株 ATDC5 において、細胞外 Ca 濃度の上昇に伴い、CaSR mRNA 発現レベルが増加することを、初めて明らかにした。これらの結果から、細胞外 Ca 濃度の増加は、CaSR mRNA の発現を誘導し、ATDC5 における軟骨細胞の分化を促進させる可能性が示唆された。

石灰化組織では、ビタミン K 依存性タンパク質である MGP 及び BGP が、石灰化関連タンパク質として同定されている[75]。本実験の結果から、細胞外 Ca 濃度の増加は、MGP 及び BGP mRNA の発現レベルを増加させることを明らかにし、細胞外 Mg は MGP mRNA の発現レベルを減少させることを示した。さらに、細胞外 Mg は、細胞外 Ca 濃度の上昇に伴う MGP mRNA 発現レベルの増加を抑制することも示した。Sox9 及び Runx2 は、内軟骨性骨化の分化段階を調節するマスター遺伝子として知られている[15]。本実験の結果から、細胞外 Ca 及び細胞外 Mg は、Sox9 及び Runx2 mRNA の発現レベルに影響を与えなかったため、Ca 及び Mg による石灰化調節は、転写におけるマスター遺伝子を介さない調節である可能性が示唆された。本実験

は RT-PCR 法を用いて、軟骨特異的遺伝子の発現レベルを比較した。今後、プロモーターアッセイ及びノザンブロットィング法など分子生物学的手法を用いて、詳細なメカニズムを検討することが必要である。

P は骨の構造の維持や、ATP などの高エネルギー分子構成成分、核酸の構成成分などとして、成体にとって、明らかに重要なミネラルである。しかし、動物実験において、飼料中の P の割合が高いと、腎臓などの軟組織が石灰化することが報告されている [76]。最近の研究では、ビタミン D レセプター遺伝子欠損マウスを用いた実験において、食事性の Ca 及び P の摂取比率は、骨代謝に影響を与えることが報告されている [77, 78]。また、マウスにおいて食事性の P 及び Mg の摂取比率は、心臓及び腎臓の異所石灰化に伴う Ca 量に影響を与えることも報告されている [79]。これらの報告は、P は Ca や Mg などその他のミネラルを介して石灰化を調節している可能性を示唆し、適正な P 摂取は、正常な骨代謝を維持するために重要であり、不適切な P 摂取は、異所石灰化を誘導する可能性があることを示している。

クロトー遺伝子欠損マウスは、寿命の短縮、生殖能力の欠如、異所石灰化、皮膚の萎縮、骨粗鬆症など、ヒトの加齢に伴う症状を有するマウスとして知られている [80]。クロトー遺伝子欠損マウスにおける食事性 P 摂取の制限は、これらクロトー遺伝子欠損マウス特有の症状を改善させることが報告されている [69]。しかしながら、正常な関節軟骨の維持に、P が関与する可能性ははまだ検討されていなかった。本実験の結果、P の過剰摂取は、高齢マウスにおける関節軟骨の特徴を有することを明らかにした。また、P と同時に Mg を摂取することによって、正常な GAG 代謝及び MGP タンパク質の発現を維持し、P が誘導する関節軟骨の加齢変性を抑制できることを明らかにした。Mg は成体内で 2 番目に多く含まれているカチオンである。通常、成人の総 Mg 量の約 1/2 は、軟組織に存在し、残りは骨組織中

に存在している。本実験の結果は、Mg が関節軟骨の維持に重要な役割を担っていることを示している。

関節軟骨の ECM は、骨と骨を接続し、且つ潤滑に関節を可動させるために重要である。コンドロイチン硫酸及びケラタン硫酸は関節軟骨において、アグリカンのコアプロテインに側鎖として結合している GAG として知られている[20]。アグリカンは、軟骨特異的 ECM の一つであり、軟骨組織の弾力性及び圧縮抵抗性の機能を保持するために重要な成分である[1, 18, 81]。OA 及び加齢に伴い、関節軟骨におけるコンドロイチン硫酸及びケラタン硫酸の産生量が減少することが報告されている [82, 83]。また、プロテオグリカンの合成を促進させること及び分解を抑制させることは、OA の治療に有効である可能性も示唆されている[84]。

本実験の染色結果から、P の過剰摂取は、関節軟骨 ECM におけるコンドロイチン硫酸及びケラタン硫酸など硫酸基特異的 GAG の量を減少させるが、Mg を同時に過剰摂取することは、P による硫酸基特異的 GAG 量の減少を抑制できることを明らかにした。

さらに、本実験の結果、P は関節軟骨における MGP タンパク質の発現を過剰に誘導することを明らかにした。関節軟骨における P の過剰摂取に伴う MGP タンパク質発現の変動の結果は、老化マウスの MGP タンパク質の発現変動と類似していることを明らかにした。一方、Mg の過剰摂取は、関節軟骨における MGP タンパク質の発現に影響を与えなかったが、P と共に Mg を過剰摂取させることによって、P による異常な MGP タンパク質の発現の誘導を抑制し、通常の MGP タンパク質の発現状態を維持できることを明らかにした。また、軟骨細胞株 ATDC5 の結果から、P は ECM の石灰化を誘導し、Mg は P による石灰化も抑制できることを明らかにした。また、ATDC5 における P 及び Mg による MGP タンパク質の発現の変動と石灰化の結果は、一致していた。さらに、ATDC5 において、P は ECM における硫酸基特異的 GAG

の量を減少させ、Mg は P による硫酸基特異的 GAG 量の減少を抑制できた。したがって、本実験における *in vivo* の結果は、*in vitro* の結果と一致した。

以上 *in vitro* 及び *in vivo* の結果から、Ca と P は軟骨変性及び石灰化を誘導するのに対し、Mg はこの誘導を抑制することを明らかにした。この Mg による石灰化調節メカニズムは、Mg が軟骨細胞にシグナル分子として作用し、CaSR、MGP 及び GAG を介して、P と Ca による石灰化を抑制する可能性が考えられた。すなわち、Mg は、正常な関節軟骨代謝の維持に重要な因子であることを初めて見出した。

## 第2章 細胞外基質分子であるグリコサミノグリカン代謝産物が関節軟骨細胞の機能制御に与える影響[85]

近年、変形性関節症の疼痛緩和を目的として、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸など GAG 及び GAG の基本構成糖である GlcN やグルコサミンアナログが、経口摂取されている[11]。ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)とグルクロン酸(GlcU)が交互に結合してできた直鎖状の高分子多糖である[21]。コンドロイチン硫酸は、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)と GlcU を構成糖とし、アグリカンの側鎖として軟骨組織に存在している[86]。ヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸は、軟骨 ECM を形成する GAG として、軟骨組織に圧縮抵抗性を付与している。GlcN 摂取及びコンドロイチン硫酸摂取による変形性関節症の症状改善効果は臨床レベルでは報告されているが、有効性が一致していないのが現状である[87, 88]。GlcN は摂取量の約90%が、腸管から吸収されることが報告されている[89]。したがって、GlcN は、GAG の構成糖として ECM に取り込まれるため、関節軟骨の維持に有用であると考えられている。しかし、最近の報告では、実験動物において GlcN 摂取後の滑膜中への到達量は微量であるため、GlcN の有効性は GAG への取り込みのみでは解明できない可能性が示唆されている[90]。また、GlcN 含有健康食品は、キチン加水分解物が利用されている。しかし、GlcN などのグルコサミンアナログの有効性は検討されていない。

本章では、ECM 分子である GAG 代謝産物が関節軟骨細胞の機能制御に与える影響を検討することを目的に実験を行った。さらに、GlcN 及びグルコサミンアナログの有効性及び作用メカニズムの解明への応用を目的に実験を行った。



## 第1節 GAG 代謝産物を用いた軟骨細胞機能調節因子のスクリーニング

GlcN 及びグルコサミンアナログが、軟骨細胞に直接影響を与える可能性を検討した。軟骨細胞株 ATDC5 にグルコサミン塩酸塩及びグルコース (Glc) を各々 0.01%, 0.03%, 0.1%, 0.3%, 0.6% 添加し 3 日間培養後、MTT アッセイを行った。その結果、Glc は、実験で用いたすべての濃度において、ATDC5 の細胞増殖に影響を与えなかった。一方、グルコサミン塩酸塩を添加した ATDC5 は、0.01%, 0.03%, 0.1%, 0.3% の添加濃度では ATDC5 の増殖に影響を与えなかったが、終濃度 0.6% GlcN を添加した ATDC5 は、通常培地で培養した ATDC5 の増殖率と比較して約 1/5 に低下した (data not shown)。この結果から、本実験で用いる GlcN の添加濃度は、1 mg/ml とした。

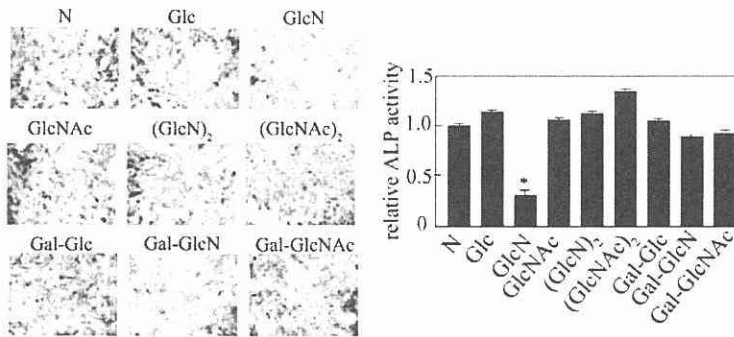


Figure 15. Effect of glucosamin and glucosamine analogues on alkaline phosphatase activity of ATDC5 cells. ATDC5 cells were cultured in normal medium (N) and medium containing 1 mg/ml glucose (Glc), glucosamine hydrochloride (GlcN), N-acetyl glucosamine (GlcNAc), glucosamine di-saccharide ((GlcN)<sub>2</sub>), N-acetyl glucosamine di-saccharide ((GlcNAc)<sub>2</sub>), lactose (Gal-Glc), lactosamine (Gal-GlcN) or N-acetyl lactosamine (Gal-GlcNAc) for 5 days, fixed and stained histochemically to detect ALP as described in Materials and Methods. Photographs of dishes stained for ALP (A) and graph showing the signal intensity of the stained area in each culture (B). Results represent the mean  $\pm$  SD derived from 3 independent experiments, with each experiments carried out 4 using culture wells. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.

次に、GlcN 及びキチン及びキトサンから誘導されるグルコサミンアナログを添加し、ATDC5 の増殖に与える影響を検討した。キチン及びキトサンから誘導されるグルコサミンアナログとして、Glc、GlcNAc、キトサンダイマー ( (GlcN)<sub>2</sub> )、キトビオース ((GlcNAc)<sub>2</sub>)、ラクトース(Gal-Glc)、ラクトサミン(Gal-GlcN)、N-アセチルラクトサミン(Gal-GlcNAc)を用いた。終濃度 0.1%として添加し、3日間培養後、MTT アッセイを行った。その結果、本実験で用いた GlcN 及びグルコサミンアナログは ATDC5 の増殖に影響を与えなかった(data not shown)。

また、GlcN 及びキチン及びキトサンから誘導されるグルコサミンアナログが、ATDC5 の分化に与える影響を、ALP 染色を用いて検討した。その結果、GlcN はネガティブコントロールである Glc と比較して、ALP 活性を約 1/3 に減少させた。一方、GlcNAc、(GlcN)<sub>2</sub>、(GlcNAc)<sub>2</sub>、(Gal-Glc)、(Gal-GlcN)、及び (Gal-GlcNAc) などのグルコサミンアナログは、Glc と比較して、ATDC5 の ALP 活性に有意差を与えなかった(Figure 15)。

さらに、GlcN 代謝に関与するグルコサミンアナログを添加し、ATDC5 の増殖に与える影響を検討した。GlcN 代謝に関与するグルコサミンアナログとして、Glc、フルクトース (Fru)、ガラクトース (Gal)、ガラクトサミン (GalcN)、GlcNAc、GlcU、グルクロノラクトン (GlcULac) を用いた。終濃度 0.1%として添加し、3日間培養後、MTT アッセイを行った。その結果、本実験で用いた GlcN 及びグルコサミンアナログは ATDC5 の増殖に影響を与えなかった(data not shown)。

一方、GlcN 及び GlcN 代謝に関与するグルコサミンアナログが、ATDC5 の分化に与える影響を、ALP 染色を用いて検討した。その結果、GalcN は GlcN と比較して、ALP 活性を約 1/5 に減少させた。一方、Fru、Gal、GlcU 及び GlcULac のグルコサミンアナログは、Glc と比較して、ATDC5 の ALP 活性に有意差を与えなかった(Figure 16)。

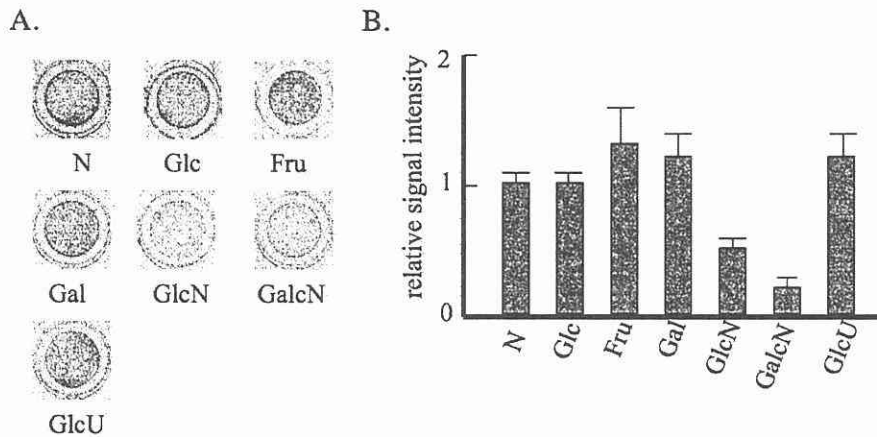


Figure 16. Effect of glucosamin and glucosamine analogues on alkaline phosphatase activity of ATDC5 cells. ATDC5 cells were cultured in normal medium (*N*) and medium containing 1 mg/ml glucose (*Glc*), fructose (*Fru*), galactose (*Gal*), glucosamine (*GlcN*), galactosamine (*GalcN*), N-acetyl galactosamine (*GalcN*) or glucronic acid (*GlcU*) for 5 days, fixed and stained histochemically to detect ALP as described in Materials and Methods. Photographs of dishes stained for ALP (A) and graph showing the signal intensity of the stained area in each culture (B). Results represent the mean  $\pm$  SD derived from 3 independent experiments, with each experiments carried out 4 using culture wells. \*,  $p < 0.05$  using Student's *t* test.

