

機関番号：32403

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成20年度～平成22年度

課題番号：20791049

研究課題名（和文）

関節軟骨初期変性モデルマウスの確立およびそのメカニズムの解明

研究課題名（英文）

Construction of early stage animal model of osteoarthritis

研究代表者

中谷 祥恵 (NAKATANI SACHIE)

研究者番号：20453425

研究成果の概要（和文）：リンの過剰摂取は骨密度を低下させることが明らかとなっている。また、低リン食は加齢モデルマウスの関節軟骨変性を抑制することが明らかになっている。本研究では、加齢を再現する関節軟骨初期変性マウスを作製することを目的とした。また、関節軟骨の初期変性メカニズムの一部を明らかにすることを目的とした。

マウスに高リン食を負荷し、経時的に関節軟骨に与える影響を検討した。関節軟骨の評価はパラフィン包埋切片を用いた関節軟骨細胞数および厚さ、コラーゲン分解マーカである血清C2C濃度で評価した。

高リン食を負荷したマウスでは、関節軟骨の厚さが摂取後40日目で通常食群と比較して有意に減少した。血清中C2C濃度は有意な差が見られなかったが、通常食摂取群と比較して高リン食群では増加傾向を示した。以上の結果から、本実験で作製したマウスは高回転型骨粗鬆症を併発する関節軟骨初期変性モデルマウスとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

High dietary phosphorus intake reduces bone strength and caused soft tissue mineralization. A defect in *klotho* gene expression in mice results in articular cartilage degeneration and osteoporosis. Restriction of dietary phosphorus consumption by *klotho* mice arrested the cartilage degeneration and osteoporosis. Therefore, it has been suggested that excessive intake of phosphorus accelerates articular cartilage degeneration due to an imbalance in bone and cartilage metabolism. In a preliminary study, we performed observations each week for four weeks, and a primary disorder of articular cartilage was noted after three weeks on the high-phosphorus diet. Our high-phosphorus diet model is characterized by a primary disorder of articular cartilage due to nutritional imbalance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成21年度	500,000	150,000	650,000
平成22年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目：

キーワード：関節軟骨、老化、変形性関節症

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は、弾力性と圧縮抵抗性に富んだ組織で、荷重分散および摩擦抵抗を減少させる役割を担っている。軟骨下骨は関節軟骨を支持する骨組織で、関節軟骨層を支える構造を有している。

変形性関節症 (OA) は、関節軟骨の変性、磨耗による荒廃と、それに伴う軟骨および骨の新生、増殖による慢性、進行性の変形の関節疾患で、高齢社会を迎えた日本で大きな問題となっている。OA の原因として加齢、遺伝的要因、性別、肥満、メカニカルストレスなどの複合的要因が報告されているが詳細は不明な点が多い。

現在、OA の治療法を確立するための基礎研究に前十字靭帯損傷モデルマウスが広く利用されている。しかし、このモデルマウスは外傷を起因とする OA を再現するマウスであるため、OA の主要因である加齢変性を再現できていない。そこで、加齢による OA を再現するモデルの確立が望まれている。

外傷や疾病時において骨組織と接している関節軟骨細胞は、細胞外 Ca、P および Mg の影響を受ける可能性が考えられる。しかし、内軟骨性骨化の過程における Ca、P および Mg の役割は一部報告されているが、関節軟骨における細胞外 Ca、P および Mg の影響は、ほとんど明らかになっていない。

最近の研究で、細胞外のリンが軟骨細胞の分化および石灰化を促進することが軟骨細胞を用いた実験で明らかになっている。また、Klotho 遺伝子変異マウスは加齢促進の表現型を有し、関節軟骨の減少し、Klotho 遺伝子変異マウスに低リン食を摂取させることによって、関節軟骨の減少を抑制できることが報告されている (Morishita K. et al, J Nutr., 131, 3182-8, (2001))。

これらの報告から申請者は、細胞外のリンが関節軟骨の石灰化を誘導し、関節軟骨の質を低下させる可能性を考えた。また、リンの過剰摂取が老化を促進し、関節軟骨を変性させる可能性を考えた。

また、申請者らは、軟骨細胞の後期分化過程でカルシウムセンシングレセプターを発現し、細胞外の Ca 濃度を感知して軟骨細胞の分化を調節することと、その Ca の働きを Mg が抑制している可能性を報告している (Nakatani S et al, Biochem Biophys Res Commun., 348 (2006))。

この結果は P と同様に骨組織の構成成分である Ca や Mg も軟骨機能に重要な役割を果たしている可能性を