次に、GlcN 及び GalcN が ATDC5 の増殖及び ALP 活性に与える影響を詳細に検討した。ATDC5 の培地中に各々 0.01%、0.025%、0.05%、0.1%、0.25% の GlcN 及び GalcN を添加し、3 日間培養後、MTT アッセイを行い、5 日間培養後、ALP 染色を行った。

その結果、GlcN は上記実験濃度において ATDC5 の増殖に影響を与えなかったが、ALP 活性を濃度依存的減少させた。さらに、GlcN は、0.01% 添加した ATDC5 の ALP 活性を約 2/3 に有意に低下させた。一方、GalcN は、0.25% 添加した ATDC5 の増殖率を約 1/2 に減少させた。また、0.01% GalcN は、ATDC5 の ALP 活性に影響を与えなかった (data not shown)。

GalcN は ATDC5 の増殖を抑制した結果、ALP 活性を低下させた可能性が示唆された。一方、GlcN は、ATDC5 の増殖には影響を与えなかったが、ATDC5 の ALP 活性を低下させたことから、GlcN は、増殖期が終了した軟骨細胞に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、GlcN が、ATDC5 の石灰化に与える影響を検討した。

ATDC5 の培地中に終濃度 1 mg/ml の Glc 及び GlcN を添加し、各々35 日間培養後、AR 染色を用いて、石灰化を比較した。その結果、GlcN は、ATDC5 の ECM の石灰化を、Glc と比較して約 1/10 に抑制した (Figure 17)。さらに、ヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸の構成糖である GlcU 及び GlcNAc が、ATDC5 の石灰化に与える影響を検討した。ATDC5 の培地中に、終濃度 1 mg/ml の GlcU、GlcNAc 及び GlcU+GlcNAc を添加し、35 日間培養を行った後、AR 染色を用いて石灰化を比較した。その結果、GlcU、GlcNAc、GlcU+GlcNAc は、ATDC5 の石灰化に影響を与えなかった (data not shown)。この結果は、ALP 活性の結果と同様の傾向を示した。

次に、GlcN が軟骨 ECM の GAG 量に与える影響を検討した。ATDC5 の培地中に終濃度 1 mg/ml の Glc 及び GlcN を添加し、各々35 日間培養後、AB 染色を用いて、GAG 量を比較した。AB (pH 2.5)を用いて、総 GAG の染色を行い、AB (pH 1.0)を用いて、硫酸基特異的 GAG の染色を行った。その結果、GlcN は Glc と比較して、総 GAG 量を約 2/3 に減少させた (Figure 18)。一方、AB (pH1.0)を用いて、硫酸基特異的 GAG 量を比較した結果、総 GAG 染色の結果と異なり、GlcN は硫酸基特異的 GAG 量を Glc と比較して約 2.5 倍に増加させた (Figure 19)。この結果から、GlcN は、軟骨の ECM における硫酸基特異的 GAG の産生を促進する可能性、あるいは分解を抑制する可能性が示唆された。

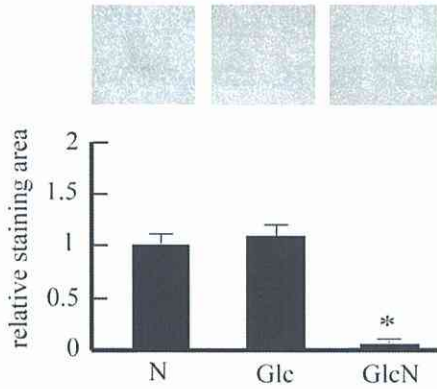


Figure 17. Effect of glucosamine on mineralization of ATDC5 cells. ATDC5 cells were cultured for 35 days in the various medium indicated in the legend of Figure 15, fixed, and stained histochemically to detect calcium deposits by alizarin red staining as described in Materials and Method. The graph shows the signal intensity of the stained area in each culture. Results represent the mean  $\pm$  SD derived from 3 independent experiments, with each experiment carried out using 3 culture wells. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.

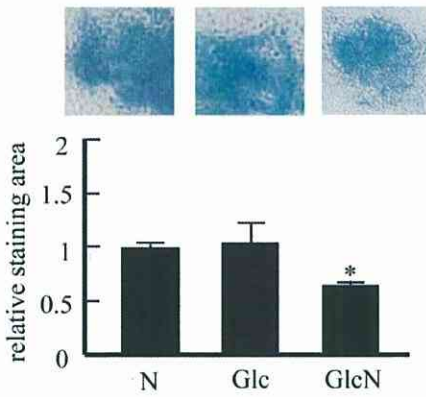


Figure 18. Effect of glucosamine on amount of total GAG of ATDC5 cells. ATDC5 cells were cultured for 35 days in the various media indicated in the legend of Figure 15 and were stained with alcian blue (pH 2.5) to identify total GAG. Results represent the mean  $\pm$  SD derived from 3 independent experiments, with each experiment carried out using 3 culture wells. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.

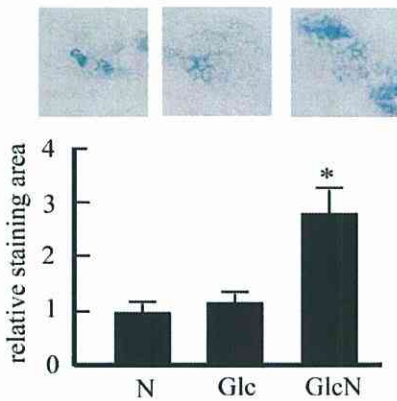


Figure 19. Effect of glucosamine on amount of sulfated GAG of ATDC5 cells. ATDC5 cells were cultured for 35 days in the various media indicated in the legend of Figure 15, and were stained with alcian blue (pH 1.0) to identify sulfated GAG. Results represent the mean  $\pm$  SD derived from 3 independent experiments, with each experiment carried out using 3 culture wells. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.

## 第2節 グルコサミンの軟骨細胞分化調節メカニズムの解明

GlcN は、軟骨細胞株 ATDC5 の分化及び石灰化を顕著に抑制し、さらに硫酸基特異的 GAG 量を増加させた。そこで、軟骨 ECM 中の硫酸基特異的 GAG であるコンドロイチン硫酸が、ATDC5 の石灰化に与える影響を検討した。ATDC5 の培地中に、終濃度 1 mg/ml のヒアルロン酸、コンドロイチン-4 硫酸、コンドロイチン-6 硫酸を添加し、35 日間培養を行った後、AR 染色を用いて石灰化を比較した。その結果、ヒアルロン酸は通常と比較して ATDC5 の石灰化を約 3/4 に減少させた。コンドロイチン-4 硫酸及びコンドロイチン-6 硫酸は通常と比較して、ATDC5 の石灰化を約 1/2 に減少させた (Figure 20)。この結果から、GAG は ATDC5 の石灰化を抑制し、さらに、コンドロイチン硫酸はヒアルロン酸と比較して、石灰化を抑制できることを明らかにした。しかし、GlcN は ATDC5 の石灰化を約 1/10 に抑制したことから、GlcN はコンドロイチン硫酸代謝調節以外の作用する可能性が示唆された。

GlcN が軟骨特異的 ECM タンパク質の mRNA の発現に影響を与える可能性を検討した。ATDC5 の培地中に終濃度 1 mg/ml の Glc 及び GlcN を添加し、3 日間培養後、RT-PCR 法を用いて Col2、MGP、BGP mRNA の発現レベルを比較した。その結果、Col2 mRNA と BGP mRNA の発現レベルは、ネガティブコントロールである Glc と GlcN で相違はなかった。一方、MGP mRNA の発現レベルは、Glc と比較して GlcN は約 2/3 に減少した (Figure 21)。

GlcN が GAG のみではなく基質タンパク質にも影響を与えたことから、GlcN は軟骨特異的転写因子を調節している可能性が考えられた。ATDC5 を終濃度 1 mg/ml の Glc 及び GlcN を添加し、3 日間培養後、RT-PCR 法を用いて軟骨特異的転写因子である Sox9、Runx1、Runx2、Smad2、Smad4 mRNA の発現レベルを検討した。その結果、軟骨分化におけるマスター遺伝子である Sox9、Runx1、Runx2 の mRNA 発現レベルは Glc と GlcN で相違がなかった。しかし、軟骨転写調節遺伝子である Smad2

及び Smad4 mRNA を比較した結果、GlcN は Glc と比較して発現レベルが約 2/3 に減少した (Figure 22)。これらの結果から、GlcN の軟骨分化調節メカニズムは、軟骨基質タンパク質である MGP 及び TGF- $\beta$  の下流に存在する Smad2 及び Smad4 が関与している可能性が考えられた。

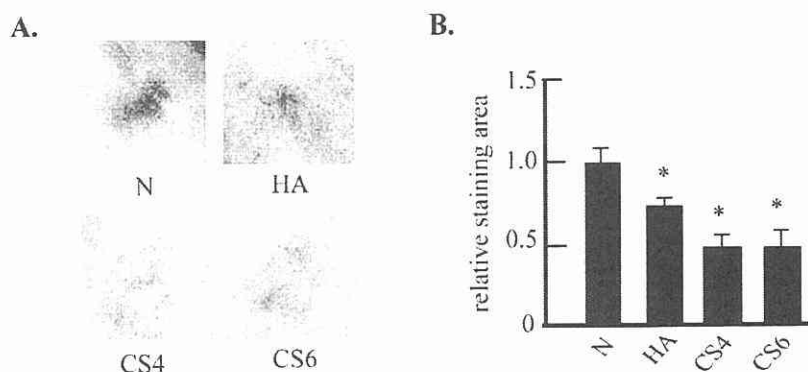


Figure 20. Effect of hyaluronan and chondroitin sulfate on mineralization of ATDC5 cells. ATDC5 cells were cultured in normal medium (*N*) and medium containing 1 mg/ml hyaluronan (*HA*), chondroitin 4-sulfate (*CS4*), or chondroitin 6-sulfate (*CS6*) for 35 days, fixed and stained histochemically to detect calcium deposits by Alizarin red staining as described in Materials and Method. Photographs of dishes stained for alizarin red (A) and graph showing the signal intensity of the stained area in each culture (B). Results represent the mean  $\pm$  SD derived from 3 independent experiments, with each experiments carried out 4 using culture wells. \*,  $p < 0.05$  using Student's *t* test.

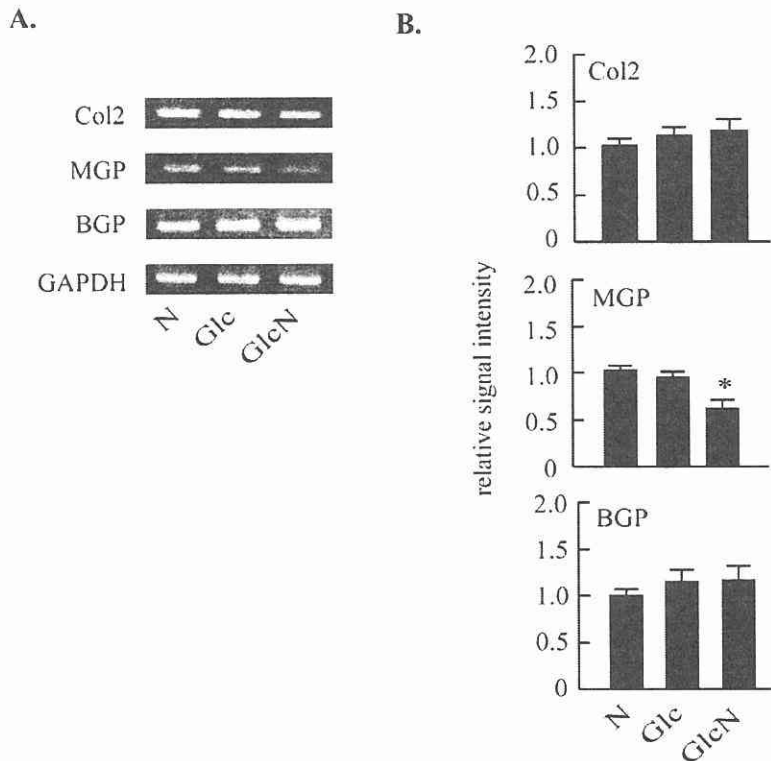


Figure 21. Effects of GlcN on the mRNA levels for of chondrocyte matrix genes in ATDC5 cells. The mRNA levels for type II collagen (Col2), matrix gla protein (MGP) and bone gla protein (BGP) levels of mRNA were determined by RT-PCR. The gel electrophoresis patterns of the PCR products (A) and densitometric analysis were performed as described in Materials and Methods. Then the signals obtained from these digitally imaged gels in at least 3 different experiments were normalized relative to GAPDH mRNA level as shown in the graph (B). Data from all sets of determinations are the mean  $\pm$  SD. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.



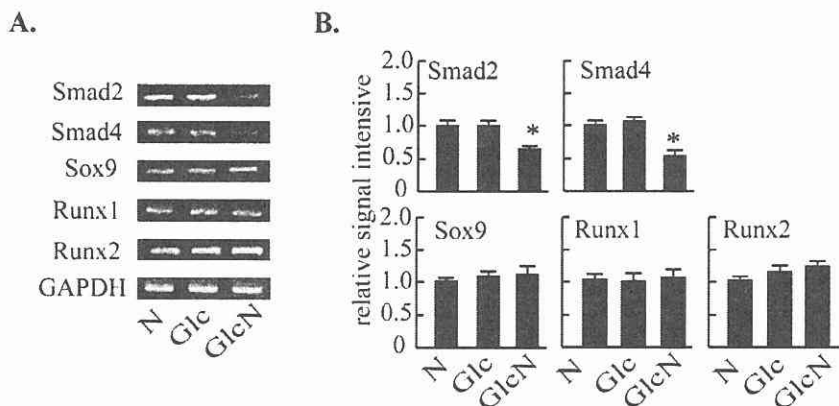


Figure 22. Effects of GlcN on the mRNA levels for chondrogenic and osteogenic transcription factors in ATDC5 cells. The mRNA levels for Smad2, Smad4, Sox9, Runx1 and Runx2 were determined by RT-PCR. The gel electrophoresis patterns of the PCR products (A) and densitometric analysis were performed as described in Materials and Methods. Then the signals obtained from these digitally imaged gels in at least 3 different experiments were normalized relative to GAPDH transcripts as shown in the graph (B). Data from all sets of determinations are the mean  $\pm$  SD. \*,  $p < 0.05$  using Student's *t* test.

### 第3節 GlcN 及び N-アセチルグルコサミンが、マウス後足関節軟骨に与える影響

*In vitro* の結果、GlcN は軟骨の分化及び石灰化を抑制したため、次に *in vivo* において、GlcN が関節軟骨に与える影響を検討した。第1章において、我々は高P食がマウス後肢関節軟骨組織の変性を誘導することを報告した。そこで、10週齢のC57BL/6J雄性マウスを、通常食群(N)、高P食群(P)、0.02%GlcN摂取群(GlcN)、0.02%GlcNac摂取群(GlcN)の4群(n=6)に分け、3週間飼育した。

飼育終了後、後肢関節軟骨を摘出し、 $\mu$ CTを用いて、硬組織の構造を比較し、関節腔、軟骨層及び軟骨層を支持する骨組織の3つを含む硬組織の構造に与える影響を検討した。その結果、GlcNは、関節腔と軟骨層の厚さがCと比較して増加した。また、軟骨層を支持する骨組織は、GlcNはCと比較して、骨密度が増加傾向であった。一方、GlcNacは、関節腔と軟骨層の厚さ及び軟骨層を支持する骨組

織の骨密度がCと同程度だった(Figure 23)。

次に、非脱灰切片を作製し、軟骨層を比較した。その結果、GlcNはCと比較して軟骨層が厚かった。さらにGlcNはCと比較して、面積あたりの軟骨細胞数が増加した。一方、GlcNAcは、Cと比較して、面積あたりの軟骨細胞数はわずかに増加したが、軟骨層の厚さはCと同程度だった(Figure 24)。

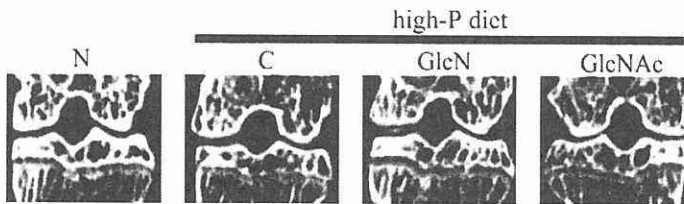


Figure 23. Micro-CT analysis of the articular cartilage in longitudinal sections of phosphorus-induced abnormal articular cartilage mice. Normal diet (N), 1.5% phosphorus diet (C), 1.5% phosphorus and 0.02% glucosamine (GlcN), and 1.5% phosphorus and 0.02% N-acetyl glucosamine (GlcNAc) were fed for 3 weeks each groups. Photographs representative of the typical results found for each group (n=6) are shown.

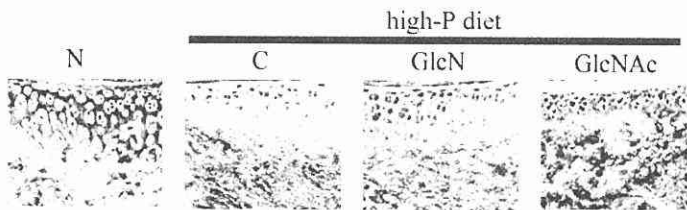


Figure 24. Effect of GlcN and GlcNAc on thickness of articular cartilage in phosphorus-induced abnormal articular cartilage mice. normal diet (N), 1.5% phosphorus diet (C), 1.5% phosphorus and 0.02% glucosamine (GlcN), and 1.5% phosphorus and 0.02% N-acetyl glucosamine (GlcNAc) were fed for 3 weeks each groups. Photographs representative of the typical results found for each group (n=6) are shown.

#### 第4節 本章の小括および考察

GAG は軟骨組織の圧縮低抗性を維持するために重要な構成成分である。軟骨組織特異的な主要 GAG は、ヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸である。GlcN は、関節機能障害におけるヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸などの基質供給の目的で、摂取されている。GlcN は大規模な臨床試験が行われているが、有効性についての見解の一致はまだ成されていない[87, 88]。また、GlcN の作用メカニズムも不明な点が多い。いわゆる健康食品として流通している GlcN の多くは、キチンに含まれているため、カニやエビの殻を加水分解し製品化されている。キチンの加水分解物中には、GlcN の他に GlcNAc や (GlcN)<sub>2</sub> など複数のグルコサミンアナログが含まれる[91]。最近の報告で、GlcNAc は軟骨保護作用を有する可能性が示唆されている[92]。また、キトサン加水分解物やコンドロイチン硫酸を経口摂取した時に、血中に二糖やオリゴ糖が検出されることも明らかになっている[93, 94]。しかし、グルコサミンアナログの有効性及び作用メカニズムは、ほとんど明らかになっていないのが現状である。

本実験の結果、GlcN は、その他のグルコサミンアナログと比較して、ATDC5 の増殖には影響を与えないが ALP 活性を低下させることが判明した。したがって、GlcN は軟骨細胞にシグナル分子として認識され、軟骨細胞の分化調節に関与している可能性が考えられた。また、GlcN にみられた軟骨分化調節作用は、GlcNAc 及びその他のグルコサミンアナログでは得られなかった。

GlcN は、軟骨 ECM において、GlcNAc 及び GalcNAc に変換された後、ヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸などの GAG に代謝される[95-98]。したがって、GlcN は GAG の構成糖に直接取り込まれることによって、軟骨 ECM の圧縮低抗性を増加させ、変形性関節症の疼痛緩和に寄与すると考えられている。動物実験において、GlcN を経口摂取後、GAG 量が増加することが報告されている[99]。しかし、別の

研究において、滑膜中には摂取した GlcN がほとんど到達しないことが報告されている[90]。これらの結果から、GlcN は GAG に直接構成糖として取り込まれるため、変形性関節症に有効であるのではなく、その他の作用メカニズムがある可能性を示唆している。

本実験で、GlcN は軟骨 ECM のヒアルロン酸量には影響を与えないが、コンドロイチン硫酸の量を増加させることを示した。ヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸が ATDC5 の石灰化に与える影響を調べた結果から、コンドロイチン硫酸はヒアルロン酸と比較して、石灰化を抑制することを示した。したがって、GlcN はコンドロイチン硫酸量を増加させることによって、成熟軟骨細胞から石灰化軟骨へ分化が誘導されることを抑制している可能性を示した。

石灰化抑制及びコンドロイチン硫酸産生誘導に関与する遺伝子を検討した。その結果、GlcN は MGP mRNA の発現を抑制したことから、GlcN は軟骨細胞の MGP 遺伝子発現を介して、石灰化を抑制した可能性が考えられた。さらに、コンドロイチン硫酸の産生を誘導した GlcN は、Smad2 と Smad4 mRNA の発現量を減少させた。Smad2 は TGF- $\beta$  の下流に存在する転写因子として知られている。また、Smad2 は、Sox9 及び Runx2 と結合し、軟骨の分化過程を調節している可能性が報告されている。以上のことより、GlcN の石灰化抑制作用は、Smad2 の発現調節を介し、Smad2 が関与する SOX9 及び Runx2 の遺伝子発現制御を通じて、最終的にその下流の MGP や軟骨基質タンパク質の発現を制御している可能性が考えられた。

以上、本実験の結果、GAG の代謝産物である GlcN は、軟骨細胞にシグナル分子として認識されることによって、関節軟骨の正常な代謝を維持する可能性が示唆された。一方、その他の GAG の代謝産物である GlcNAc など GlcN アナログは、GlcN と異なり、軟骨細胞にシグナル分子としては認識されないものと考えられた。さらに、GlcN を摂取することによって、関節軟骨の変性を抑制できる可能性が示唆

された。GlcN の軟骨代謝維持メカニズムは、転写因子の 1 つである Smad2、Smad4 の mRNA 発現を調節することにより、MGP などその他の軟骨特異的遺伝子の発現を介して、コンドロイチン硫酸の存在量を保持し、石灰化を抑制している可能性が考えられた。すなわち、GlcN は、正常な関節軟骨代謝の維持に重要な因子であることを初めて見出した。

### 第3章 細胞外基質分子であるコラーゲン代謝産物が関節軟骨細胞の機能制御に与える影響

軟骨のECMには豊富なCol2が存在している。Col2の前駆体であるプロコラーゲンは軟骨細胞が産生している。Col2は、プロコラーゲンが三重鎖を形成し、さらに、その高分子がコラーゲン架橋形成する構造となっている[22]。形成されたコラーゲン架橋構造は、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)などのプロテアーゼによって代謝されている[100-102]。すなわち、軟骨細胞が正常なコラーゲン代謝を行うことは、関節軟骨の維持に重要である。

食品としても利用されているゼラチンは、コラーゲンを含むことから、皮膚や骨、軟骨などの結合組織の維持に作用すると考えられ、以前から摂取されてきた[12, 103, 104]。近年、関節症の機能改善を目的に、ゼラチンを加水分解したコラーゲンペプチド(CP)が利用されている[11]。低分子化したCPは、小腸において、ペプチドの状態で吸収されることも確認されている。CPの有効性は体感的に認められるものの、CPの軟骨細胞に及ぼす詳しい作用メカニズムは不明である。また、摂取コラーゲンの原料の差異によっても有効性が異なると考えられるが、違いは検討されていない。ECMタンパク質の加水分解物であるCPが、関節軟骨細胞の機能制御に与える影響を検討した。

#### 第1節 コラーゲンペプチドが培養軟骨細胞株ATDC5の分化制御に及ぼす影響

初めに、培養軟骨細胞株ATDC5を用いて、豚皮由来及び魚鱗由来CPが軟骨細胞の増殖・分化に与える影響を調べた。サンプルには酸処理した豚皮ゼラチンを酵素処理して得た豚皮由来CP(pCP)、魚鱗コラーゲンを酵素処理して得た魚鱗由来

CP (fCP) を用いた。DMEM/F12 培地にペプトン (Pe)、pCP、fCP をそれぞれ 1 mg/ml の終濃度で添加し、ATDC5 を培養した。培養 3 日後、pCP 及び fCP が ATDC5 の増殖に与える影響を、MTT アッセイを用いて検討した。その結果、各 CP は ATDC5 の増殖には影響を与えなかった (data not shown)。

一方、培養 5 日後、ALP 染色を用いて、ATDC5 の前肥大化軟骨細胞への分化に与える影響を検討した結果、pCP は ALP 活性を Pe の約 1/3 に抑制し、fCP は ALP 活性を Pe の約 2/3 に抑制した (Figure 25)。そこで、pCP 及び fCP が ATDC5 の石灰化に与える影響を、培養 35 日目に AR 染色を用いて検討した。その結果、pCP は顕著に ATDC5 の石灰化を抑制し、fCP は Pe の約 1/2 に石灰化を減少させた (Figure 26)。

CP は ATDC5 の増殖には影響を与えなかったが、石灰化とともに前肥大化軟骨細胞分化を抑制したため、CP が、成熟軟骨細胞が産生する GAG の量に与える影響を

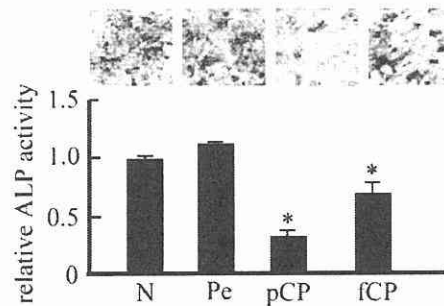


Figure 25. Effect of collagen peptides on alkaline phosphatase activity of ATDC5 cells. ATDC5 cells were plated at a density of  $5 \times 10^3$  cells/well in 96-well plates and cultured for 5 days in (N) normal medium, (Pe) 1 mg/ml peptone in normal medium, (pCP) 1 mg/ml SCP-5200 as pig-derived collagen in normal medium, (fCP) 1 mg/ml HDL-50F as fish-derived collagen in normal medium. After 5 days, the cells were stained ALP and parts of stained dishes were counted under a light microscope, and alkaline phosphatase stained area was quantified by densitometric analysis using videomicroscopy and image J software. The signal intensity of the stained cultures was determined by densitometry and expressed as a bar graph. Results represent mean  $\pm$  SD derived from three independent experiments, each experiments carried out 3 or 4 culture wells. Photographed were showed a typical data in these experiments. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.

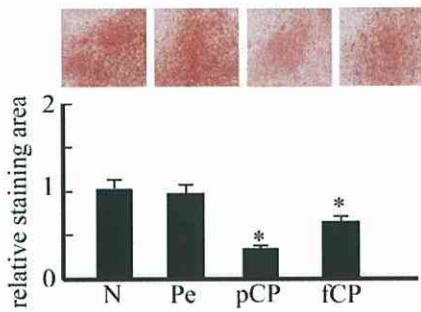


Figure 26. Effect of collagen peptides on calcification of ATDC5 cells. ATDC5 cells were cultured for 35 days in the various medium indicated in the legend of Figure 24, and were stained with alizarin red to identify calcium deposits. Results represent mean  $\pm$  SD derived from three independent experiments, each experiments carried out 3 or 4 culture wells. Photographed were showed a typical data in these experiments. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.

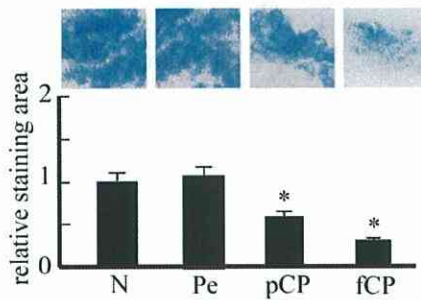


Figure 27. Effect of collagen peptides on amount of total GAG of ATDC5 cells. ATDC5 cells were cultured for 35 days in the various medium indicated in the legend of Figure 24, and were stained with alcian blue (pH 2.5) to identify total glycosaminoglycan. Results represent mean  $\pm$  SD derived from three independent experiments, each experiments carried out 3 or 4 culture wells. Photographed were showed a typical data in these experiments. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.

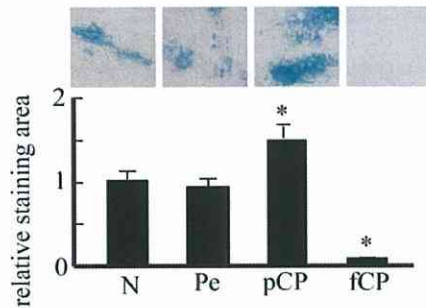


Figure 28. Effect of collagen peptides on amount of sulfated GAG of ATDC5 cells. ATDC5 cells were cultured for 35 days in the various medium in the legend of Figure 24, and were stained with alcian blue (pH 1.0) to identify sulfated glycosaminoglycan. Results represent mean  $\pm$  SD derived from three independent experiments, each experiments carried out 3 or 4 culture wells. Photographed were showed a typical data in these experiments. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.



検討した。AB 染色 (pH2.5) を用いて、ECM における総 GAG (ヒアルロン酸+コンドロイチン硫酸+ケラタン硫酸) の量を比較した結果、pCP は Pe と比較して総 GAG 量が約 2/3 に減少し、fCP は Pe と比較して総 GAG 量が約 1/3 に減少していた (Figure 27)。この結果は、石灰化及び ALP 活性の結果と類似していた。一方、AB 染色 (pH1.0) を用いて、硫酸基特異的 GAG (コンドロイチン硫酸+ケラタン硫酸) の量を比較した結果、総 GAG の染色結果と異なり、pCP は Pe と比較して硫酸基特異的 GAG 量が約 1.5 倍増加した。しかし、fCP の硫酸基特異的 GAG 量は、Pe の約 1/10 に減少し、石灰化及び ALP 活性値の結果と同様の傾向を示した (Figure 28)。これらの結果から、pCP 及び fCP は共に軟骨細胞の石灰化を抑制するが、その石灰化抑制メカニズムが異なる可能性が示唆された。

そこで、各種 CP が、軟骨培養細胞 ATDC5 における軟骨細胞基質遺伝子の mRNA 発現に与える影響を RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、pCP 及び fCP は、軟骨特異的コラーゲンである II 型コラーゲン前駆体の Col2 の mRNA 発現レベルには影響を与えなかった。一方、pCP は MGP mRNA の発現レベルを Pe と比較して約 1/2 量に減少させたが、BGP の mRNA 発現レベルには影響を与えなかった。一方、fCP は、MGP 及び BGP mRNA の発現レベルは Pe と比較して減少傾向を示したが、有意な差はなかった。さらに、各種コラーゲンペプチド (pCP・fCP) が軟骨特異的転写因子群の mRNA 発現レベルに与える影響を検討した結果、fCP は Smad2 と Smad4 の mRNA 発現レベルに影響を与えなかったが、pCP は Smad2 の mRNA 発現レベルを Pe と比較して約 1/2 に、Smad4 の mRNA 発現レベルを Pe と比較して約 2/3 に減少させた。さらに、pCP は Runx1 の mRNA 発現レベルを Pe と比較して約 1/2 に減少させた。この時、pCP 及び fCP は軟骨分化におけるマスター遺伝子である Sox9 及び Runx2 の mRNA 発現レベルに影響を与えなかった (Figure 29)。

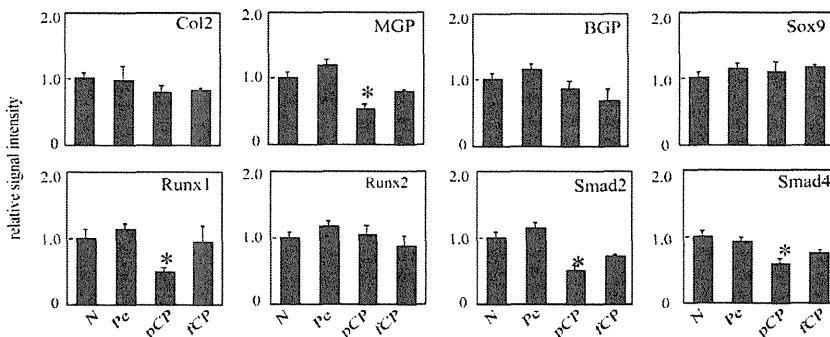


Figure 29. Collagen peptides modulated mRNA levels of chondrocyte matrix-related genes in ATDC5 cells. ATDC5 cells were cultured for 3 days in the various medium in the legend of Figure 24. Total RNA was then isolated and was used for RT-PCR analysis of COL2, MGP, BGP, Sox9, Runx1, Runx2, Smad2 and Smad4 mRNAs. PCR products were electrophoresed through agarose gels. All gels were digitally imaged flat head scanner and Adobe PhotoShop Elements. Band intensities of these digitally imaged were determined using Image J software from autoradiographs obtained from these digitally imaged gels at least 3 different experiments and the signals were normalized by those of GAPDH transcripts. Results represent mean  $\pm$  SD derived from three independent experiments, each experiments carried out 3 culture wells. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.

## 第2節 コラーゲンペプチドに含有する軟骨細胞機能制御に及ぼす活性ペプチドの探索

CP 摂取後、静脈血中に、ペプチド配列が PP、Ala-Hyp-Gly、Pro-Hyp、Pro-Hyp-Gly、Ile-Hyp、Leu-Hyp、Phe-Hyp のものが検出されることが報告されている [105]。そこで、動物由来の pCP と魚由来の fCP でみられた影響の違いを明らかにするため、アミノ酸配列の相違に着眼した。アミノ酸配列は、遺伝子情報が明らかになっているヒトとマウスとゼブラフィッシュを用いた。その結果、上記の静脈中に検出される配列中、PP 配列が、ゼブラフィッシュと比較してマウスとヒトで多く含まれている点に着目し、以下のアミノ酸及びペプチドを用いて実験を行った。

ATDC5 にグリシン (Gly)、プロリン (Pro)、ヒドロキシプロリン (Hyp)、プロリンとヒドロキシプロリン (Pro+Hyp)、グリシンとプロリンとヒドロキシプロリン (Gly+Pro+Hyp)、プロリンヒドロキシプロリン (Pro-Hyp)、プロリンヒドロキシ

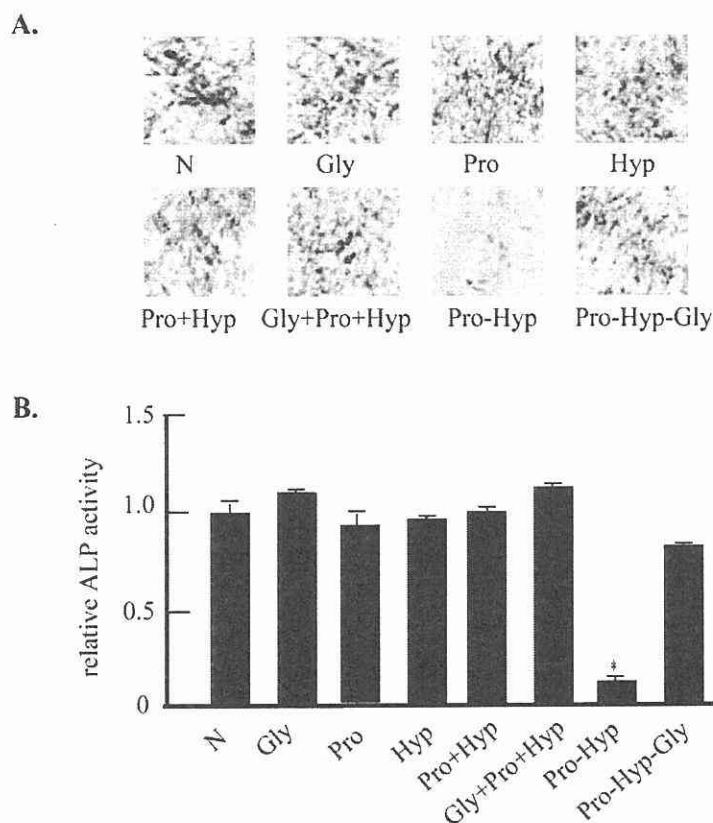


Figure 30. Effect of amino acid or peptide on ALP activity of ATDC5 cells. *A*: ATDC5 cells were cultured in normal medium (N) and medium containing 1 mg/ml Gly, Pro, Hyp, Pro+Hyp, Gly+Pro+Hyp, di-peptide of Pro-Hyp or tri-peptide of Pro-Hyp-Gly for 5 days. After cultured, the cells were stained with ALP. *B*: Graph showing the signal intensity of the stained area in each culture. Results represent the mean  $\pm$  SD derived from 3 independent experiments, with each experiment carried out using 5 culture wells. \*,  $p < 0.05$  using Student's *t* test.

プロリルグリシン (Pro-Hyp-Gly) を各 2.5 mM 添加した。5 日間培養後、ALP 染色を行い、ATDC5 の前肥大化軟骨細胞への分化に与える影響を検討した。その結果、N と比較して、Pro-Hyp のみが ATDC5 の ALP 活性を約 1/5 に低下させた (Figure 30)。次に、ATDC5 の培地中に Pro-Hyp を 0.1 mM、0.5 mM、1 mM、2.5 mM、5 mM 及び 10 mM 添加し、5 日間培養を行い、ALP 活性を比較した。その結果、1 mM Pro-Hyp は通常と比較して ALP 活性を約 2/3 に、2.5 mM Pro-Hyp は通常と比較して ALP 活性

を約 1/4 に、10 mM Pro-Hyp は通常と比較して ALP 活性を約 1/10 に減少させた (Figure 31)。すなわち、Pro-Hyp は濃度依存的に ALP 活性を低下させた。この結果から、ATDC5 の成熟軟骨細胞維持に関与するペプチドは Pro-Hyp 配列のジペプチドであることを明らかにした。

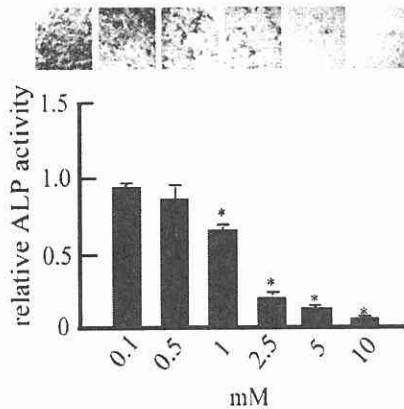


Figure 31. Effect of Pro-Hyp peptide on ALP activity of ATDC5 cells. A: ATDC5 cells were cultured in various Pro-Hyp peptide concentration medium for 5 days. After cultured, the cells were stained with ALP. B: Graph showing the signal intensity of the stained area in each culture. Results represent the mean  $\pm$  SD derived from 3 independent experiments, with each experiment carried out using 5 culture wells. \*,  $p < 0.05$  using Student's t test.

### 第3節 コラーゲンペプチド摂取がマウス関節軟骨に及ぼす影響

CP が *in vivo* において軟骨組織の機能改善に作用する可能性を検討するため、P を過剰投与した P 誘導性軟骨変性モデルマウスを用いて、pCP 及び fCP がマウス関節軟骨に与える影響を調べた。C57BL/BJ 雄性マウスを通常食群 (N)、コントロール食群 (C: 1.5% P and 5% guluten)、pCP 群 (1.5% P and 5% pCP)、fCP 群 (1.5% P and 5% fCP) の 4 群 (n=6) に分け、3 週間飼料を自由摂取させた。後肢を摘出後、 $\mu$ CT を用いて、硬組織の構造を比較し、関節腔、軟骨層及び軟骨層を支持する骨組織の 3 つを含む硬組織の構造に与える影響を検討した。その結果、pCP 及び fCP は、関節腔と軟骨層の厚さが C と比較して増加した。また、pCP は fCP と比較して、

軟骨層及び骨密度が増加傾向であった。また、軟骨層を支持する骨組織は、pCP と fCP は C と比較して、骨密度が増加傾向であった。さらに、pCP は fCP と比較して、軟骨層を支持する骨組織の骨密度が増加した (Figure 32)。

次に、非脱灰切片を作製し、軟骨層を比較した。その結果、pCP と fCP は C と比較して軟骨層が厚かった。また、pCP は fCP と比較して軟骨層が増加傾向だった。さらに、pCP は C と比較して、面積あたりの軟骨細胞数が増加した (Figure 33)。

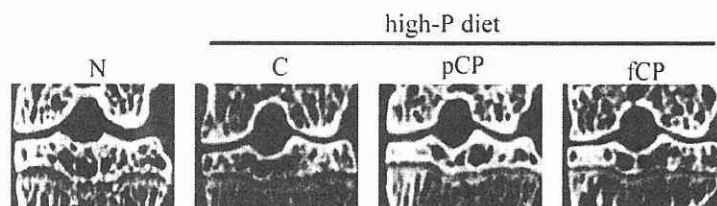


Figure 32. Micro-CT analysis of the articular cartilage in longitudinal sections of phosphorus-induced abnormal articular cartilage mice. Normal diet (N), 1.5% phosphorus and 5% gluten diet (C), 1.5% phosphorus and 5% pig-derived collagen peptide diet (pCP), and 1.5% phosphorus and 5% fish-derived collagen peptide diet (fCP) were fed for 3 weeks in C57BL/6J mice. Photographs representative of the typical results found for each group (n=6) are shown.

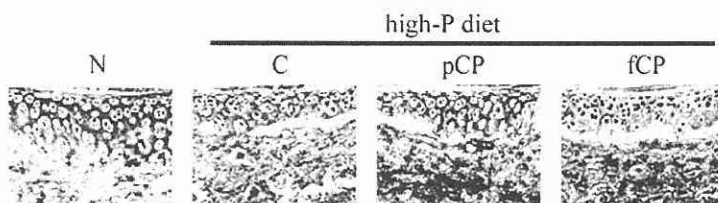


Figure 33. Effect of collagen peptides on thickness of articular cartilage in phosphorus-induced abnormal articular cartilage mice. Normal diet (N), 1.5% phosphorus and 5% gluten diet (C), 1.5% phosphorus and 5% pig-derived collagen peptide diet (pCP), and 1.5% phosphorus and 5% fish-derived collagen peptide diet (Gluten) were fed for 3 weeks. Photographs representative of the typical results found for each group (n=6) are shown.

#### 第4節 本章の小括および考察

本実験の結果、軟骨培養細胞株 ATDC5 において、CP は顕著に石灰化を抑制した。CP 添加は、ATDC5 増殖には影響を与えなかった。したがって、CP は、本実験で使用した濃度では、ATDC5 に細胞毒性を与えないと考えられた。一方、ALP 活性測定の結果、pCP は、fCP と比較して、ALP 活性が低値だった。CP は、ATDC5 の ALP 活性を抑制したことから、CP による石灰化抑制作用は、軟骨の分化調節を介している可能性が考えられた。また、CP の原料種によって、軟骨細胞の分化調節機能に与える影響が異なる可能性が考えられた。

さらに、CP が、ATDC5 の ECM の総 GAG 量及び硫酸基特異的 GAG 量に与える影響を検討した。その結果、pCP は、総 GAG 量をわずかに減少させたが、硫酸基特異的 GAG 量を増加させた。一方、fCP は、総 GAG 量及び硫酸基特異的 GAG 量とともに減少させた。軟骨の代表的な GAG には、ヒアルロン酸及びアグリカンの側鎖であるコンドロイチン硫酸やケラタン硫酸がある[18, 21]。本実験の結果、pCP はヒアルロン酸ではなく、コンドロイチン硫酸やケラタン硫酸の産生調節を介して、石灰化を抑制している可能性が考えられた。

石灰化抑制及びコンドロイチン硫酸・ケラタン硫酸産生誘導に関与する遺伝子を検討した。その結果、pCP で MGP mRNA の発現レベルが抑制されていたことから、pCP は軟骨細胞の MGP 遺伝子発現を介して、石灰化を抑制した可能性が考えられた。さらに、コンドロイチン硫酸・ケラタン硫酸の産生を誘導した pCP は、Smad2 と Smad4 mRNA の発現量を減少させた。Smad2 は TGF- $\beta$  の下流に存在する転写因子として知られている。また、Smad2 は、Sox9 及び Runx2 と結合し、軟骨の分化過程を調節している可能性が報告されている。以上の結果から、pCP の石灰化抑制作用は、Smad2 の発現調節を介し、Smad2 が関与する SOX9 及び Runx2 の遺伝子発現制御を通じて、最終的にその下流の MGP や軟骨基質タンパク質の発現を制御してい

る可能性が考えられた。

近年の報告で、生体内においてコラーゲンの RGD 配列は、細胞表面のインテグリンレセプターと結合し、細胞の機能を調節していることが明らかになっている [106-109]。また、上皮細胞において、Gly-Pro-Hyp 配列がケラチノサイト増殖因子と結合することによって、細胞の増殖及び分化を調節していることが報告されている [110]。これらの報告は、生体内において、特定のペプチド配列が細胞機能を調節することを示している。C57/BL マウスを用いた実験では、CP を含むゼラチン加水分解物を放射線標識した後、経口摂取させた結果、分子量 500-15000 のペプチドが、ペプチドの形態で血中に取り込まれたことが報告されている [111]。ヒトにおいて、様々な配列及び分子量の CP を含むゼラチン加水分解物や軟骨組織抽出物を摂取した後、静脈中にペプチド配列が Ala-Hyp-Gly、Pro-Hyp、Pro-Hyp-Gly、Ile-Hyp、Leu-Hyp、Phe-Hyp などが検出されることが報告されている [105, 112]。この報告は、摂取した CP の一部の配列を持つペプチドは、消化管内において、アミノ酸まで分解された後に吸収されるのではなく、ペプチドのまま生体内に取り込まれ、代謝されていることが示唆される。本実験の結果から、本実験で用いた CP 中に含まれる活性ペプチド本体の一つは Pro-Hyp であることを明らかにした。また、Pro-Hyp-Gly のアミノ酸配列を有するトリペプチドは、ATDC5 の ALP 活性に影響を与えなかったことから、生体内において、長鎖コラーゲン中の Pro-Hyp 配列が直接軟骨細胞の機能制御に影響を与えているのではなく、コラーゲン代謝産物である Pro-Hyp 配列のジペプチドが、軟骨細胞に認識され、軟骨細胞の機能制御に影響を与えている可能性が考えられた。

以上の結果から、ECM タンパク質の加水分解物である CP は正常な関節軟骨代謝の維持に重要な因子であることを、初めて見出した。また、この軟骨代謝維持作用は、原料種による相違があることを明らかにし、pCP は fCP と比べ有用である可

能性を示した。さらに、Pro-Hyp が軟骨細胞の分化を調節する活性ペプチド本体であることを初めて明らかにした。



## 総括

本研究は、生体内における関節軟骨代謝の一部を明らかにすることを目的に実験を行った。すなわち、本研究では、関節軟骨細胞において組織のECM分子がシグナル分子として作用し、関節軟骨の維持に関与するか否かを *in vitro* 及び *in vivo* で検討した。さらに、関節軟骨代謝を明らかにすることにより、関節機能障害のリスクを低減あるいは治療に有効な分子の探索を行った。

本研究に基づき、以下の諸点を明らかにすることができた。

1. 硬組織の維持に重要なミネラルであるカルシウム、マグネシウム及びリンは、骨組織のみならず、関節軟骨の代謝にも重要な機能を有していることを明らかにした。石灰化成分であるカルシウム及びリンは、関節軟骨において、成熟軟骨細胞から石灰化軟骨への分化を誘導し、軟骨組織の変性を促進することを見出した。一方、同様に石灰化成分であるマグネシウムは、関節軟骨において、成熟軟骨細胞を維持し、軟骨組織の変性を抑制することを、初めて見出した。
2. GAGの基本構成糖であるグルコサミンは、関節軟骨において、成熟軟骨細胞を維持し、軟骨組織の変性を抑制することを明らかにした。グルコサミンによる成熟軟骨細胞維持メカニズムとしては、グルコサミンが軟骨細胞にシグナルとして認識されることにより、転写調節因子である Smad2 及び Smad4 の遺伝子発現調節を介して、軟骨ECMにおけるコンドロイチン硫酸を増加させ、MGPタンパク質の産生を抑制し、石灰化軟骨への分化を抑制していることを明らかにした。

3. ECM タンパク質の加水分解物であるコラーゲンペプチドは、成熟軟骨細胞を維持し、軟骨組織の変性を抑制することを明らかにした。コラーゲンペプチドによる成熟軟骨細胞維持メカニズムとしては、転写因子である Runx1 及び転写調節因子である Smad2 及び Smad4 の遺伝子発現調節を介して、軟骨 ECM におけるコンドロイチン硫酸を増加させ、MGP タンパク質の産生を抑制し、石灰化軟骨への分化を抑制していることを明らかにした。さらに、コラーゲンペプチド中に含まれる活性ペプチド本体は、プロリルヒドロキシプロリンであることを初めて見出した。
4. 関節軟骨において、成熟軟骨細胞の維持のポジティブマーカーとして、コンドロイチン硫酸が有用であることを見出した。
5. 関節軟骨において、成熟軟骨細胞の変性開始のマーカーとして、MGP 及び Smad2/4 を見出した。
6. 本実験において、ATDC5 を用いた *in vitro* の結果とマウスを用いた *in vivo* の結果は一致し、ATDC5 による石灰化アッセイ系は、発生及び内軟骨性骨化の研究のみならず、関節軟骨の研究に有用であることを見出した。

本研究により、軟骨代謝機構の分子メカニズムの一部を明らかにできた。すなわち、生体内において、軟骨 ECM 分子の代謝産物であるマグネシウム、グルコサミン、プロリルヒドロキシプロリンは、関節軟骨細胞に細胞外シグナル分子として作用し、軟骨機能を調節する可能性を明らかにした。また、これらの分子の積極的な摂取により、関節軟骨の変性を予防し、関節機能を正常に維持する可能性を示すことができた (Figure 33)。

今後、本研究の知見に基づき、関節機能障害の原因解明並びに予防法、治療法の確立などの応用も期待される。

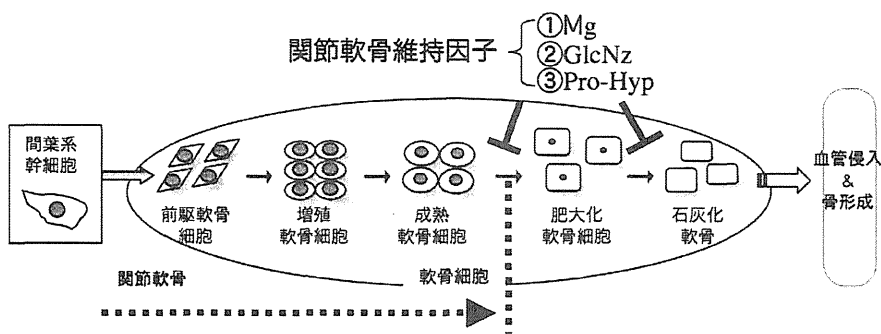


Figure 34. Conclusion

## 謝辞

本研究に際し、素晴らしいテーマを与えていただくとともに、終始ご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科食品機能学講座 和田政裕教授に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科食品機能学講座 真野博助教授に深謝の意を表します。

本学位論文の作成にあたり、ご閲覧とご教示を賜りました城西大学薬学部生化学講座 白幡晶教授並びに城西大学薬学部生体防御学講座 日比野 康英教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究に際し、有益なご助言並びにご激励賜りました城西大学薬学部食品機能学講座 清水 純講師、城西大学薬学部医療栄養学教育推進室助手 任 良赫助手、城西大学薬学部衛生化学講座 川嶋 洋一教授、城西大学薬学部衛生化学講座 工藤 なをみ助教授、城西大学薬学部生化学講座 池口 文彦助教授、城西大学薬学部病態解析学講座 大竹 一男助手、城西大学薬学部分子栄養学講座 千葉 大成助手、城西大学薬学部生体防御学講座 中谷 友美助手、城西大学薬学部衛生化学講座 外山 智章助手、東京都老人総合研究所 戸田 年総先生、明海大学歯学部口腔解剖学第一講座 久米川 正好教授、明海大学歯学部口腔解剖学第一講座 羽毛田 慈之教授、国立健康・栄養研究所 石見 佳子先生、順天堂大学医学部整形外科 黒澤 尚教授、順天堂大学医学部生化学第二講座 長岡 功教授、鳥取大学農学部獣医外科 南 三郎 教授、東京農業大学短期大学部栄養学科 松崎 広志講師に深謝の意を表します。

本研究に際し、グルコサミンアナログを提供して下さいました焼津水産化学工業株式会社並びに、コラーゲンペプチドを提供していただきました新田ゼラチン株式会社に感謝致します。

実験の一部にご協力いただきました関口裕介修士、山崎恭枝修士、青木今日子学士、工藤彩学士、平岡宏智学士、坂本梓学士に感謝致します。

最後に城西大学薬学部食品機能学講座関連諸氏のご協力並びにご理解の下に本研究を遂行できましたことを感謝致します。

## 実験の部

## 実験の部

### 第1章

#### 第1節 前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いた *in vitro* 実験系

##### ① 細胞培養

培養軟骨細胞株は、mouse teratocarcinoma cell AT805 由来の垂株である ATDC5 細胞を用いた (RIKEN Cell Bank No. RCB0565)。ATDC5 の培地は、1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's and Ham's F12 培地 (DMEM/F12; Invitrogen) に 5% Foetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen), 100  $\mu$ l/ml Penicillin, 50  $\mu$ l/ml Streptomycin を添加し用いた。ATDC5 は 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。継代は 0.25% トリプシン-0.02% EDTA 溶液 (Sigma Aldrich) を用い、2-3 日毎に行った。

DMEM/F12 培地中には、カルシウム源として約 1 mM 塩化カルシウム、マグネシウム源として約 0.7 mM 塩化マグネシウム及び硫酸マグネシウム、リン源として約 1 mM リン酸二水素ナトリウム一水和物及びリン酸水素二ナトリウムが含まれている。本実験では、カルシウム源として塩化カルシウム二水和物、マグネシウム源として塩化マグネシウム六水和物、無機リン源としてリン酸二水素ナトリウム一水和物、リン供給体としてグリセロール二リン酸二ナトリウム一水和物を用いた。

##### ② 細胞増殖

ATDC5 を  $5 \times 10^3$  cells/well ずつ、96 穴細胞培養用マイクロテストプレ

一トに播種し、24 時間培養後、Ca 及び Mg 及び P 添加培地へ培地交換をし、3 日間培養した。培養後、Cell Counting Kit-HS (DOJINDO) 試薬を培地の 1/10 量添加し、3 時間 37°C 5% CO<sub>2</sub> 存在下で静置し、プレートリーダー Wallac 1420ARVO. SX multilabel counter (WALLAC OY) を用いて、波長 450 nm で測定した。各測定値は、通常培地で培養した ATDC5 の測定値で除し、相対値を算出し比較した。

### ③ ALP 染色

0.05 M 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール溶液を作製し、塩酸を用いて、pH 9.8 に調整した溶液を 0.05 M AMP Buffer とし、ALP 染色液作製に用いた。10 mM NAPHTHOL AS-BI PHOSPHATE (SIGMA) 及び 1 mM FASTRED VIOLET LB SALT (SIGMA) を 0.05 M AMP Buffer に溶解し、ALP 染色液とした。ALP 活性測定に用いた細胞は、 $5 \times 10^3$  cells/well ずつ 96 穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24 時間培養後、Ca 及び Mg 及び P 添加培地へ培地交換をし、5 日間培養した ATDC5 を用いた。培養後、20% ホルマリンを用いて 20 分間固定し、3 回水洗した細胞を、ALP 染色液を用いて 37°C インキュベータ内で 15 分間反応させ、水洗を 10 回行った。染色後、フラットヘッドスキャナーを用いて、96 穴細胞培養用マイクロテストプレートの染色画像を取り込み、画像分析ソフト NIH-image を用いて、染色強度を数値化した。

### ④ AB 染色

Alcian Blue 8GX (Fluka) を 0.5 M CH<sub>3</sub>COOH (pH 2.5) あるいは 0.1 M HCl (pH 1.0) に溶解し、1% AB 溶液 (AB pH 2.5) ならびに (AB pH 1.0) を作製し



た。各 AB 溶液は用時濾過し、使用した。AB 染色に用いた細胞は、 $2.5 \times 10^4$  cells/well ずつ 24 穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24 時間培養後、測定分子添加培地へ培地交換をし、7, 14, 21 及び 28 日間培養した。培養期間中、3 日毎に培地交換を行った。培養後、20% ホルマリンを用いて 20 分間固定し、3 回水洗した細胞を、各々の AB 染色液を用いて室温で一晩反応させた。染色液で反応させた細胞を 0.5 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (pH2.5) あるいは 0.1 M  $\text{HCl}$  (pH1.0) を用いて洗浄後、10 回水洗を行った。染色後、フラットヘッドスキャナーを用いて、96 穴細胞培養用マイクロテストプレートの染色画像を取り込み、画像分析ソフト NIH-image を用いて、染色強度を数値化した。

#### ⑤ アリザリンレッド染色

アリザリンレッド染色は、ALIZARIN RED S-Certified(SIGMA)と 28%アンモニア水を用いて 1%アリザリンレッド溶液(pH 6.38)を作製し、染色に用いた。アリザリンレッド染色に用いた細胞は、 $2.5 \times 10^4$  cells/well ずつ 24 穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24 時間培養後、Ca 及び Mg 及び P 添加培地へ培地交換をし、7, 14, 21 及び 28 日間培養した。培養期間中、3 日毎に培地交換を行った。培養後、20% ホルマリンを用いて 20 分間固定し、3 回水洗した細胞を、アリザリンレッド染色液を用いて室温で 10 分間反応させた。反応させた細胞は、10 回水洗後、石灰化の評価に用いた。染色後、フラットヘッドスキャナーを用いて、24 穴細胞培養用マイクロテストプレートの染色画像を取り込み、画像分析ソフト NIH-image を用いて、染色強度を数値化した。染色結果は、画像分析ソフト NIH-image を用いて数値化した。

## ⑥ 免疫組織染色

免疫組織染色に用いる ATDC5 は、 $3 \times 10^4$  cells/well ずつ Lab-Tek 8 穴ガラススライド (Nalge Nunc International) に播種し、24 時間培養後、Ca 及び Mg 及び P 添加培地へ培地交換をし、2, 7 及び 28 日間培養した。培養期間中、3 日毎に培地交換を行った。培養後、ATDC5 を、ダルベッコ生理食塩水(日本製薬 (株)) を用いて 3 回洗浄した。洗浄した ATDC5 を、4%パラホルムアルデヒドを用いて 20 分間固定し、リン酸緩衝液 (PBS; 8 mM リン酸水素二ナトリウム十二水和物、2 mM リン酸二水素ナトリウム、0.2 M 塩化ナトリウム) で 10 分間 3 回洗浄した細胞を、免疫組織染色に用いた。

免疫組織染色の手順は、PBS で洗浄後、初めに $-20^{\circ}\text{C}$  メタノールと 30 分間反応させて抗原を活性化させた。次に、4%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /FBS 溶液と室温で 60 分間反応させた後、100% FBS を用いてブロッキングを行った。1 次抗体は抗 Matrix Gla Protein ポリクローナル抗体 (トランスジェニック (株)) を FBS 中に 1/200 量希釈し、反応に用いた。またネガティブコントロールとして、1 次抗体と反応させないサンプルも作製した。組織切片と 1 次抗体は湿潤箱の中に静置し、 $4^{\circ}\text{C}$  の条件下で一晩反応させた。1 次抗体の反応後、0.01 M PBS で洗浄し、100%FBS でブロッキング後、2 次抗体と反応させた。2 次抗体は、ZyMax™ goat anti-rabbit IgG (H+L) 抗体 (Zymed Laboratories, Inc.) を FBS 中に 1/200 量希釈し、反応に用いた。2 次抗体は湿潤箱の中に静置し、室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、免疫複合体の可視化は、ENVISION Kit/HRP (DAB; Dako Cytomation, Japan) を用いた。

免疫染色後、フラットヘッドスキャナーを用いて、Lab-Tek 8 穴 ガラススライドの染色画像を取り込み、画像分析ソフト NIH-image を用いて、染色強度を数値化した。染色結果は、画像分析ソフト NIH-image を用いて数値した。

#### ⑦ RT-PCR

RT-PCR 法に用いた細胞は、 $5 \times 10^5$  cells/well ずつ 60 mm プレートに播種し、24 時間培養後、Ca 及び Mg 及び P 添加培地へ培地交換をした。RNA は TRIZOL Reagent (Invitrogen) を用い抽出した。抽出した RNA は DPC 処理水に溶解後、分光光度計を用い定量した。

1 サンプルあたりの total RNA を  $1 \mu\text{g}$  含むように調整し、invitrogen 社の Superscript First-Strand Synthesis System を用いて逆転写酵素反応法 (RT) を行い、cDNA を作製した。RT の条件は  $50^\circ\text{C}$  90 min,  $99^\circ\text{C}$  5 min で行った。PCR は常法に従い Table 2 の条件で行った。

得られた PCR 産物を 2%アガロース (TAKARA) ゲルにて 100V で 20 分間電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液で、15 分間染色した後、245 nm の紫外線照射下 (3 UV トランスルミネータ) を用いて、バンドを確認し、ポラロイドカメラの Polapan 663 白黒インスタントパックフィルムを用いて、泳動画像を撮影した。泳動写真をフラットヘッドスキャナーを用いてデジタル画像化し、画像分析ソフト NIH-image を用いて、平均明度を数値化した。内部標準遺伝子である GAPDH の PCR 産物の示す明度に対する各遺伝子の PCR 産物の示す明度の相対値を算出し、各遺伝子の mRNA 発現レベルを比較した。

Table 2 *PCR-primers*

Gene	Sequence
Smad2	5'-CCCACTCCATTCCAGAAAAC-3' 3'-AACACCAGAATGCAGGTTCC-5'
Smad4	5'-CGTGCTTACCCACTGAAGGA-3' 3'-GCTGGCTGAGCAGTAAATCC-5'
Sox9	5'-TGCAGCACAAGAAAGACCAC-3' 3'-CCCTCTCGCTTCAGATCAAC-5'
Runx1	5'-ACTTCCTCTGCTCCGTGCTA-3' 3'-GGTCGTTGAATCTCGCTACC-5'
Runx2	5'-ATGGTGGAGATCATCGCGGACCACCCGGCC-3' 3'-ACACCTACTCTCATACTGGGATGAGGAATG-5'
Col2	5'-GTCGAGCAGCAAGAGCAAGGA-3' 3'-CTTGCCCCACTTACCAGTGTC-5'
MGP	5'-ATGAAGAGCCTGCTCCCTCT-3' 3'-CTAATATTGGCTCCTCGGC-5'
BGP	5'-GCAGCTTGGTGCACACCTAGCAGACACCAT-3' 3'-GGAGCTGCTGTGACATCCATACTTGCAGGG-5'

## ⑧ 統計処理

細胞実験はすべて、サンプルごとに3穴及び5穴を用いて、独立した実験を3回行った。結果はすべて、平均値  $\pm$  SD で示した。統計学的評価は、Stat Mate 3 ソフトウェア(ATMS)を用いて、t検定を行い、 $p < 0.05$  とした。細胞の染色写真は、各群の中から典型的な像を示した。

## 第2節 C57BL/6J mouse を用いた *in vivo* 実験系

### ① 実験動物

実験動物には、8週齢及び10週齢 C57BL/6J 雄性マウス（日本クレア（株））を用いた。本実験で用いたリン及びマグネシウム添加食は、AIN-93G 組成を基に、Morishita, K らの論文を参考に作成した。リン源としてリン酸二水素カリウム ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、マグネシウム源として塩化マグネシウム ( $\text{MgCl}_2$ ) を各々用いて、各飼料に添加した。 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  及び  $\text{MgCl}_2$  は、各々コーンスターチと置換した。飼料中のリン及びマグネシウム量は、日本食品分析センターで測定した。飼料組成を Table 2 に示した。リン及びマグネシウム添加食の実験では、Halloran BP らの論文から、C57BL/6J マウスにおいて、急激なマウスは体重増加及び骨密度の増加期が終了した 10 週齢のマウスを用いた[71]。無作為に 0.2 g P 及び 0.05 g Mg/100 g の通常食群、1.2 g P 及び 0.05 g Mg /100 g の高リン食群(high P)、0.2 g P 及び 0.8 g Mg/100 g の高マグネシウム食群(high Mg)、1.2 g P 及び 0.8 g Mg/100 g の高リン/高マグネシウム食群 (high P/high Mg) の4群 (n=6) に分け、飼料を自由摂取させ、3週間飼育を行った。若齢マ

Table 3 composition of experimental diets

g \ group	N	P	Mg	Mg/P
Casein	200	200	200	200
Lard	58.3	58.3	58.3	58.3
Corn oil	11.7	11.7	11.7	11.7
Mineral mixture (AIN-93G)	10	10	10	10
Vitamine mixture (AIN-93G)	35	35	35	35
L-cystin	3	3	3	3
Choline chloride	2.5	2.5	2.5	2.5
Sucrose	100	100	100	100
Cornstarch	529.5	484.63	466	420.2
Cellulose	50	50	50	50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	45.87	-	45.87
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	-	63.5	63.5
Total	1000	1000	1000	1000

ウスは8週齢 C57BL/6J 雄性マウスを用いた。高齢マウスは8週齢 C57BL/6J 雄性マウスに、市販固形飼料MF（オリエンタル酵母工業（株））を自由摂取させ、44週間飼育した。マウスは恒温恒湿度（室温  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 45%–50%）、12時間明暗サイクル（明期：8:00–20:00）の環境下で飼育を行った。また本実験は、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」（昭和55年3月総理府告示第6号）に基づいて行われた。

## ② 血液成分

マウスをジエチルエーテル下で麻酔し、心採血法を用いて血液を採取した。採取した血液は、室温で1時間静置後、2000Gで20分間遠心分離を行ない、上清を血清サンプルとして、使用時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。血清中の無機リンは、Phosphor C test WAKO（和光純薬（株））、血清中のマグネシウムは、Magnesium C test WAKO（和光純薬（株））を各々用いて測定した。

## ③ 脱灰切片作製

関節部の切片を作成するために、マウス後肢を摘出し、速やかに4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液（pH 7.2）を用いて、 $4^{\circ}\text{C}$ 、24時間固定した。固定後、12.5%スクロース溶液、25%スクロース溶液に順次浸透させ、15% EDTA/25%スクロース/リン酸緩衝溶液中で $4^{\circ}\text{C}$ 、7日間、脱灰化を行った。脱灰した組織は、リン酸緩衝溶液中に $4^{\circ}\text{C}$ で保存した。

切片作成の為に準備された組織は、Tissue-Tek O. C. T. compound (Sakura Finetek) を用いて包埋後、リサーチ用高機能クリオスタッド CM3050S (ライカ (株)) を用いて、 $-22^{\circ}\text{C}$  の条件下で、正中縦断面方向で、 $20\mu\text{m}$  の厚さ

に切断し、ガラスプレート上に貼付した。作製した切片は 1 時間風乾後、  
-80°Cで保存した。

#### ④ AB 染色

AB 染色に用いる切片は、4%パラホルム溶液を用いて、15 分間室温で固定し、0.1 M リン酸緩衝液 (PBS; pH7.4) で、3 回洗浄した。洗浄された切片は、第 1 節 ( ) に記載した AB 染色液を用いて、室温で一晩反応させ、PBS を用いて 10 回洗浄を行った。AB 染色後、カウンター染色として、マイヤー・ヘマトキシリン溶液 (和光純薬 (株)) 中で 2 分間反応させ、PBS を用いて、20 回洗浄を行った。染色された切片は、光学顕微鏡下で観察後、顕微鏡デジタルカメラシステム Penguin 600CL(ピクセラコーポレーション)を用いて、組織画像を取込み、上記システム専用ソフトウェアである In Studio(ピクセラコーポレーション)を用いて、形態計測を行った。

#### ⑤ 免疫組織染色

-80°Cで保存した組織切片を常温に静置した後、4%パラホルムアルデヒドを用いて 20 分間固定し、PBS で 10 分間 3 回洗浄し、免疫組織染色に用いた。

免疫組織染色は、第 1 章 第 1 節 (6) と同様の方法で行った。免疫組織染色後、カウンター染色として、マイヤー・ヘマトキシリン溶液 (和光純薬 (株)) 中で 2 分間反応させ、PBS を用いて、20 回洗浄を行った。染色された切片は、光学顕微鏡下で観察後、顕微鏡デジタルカメラシステム Penguin 600CL(ピクセラコーポレーション)を用いて、組織画像を取込み、上記システム専用ソフトウェアである In Studio(ピクセラコーポレーショ



ン)を用いて、形態計測を行った。

## ⑥ 統計処理

結果はすべて、6匹のマウスの平均値  $\pm$  SD で示した。統計学的評価は、Stat Mate 3 ソフトウェア(ATMS)を用いて、Two-way analysis of variance (ANOVA) で検討後、Tukey 検定法を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$  とした。組織切片の写真は、各群の中から典型的な像を示した。

## 第2章

### 第1節 前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いた *in vitro* 実験系

#### ① 細胞培養

細胞培養法は第1章 第1節 (1) と同様の方法を用いて行った。グルコサミン (GlcN) 及びグルコサミンアナログを通常培地中に、それぞれ最終濃度で 1mg/ml になるように添加した。GlcN 源としてはグルコサミン塩酸塩 (SIGMA) 及びグルコサミン硫酸塩 (SIGMA) を用いた。グルコサミンアナログは、グルコース (Glc) (SIGMA)、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) (SIGMA)、キトサンダイマー(GlcN)<sub>2</sub>(焼津水産工業(株))、キトビオース (GlcNAc)<sub>2</sub>(焼津水産工業(株))、ラクトース (Gal-Glc) (焼津水産工業(株))、ラクトサミン (Gal-GlcN) (焼津水産工業(株))、N-アセチルラクトサミン (Gal-GlcNAc) (焼津水産工業(株))、ガラクトース (Gal) (SIGMA)、ガラクトサミン (GalcN) (SIGMA)、N-アセチルガラクトサミン (GalcNAc) (SIGMA)、フルクトース (Fru) (SIGMA)、グルクロン酸 (GlcU)

(和光純薬)、グルクロノラクトン (GlcU1ac) (和光純薬) を用いた。

## ② 細胞増殖

ATDC5 を  $5 \times 10^3$  cells/well ずつ、96 穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24 時間培養後、GlcN 及びグルコサミンアナログ添加培地等へ培地交換をし、3 日間培養し、細胞増殖測定実験に用いた。細胞増殖は、第 1 章 第 1 節 (2) と同様の方法を用いて行った。

## ③ ALP 染色

ATDC5 を  $5 \times 10^3$  cells/well ずつ 96 穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24 時間培養後、GlcN 及びグルコサミンアナログ添加培地等へ培地交換をし、7 日間培養した。培養後、第 1 章 第 1 節 (3) と同様の方法を用いて ALP 染色を行った。

## ④ AB 染色

ATDC5 を  $2.5 \times 10^4$  cells/well ずつ 24 穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24 時間培養後、GlcN 添加培地等へ培地交換をし、35 日間培養した。培養期間中、3 日毎に培地交換を行った。培養後、第 1 章 第 1 節 (4) と同様の方法を用いて AB 染色を行った。

## ⑤ アリザリンレッド染色

ATDC5 を  $2.5 \times 10^4$  cells/well ずつ 24 穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24 時間培養後、GlcN 添加培地等へ培地交換をし、35 日間培養した。培養期間中、3 日毎に培地交換を行った。培養後、第 1 章 第

1 節 (5) と同様の方法を用いて AR 染色を行った。

#### ⑥ RT-PCR

ATDC5 を  $5 \times 10^5$  cells/well ずつ 60 mm プレートに播種し、72 時間培養後、GlcN 添加培地等へ培地交換をし、3 日間培養した。培養後、第 1 章 第 1 節 (7) と同様の方法を用いて RT-PCR 法を行った。

#### ⑦ 統計処理

細胞実験はすべて、サンプルごとに 3 穴及び 5 穴を用いて、独立した実験を 3 回行った。結果はすべて、平均値  $\pm$  SD で示した。統計学的評価は、Stat Mate 3 ソフトウェア (ATMS) を用いて、t 検定を行い、 $p < 0.05$  とした。細胞の染色写真は、各群の中から典型的な像を示した。

### 第 2 節 C57BL/6J mouse を用いた *in vivo* 実験系

#### ① 実験動物

実験動物には、9 週齢 C57BL/6J 雄性マウス (日本クレア (株)) を用いた。第 1 章 第 2 節 (1) で述べた方法で飼育された高リン食マウスを、コントロールの関節軟骨変性モデルマウスとして用いた。GlcN 及び GlcNAc は、コーンスターチと置換した。飼料組成を Table 3 に示した。予備飼育を 1 週間行った後、通常食群 (N)、コントロール食群 (C; 1.2% P)、グルコサミン添加食群 (GlcN; 1.2% P and 0.02% GlcN)、N-アセチルグル

Table 4 composition of experimental diets

group	g	N	1.5% P		
			C	GlcN	GlcNAc
Casein		200	200	200	200
Lard		58.3	58.3	58.3	58.3
Corn oil		11.7	11.7	11.7	11.7
Mineral mixture (AIN-93G)		10	10	10	10
Vitamine mixture (AIN-93G)		35	35	35	35
L-cystin		3	3	3	3
Choline chloride		2.5	2.5	2.5	2.5
Sucrose		100	100	100	100
Cornstarch		529.5	470.45	470.43	470.43
Cellulose		50	50	50	50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		-	59.05	59.05	59.05
Glucosamine		-	-	0.2	-
N-acetyl glucosamine		-	-	-	0.2
Total		1000	1000	1000	1000

コサミン添加食群 (GlcN; 1.2% P and 0.02% GlcNAc) の4群 (n=6) に無作為に分け、飼料を自由摂取させ、3週間飼育を行った。マウスは恒温恒湿度 (室温  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 45%–50%)、12時間明暗サイクル (明期: 8:00–20:00) の環境下で飼育を行った。また本実験は、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」(昭和55年3月総理府告示第6号)に基づいて行われた。本飼育開始後3週間後、各群6匹ずつ解剖を行い、後右肢は、70%エタノールを用いて各々固定し、使用時まで  $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。後左肢は、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液 (pH 7.2) を用いて  $4^{\circ}\text{C}$ 、3日間固定後、12.5% スクロース溶液、25% スクロース溶液に順次浸透させ、25% スクロース溶液に浸潤させた状態で、使用時まで  $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。

## ② 非脱灰凍結切片作製及びマイヤー・ヘマトキシリン染色

25% スクロース溶液中で保存した後肢は、皮膚及び筋肉部位のトリミングを行い、骨切断用解剖ペンチを用いて、膝関節を中心として、縦約3cmの長さに切断した。試料をステンレス製籠に乗せ、ドライアイスヘキサン冷却溶液を用いて、試料の急速凍結を行った。凍結させた試料を、CMCゲル中に没入し、ドライアイスヘキサン冷却溶液を用いて、完全に凍結させ、CMCブロックを作製した。

切片作成は、リサーチ用高機能クリオスタッド CM3050S(ライカ(株))を用いて、 $-22^{\circ}\text{C}$ の条件下で行った。非脱灰切片は、タングステンカーバイド製替刃を用いて、正中縦断面方向で、 $20\mu\text{m}$ の厚さに切断し、クライオフィルムトランスファーキット(ファインテック(株))を用いた粘着フィルム法で、切片を粘着フィルム上に密着させた。作製した切片は、両面テープを用いて、スライドガラスに固定後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

マイヤー・ヘマトキシリン溶液（和光純薬（株））中で2分間反応させ、PBSを用いて、20回洗浄を行った。染色された切片は、光学顕微鏡下で観察後、顕微鏡デジタルカメラシステム Penguin 600CL（ピクセラコーポレーション）を用いて、組織画像を取込み、上記システム専用ソフトウェアである In Studio（ピクセラコーポレーション）を用いて、関節軟骨層の厚さの計測を行った。

### ③ $\mu$ -CT

70%エタノールで固定を行った後肢は、皮膚及び筋肉を切除した後、膝関節を中心として、約 2 cm の長さになるように、骨切断用解剖ペンチを用いて切断した。トリミングを行った後肢を、パラフィルムで2重に巻き、粘土を用いて下部を固定し、測定中の試料の揺れを防止した。

MCT は卓上型マイクロ CT スキャナ SKYSCAN 1172 (SKYSCAN 社) を用いて測定を行った。分解能を  $10.6 \mu\text{m}$  に設定し、100 KV・100 $\mu\text{A}$  の管電圧・管電流の条件下で、 $0.5^\circ\text{C}$  ずつ試料を回転させ、 $360^\circ\text{C}$  測定を行った。

測定後の画像は、CT-analyser ソフトウェア (SKYSCAN 社) を用いて、CT-画像の統合を行い、縦断面図を構築した。

### ④ 統計処理

結果はすべて、6匹のマウスの平均値  $\pm$  SD で示した。統計学的評価は、Stat Mate 3 ソフトウェア (ATMS) を用いて、t 検定を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$  とした。組織切片の写真は、各群の中から典型的な像を示した。

## 第3章

### 第1節 前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いた *in vitro* 実験系

#### ① 細胞培養

細胞培養法は第1章 第1節 (1) と同様の方法を用いて行った。本実験では、酸処理した豚皮ゼラチンを酵素処理して得たコラーゲンペプチド；pig collagen peptide (pCP)：SCP-5200 (Lot. 050111521, 新田ゼラチン)、魚鱗コラーゲンを酵素処理して得たコラーゲンペプチド；fish collagen peptide (fCP)：イクオス HDL-50F (Lot. 0409014522, 新田ゼラチン)を用いた。ネガティブコントロールとしてペプトン (Pe, Becton-Dickinson) を用いた。PCP, fCP 及び Pe は、通常培地中に、それぞれ最終濃度で 1mg/ml になるように添加した。

#### ② 細胞増殖

ATDC5 を  $5 \times 10^3$  cells/well ずつ、96 穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24 時間培養後、PCP, fCP 及び Pe 添加培地等へ培地交換をし、3 日間培養し、細胞増殖測定実験に用いた。細胞増殖は、第1章 第1節 (2) と同様の方法を用いて行った。

#### ③ ALP 染色

ATDC5 を  $5 \times 10^3$  cells/well ずつ 96 穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24 時間培養後、PCP, fCP 及び Pe 添加培地等へ培地交換をし、

7日間培養した。培養後、第1章第1節(3)と同様の方法を用いてALP染色を行った。

#### ④ AB染色

ATDC5を $2.5 \times 10^4$  cells/well ずつ24穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24時間培養後、PCP、fCP及びPe添加培地等へ培地交換をし、35日間培養した。培養期間中、3日毎に培地交換を行った。培養後、第1章第1節(4)と同様の方法を用いてAB染色を行った。

#### ⑤ アリザリンレッド染色

ATDC5を $2.5 \times 10^4$  cells/well ずつ24穴細胞培養用マイクロテストプレートに播種し、24時間培養後、PCP、fCP及びPe添加培地等へ培地交換をし、35日間培養した。培養期間中、3日毎に培地交換を行った。培養後、第1章第1節(5)と同様の方法を用いてAR染色を行った。

#### ⑥ RT-PCR

ATDC5を $5 \times 10^5$  cells/well ずつ60 mmプレートに播種し、72時間培養後、PCP、fCP及びPe添加培地等へ培地交換をし、3日間培養した。培養後、第1章第1節(7)と同様の方法を用いてRT-PCR法を行った。

#### ⑦ 統計処理

細胞実験はすべて、サンプルごとに3穴及び5穴を用いて、独立した実験を3回行った。結果はすべて、平均値  $\pm$  SD で示した。統計学的評価は、Stat Mate 3 ソフトウェア(ATMS)を用いて、t検定を行い、 $p < 0.05$  とし



た。細胞の染色写真は、各群の中から典型的な像を示した。

## 第2節 C57BL/6J mouse を用いた *in vivo* 実験系

### ① 実験動物

実験動物には、9週齢 C57BL/6J 雄性マウス（日本クレア（株））を用いた。第1章 第2節（1）で述べた方法で飼育された高リン食マウスを、関節軟骨変性モデルマウスとして用いた。pCP 及び fCP は、カゼインと置換した。また、ネガティブコントロールとしてグルテンを用いた。飼料組成を Table 4 に示した。予備飼育を1週間行った後、通常食群(N)、コントロール食群 (C; 1.2% P, 5% グルテン)、pCP 添加食群 (pCP; 1.2% P and 5% pCP)、fCP 添加食群 (fCP; 1.2% P and 5% fCP) の4群 (n=6) に無作為に分け、飼料を自由摂取させ、3週間飼育を行った。マウスは恒温恒湿度（室温  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 45%–50%）、12時間明暗サイクル（明期: 8:00–20:00）の環境下で飼育を行った。また本実験は、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」（昭和55年3月総理府告示第6号）に基づいて行われた。本飼育開始後3週間後、各群6匹ずつ解剖を行い、後右肢は、70%エタノールを用いて各々固定し、使用時まで4°Cで保存した。後左肢は、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液（pH 7.2）を用いて4°C、3日間固定後、12.5%スクロース溶液、25%スクロース溶液に順次浸透させ、25%スクロース溶液に浸潤させた状態で、使用時まで4°Cで保存した。

### ② 非脱灰凍結切片作製及びマイヤー・ヘマトキシリン染色

非脱灰凍結切片作製及びマイヤー・ヘマトキシリン染色は、第2章

2 節 (2) と同様の方法で行った。

③  $\mu$ -CT

$\mu$ -CT を用いた硬組織構造比較は、第 2 章 第 2 節 (3) と同様の方法で行った。

④ 統計処理

結果はすべて、6 匹のマウスの平均値  $\pm$  SD で示した。統計学的評価は、Stat Mate 3 ソフトウェア (ATMS) を用いて、t 検定を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$  とした。組織切片の写真は、各群の中から典型的な像を示した。

Table 5 composition of experimental diets

group g	N	1.5% P		
		C	pCP	fCP
Casein	200	150	150	150
Lard	58.3	58.3	58.3	58.3
Corn oil	11.7	11.7	11.7	11.7
Mineral mixture (AIN-93G)	10	10	10	10
Vitamine mixture (AIN-93G)	35	35	35	35
L-cystin	3	3	3	3
Choline chloride	2.5	2.5	2.5	2.5
Sucrose	100	100	100	100
Cornstarch	529.5	470.45	470.43	470.43
Cellulose	50	50	50	50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	59.05	59.05	59.05
Gluten	-	50	-	-
pCP	-	-	50	-
fCP	-	-	-	50
Total	1000	1000	1000	1000

## 引用文献

- [1] Scott, J.E., *Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model.* J Physiol, 2003. **553** (Pt 2): p. 335-43.
- [2] Blair, H.C., M. Zaidi, and P.H. Schlesinger, *Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation.* Biochem J, 2002. **364** (Pt 2): p. 329-41.
- [3] J. Frederick Woessner, J. and D.S. Howell, *Joint Cartilage Degradation.* 1993, Dekker. p. 37-65.
- [4] Giachelli, C.M., *Ectopic calcification: new concepts in cellular regulation.* Z Kardiol, 2001. **90 Suppl 3**: p. 31-7.
- [5] Shitama, K., *Calcification of aging articular cartilage in man.* Acta Orthop Scand, 1979. **50** (6 Pt 1): p. 613-9.
- [6] Bundens, W.D., Jr., C.T. Brighton, and G. Weitzman, *Primary Articular-Cartilage Calcification with Arthritis (Pseudogout Syndrome).* J Bone Joint Surg Am, 1965. **47**: p. 111-22.
- [7] Lawrence, R.C., et al., *Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States.* Arthritis Rheum, 1998. **41** (5): p. 778-99.
- [8] Felson, D.T. and Y. Zhang, *An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention.* Arthritis Rheum, 1998. **41** (8): p. 1343-55.
- [9] Pelletier, J.P., et al., *Chondrocyte death in experimental*

- osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase.* J Rheumatol, 2001. **28**(11): p. 2509-19.
- [10] Halbert, J., et al., *Primary care-based physical activity programs: effectiveness in sedentary older patients with osteoarthritis symptoms.* Arthritis Rheum, 2001. **45**(3): p. 228-34.
- [11] Goggs, R., et al., *Nutraceutical therapies for degenerative joint diseases: a critical review.* Crit Rev Food Sci Nutr, 2005. **45**(3): p. 145-64.
- [12] Fujita, T., et al., *The effect of active absorbable algal calcium (AAA Ca) with collagen and other matrix components on back and joint pain and skin impedance.* J Bone Miner Metab, 2002. **20**(5): p. 298-302.
- [13] Deal, C.L. and R.W. Moskowitz, *Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis. The role of glucosamine, chondroitin sulfate, and collagen hydrolysate.* Rheum Dis Clin North Am, 1999. **25**(2): p. 379-95.
- [14] Cancedda, R., et al., *Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis.* Int J Dev Biol, 2000. **44**(6): p. 707-14.
- [15] Chung, U. I., *Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development.* Endocr J, 2004. **51**(1): p. 19-24.
- [16] Shum, L. and G. Nuckolls, *The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton.* Arthritis Res, 2002. **4**(2): p. 94-106.
- [17] Yamashiro, T., et al., *Possible roles of Runx1 and Sox9 in incipient intramembranous ossification.* J Bone Miner Res, 2004. **19**(10): p. 1671-7.
- [18] Kiani, C., et al., *Structure and function of aggrecan.* Cell Res, 2002.

- 12(1): p. 19–32.
- [19] Laurent, T., *The biology of hyaluronan. Introduction*. Ciba Found Symp, 1989. **143**: p. 1–20.
- [20] Roughley, P.J. and E.R. Lee, *Cartilage proteoglycans: structure and potential functions*. Microsc Res Tech, 1994. **28**(5): p. 385–97.
- [21] Wusteman, F.S. and G.C. Gillard, *Hyaluronic acid in elastic cartilage*. Experientia, 1977. **33**(6): p. 721–3.
- [22] Eyre, D., *Collagen of articular cartilage*. Arthritis Res, 2002. **4**(1): p. 30–5.
- [23] Zaucke, F., et al., *Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 17–24.
- [24] Balcerzak, M., et al., *The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(4): p. 1019–38.
- [25] Fedde, K.N., et al., *Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(12): p. 2015–26.
- [26] Hale, J.E., J.D. Fraser, and P.A. Price, *The identification of matrix Gla protein in cartilage*. J Biol Chem, 1988. **263**(12): p. 5820–4.
- [27] Yagami, K., et al., *Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb*. J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 1097–108.
- [28] Canfield, A.E., et al., *Matrix Gla protein is differentially expressed*

- during the deposition of a calcified matrix by vascular pericytes. FEBS Lett, 2000. **487**(2): p. 267-71.
- [29] Spronk, H.M., et al., *Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(2): p. 485-90.
- [30] Koshihara, Y. and K. Hoshi, *Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(3): p. 431-8.
- [31] Ganan, Y., et al., *Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod*. Development, 1996. **122**(8): p. 2349-57.
- [32] Wrana, J.L., *Regulation of Smad activity*. Cell, 2000. **100**(2): p. 189-92.
- [33] Reguly, T. and J.L. Wrana, *In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic shuttling*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(5): p. 216-20.
- [34] Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. ten Dijke, *TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. Nature, 1997. **390**(6659): p. 465-71.
- [35] Ferguson, C.M., et al., *Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta1-induced inhibition of chondrocyte maturation*. Endocrinology, 2000. **141**(12): p. 4728-35.
- [36] Selvamurugan, N., et al., *Transforming growth factor-beta 1 regulation of collagenase-3 expression in osteoblastic cells by cross-talk between the Smad and MAPK signaling pathways and their components, Smad2 and*

- Runx2*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 19327-34.
- [37] Furumatsu, T., et al., *Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8343-50.
- [38] Zwijsen, A., K. Verschueren, and D. Huylebroeck, *New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 133-9.
- [39] Derynck, R. and Y. E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
- [40] Tanigawa, T., et al., *TGF-beta signaling pathway: its role in gastrointestinal pathophysiology and modulation of ulcer healing*. J Physiol Pharmacol, 2005. **56**(1): p. 3-13.
- [41] Huang, W., et al., *The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 160-5.
- [42] Yan, Y.L., et al., *A zebrafish sox9 gene required for cartilage morphogenesis*. Development, 2002. **129**(21): p. 5065-79.
- [43] Wang, Y., et al., *Runx1/AML1/Cbfa2 mediates onset of mesenchymal cell differentiation toward chondrogenesis*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(9): p. 1624-36.
- [44] Enomoto, H., et al., *Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8695-702.
- [45] Enomoto, H., et al., *Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic*



- changes in vitro*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 3): p. 417-25.
- [46] Xiao, Z. S., A.B. Hjelmeland, and L.D. Quarles, *Selective deficiency of the "bone-related" Runx2-II unexpectedly preserves osteoblast-mediated skeletogenesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20307-13.
- [47] Atsumi, T., et al., *A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells*. Cell Differ Dev, 1990. **30**(2): p. 109-16.
- [48] Mano, H., et al., *IF3, a novel cell-differentiation factor, highly expressed in murine liver and ovary*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(2): p. 323-8.
- [49] Nakatani, S., et al., *Excess magnesium inhibits excess calcium-induced matrix-mineralization and production of matrix gla protein (MGP) by ATDC5 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(3): p. 1157-62.
- [50] Green, J., *The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements*. Miner Electrolyte Metab, 1994. **20**(1-2): p. 7-15.
- [51] Hercz, G., *Regulation of bone remodeling: impact of novel therapies*. Semin Dial, 2001. **14**(1): p. 55-60.
- [52] Abraham L Kierszenbaum, *HISTOROGY and CELL BIOLOGY*. 2002: Mosby. 131-145.
- [53] Mansfield, K., et al., *Induction of apoptosis in skeletal tissues: phosphate-mediated chick chondrocyte apoptosis is calcium dependent*. Calcif Tissue Int, 2003. **73**(2): p. 161-72.
- [54] Adams, C. S., et al., *Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20316-22.

- [55] Brown, E.M., et al., *Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid*. *Nature*, 1993. **366**(6455): p. 575-80.
- [56] Tu, Q., et al., *Rescue of the skeletal phenotype in CasR-deficient mice by transfer onto the Gcm2 null background*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(7): p. 1029-37.
- [57] Riccardi, D., et al., *Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(1): p. 131-5.
- [58] Kameda, T., et al., *Calcium-sensing receptor in mature osteoclasts, which are bone resorbing cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **245**(2): p. 419-22.
- [59] Chang, W., et al., *Extracellular Ca(2+)-sensing receptors modulate matrix production and mineralization in chondrogenic RCJ3.1C5.18 cells*. *Endocrinology*, 2002. **143**(4): p. 1467-74.
- [60] Pi, M., et al., *Sensing of extracellular cations in CasR-deficient osteoblasts. Evidence for a novel cation-sensing mechanism*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(5): p. 3256-63.
- [61] Takeyama, S., et al., *Low calcium environment effects osteoprotegerin ligand/osteoclast differentiation factor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **276**(2): p. 524-9.
- [62] Hebert, S.C., E.M. Brown, and H.W. Harris, *Role of the Ca(2+)-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis*. *J Exp Biol*, 1997. **200**(Pt 2): p. 295-302.

- [63] Garner, S. C., et al., *Rickets in cation-sensing receptor-deficient mice: an unexpected skeletal phenotype*. *Endocrinology*, 2001. **142** (9): p. 3996-4005.
- [64] Karpouzas, G. A. and R. A. Terkeltaub, *New developments in the pathogenesis of articular cartilage calcification*. *Curr Rheumatol Rep*, 1999. **1** (2): p. 121-7.
- [65] Wallin, R., et al., *Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy*. *Med Res Rev*, 2001. **21** (4): p. 274-301.
- [66] Schulz, E., et al., *Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89** (9): p. 4246-53.
- [67] Saris, N. E., et al., *Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects*. *Clin Chim Acta*, 2000. **294** (1-2): p. 1-26.
- [68] Kuro-o, M., et al., *Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing*. *Nature*, 1997. **390** (6655): p. 45-51.
- [69] Morishita, K., et al., *The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc*. *J Nutr*, 2001. **131** (12): p. 3182-8.
- [70] Fujita, T., et al., *Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **280** (1): p. 348-52.
- [71] Halloran, B. P., et al., *Changes in bone structure and mass with advancing age in the male C57BL/6J mouse*. *J Bone Miner Res*, 2002. **17** (6): p. 1044-50.
- [72] Kalya, S. and A. K. Rosenthal, *Extracellular matrix changes regulate*

- calcium crystal formation in articular cartilage*. *Curr Opin Rheumatol*, 2005. 17 (3): p. 325-9.
- [73] Liu, S.K., *Metabolic disease in animals*. *Semin Musculoskelet Radiol*, 2002. 6 (4): p. 341-6.
- [74] Wang, D., et al., *Alterations in the sensing and transport of phosphate and calcium by differentiating chondrocytes*. *J Biol Chem*, 2001. 276 (36): p. 33995-4005.
- [75] Otawara, Y. and P.A. Price, *Developmental appearance of matrix GLA protein during calcification in the rat*. *J Biol Chem*, 1986. 261 (23): p. 10828-32.
- [76] Reeves, P.G., K.L. Rossow, and J. Lindlauf, *Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice*. *J Nutr*, 1993. 123 (11): p. 1923-31.
- [77] Masuyama, R., et al., *Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice*. *Endocrinology*, 2001. 142 (1): p. 494-7.
- [78] Masuyama, R., et al., *Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption*. *J Bone Miner Res*, 2003. 18 (7): p. 1217-26.
- [79] van den Broek, F.A. and A.C. Beynen, *The influence of dietary phosphorus and magnesium concentrations on the calcium content of heart and kidneys of DBA/2 and NMRI mice*. *Lab Anim*, 1998. 32 (4): p. 483-91.

- [80] Kurosu, H., et al., *Suppression of aging in mice by the hormone Klotho*. Science, 2005. **309** (5742): p. 1829–33.
- [81] Watanabe, H., et al., *Dwarfism and age-associated spinal degeneration of heterozygote mice defective in aggrecan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94** (13): p. 6943–7.
- [82] Sharif, M., et al., *The relevance of chondroitin and keratan sulphate markers in normal and arthritic synovial fluid*. Br J Rheumatol, 1996. **35** (10): p. 951–7.
- [83] Belcher, C., et al., *Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees*. Ann Rheum Dis, 1997. **56** (5): p. 299–307.
- [84] Venkatesan, N., et al., *Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-I gene delivery: a strategy to promote cartilage repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101** (52): p. 18087–92.
- [85] Nakatani, S., et al., *Glucosamine regulates differentiation of a chondrogenic cell line, ATDC5*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006. **30** (3): 433–8.
- [86] Watanabe, H., Y. Yamada, and K. Kimata, *Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function*. J Biochem (Tokyo), 1998. **124** (4): p. 687–93.
- [87] Theodosakis, J., *A randomized, double blind, placebo controlled trial of a topical cream containing glucosamine sulfate, chondroitin sulfate, and camphor for osteoarthritis of the knee*. J Rheumatol, 2004. **31** (4): p. 826; author reply 826–7.

- [88] Grove, M. L. , *A randomized, double blind, placebo controlled trial of a topical cream containing glucosamine sulfate, chondroitin sulfate, and camphor for osteoarthritis of the knee.* J Rheumatol, 2004. **31** (4): p. 826; author reply 826-7.
- [89] Anderson, J. W., R. J. Nicolosi, and J. F. Borzelleca, *Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy.* Food Chem Toxicol, 2005. **43** (2): p. 187-201.
- [90] Laverty, S., et al., *Synovial fluid levels and serum pharmacokinetics in a large animal model following treatment with oral glucosamine at clinically relevant doses.* Arthritis Rheum, 2005. **52** (1): p. 181-91.
- [91] Chen, A. S., et al., *Antioxidant activities of chitobiose and chitotriose.* Biol Pharm Bull, 2003. **26** (9): p. 1326-30.
- [92] Shikhman, A. R., et al., *Chondroprotective activity of N-acetylglucosamine in rabbits with experimental osteoarthritis.* Ann Rheum Dis, 2005. **64** (1): p. 89-94.
- [93] Yamada, K., et al., *Chitosan oligomers as potential and safe absorption enhancers for improving the pulmonary absorption of interferon-alpha in rats.* J Pharm Sci, 2005. **94** (11): p. 2432-40.
- [94] Du, J., N. White, and N. D. Eddington, *The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate after oral and intravenous single dose administration in the horse.* Biopharm Drug Dispos, 2004. **25** (3): p. 109-16.
- [95] Silbert, J. E. and G. Sugumaran, *Biosynthesis of chondroitin/dermatan*

- sulfate*. IUBMB Life, 2002. **54**(4): p. 177-86.
- [96] Mroz, P. J. and J.E. Silbert, *Use of 3H-glucosamine and 35S-sulfate with cultured human chondrocytes to determine the effect of glucosamine concentration on formation of chondroitin sulfate*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(11): p. 3574-9.
- [97] Kim, J. J. and H. E. Conrad, *Effect of D-glucosamine concentration on the kinetics of mucopolysaccharide biosynthesis in cultured chick embryo vertebral cartilage*. J Biol Chem, 1974. **249**(10): p. 3091-7.
- [98] Mroz, P. J. and J.E. Silbert, *Effects of [3H]glucosamine concentration on [3H]chondroitin sulphate formation by cultured chondrocytes*. Biochem J, 2003. **376**(Pt 2): p. 511-5.
- [99] Tiralocche, G., et al., *Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(4): p. 1118-28.
- [100] Inada, M., et al., *Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17192-7.
- [101] Vu, T.H., et al., *MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes*. Cell, 1998. **93**(3): p. 411-22.
- [102] Oesser, S. and J. Seifert, *Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen*. Cell Tissue Res, 2003. **311**(3): p. 393-9.
- [103] Moskowitz, R. W., *Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease*.

- Semin Arthritis Rheum, 2000. **30** (2): p. 87-99.
- [104] Wu, J., et al., *Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats.* J Bone Miner Metab, 2004. **22** (6): p. 547-53.
- [105] Iwai, K., et al., *Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates.* J Agric Food Chem, 2005. **53** (16): p. 6531-6.
- [106] Smith, J.W. and D.A. Cheresh, *Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor.* J Biol Chem, 1990. **265** (4): p. 2168-72.
- [107] Helfrich, M.H., et al., *Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a beta 3 integrin.* J Bone Miner Res, 1992. **7** (3): p. 335-43.
- [108] Sarin, V., et al., *Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-containing peptides inhibit the force production of mouse papillary muscle bundles via alpha 5 beta 1 integrin.* J Physiol, 2005. **564** (Pt 2): p. 603-17.
- [109] Hsu, S.H., et al., *Evaluation of biodegradable polyesters modified by type II collagen and Arg-Gly-Asp as tissue engineering scaffolding materials for cartilage regeneration.* Artif Organs, 2006. **30** (1): p. 42-55.
- [110] Ruehl, M., et al., *The epithelial mitogen keratinocyte growth factor binds to collagens via the consensus sequence glycine-proline-hydroxyproline.* J Biol Chem, 2002. **277** (30): p. 26872-8.



- [111] Oesser, S., et al., *Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL)*. J Nutr, 1999. **129**(10): p. 1891-5.
- [112] Ohara, H., et al., *Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources*. J Agric Food Chem, 2007. **55**(4): p. 1532-5.

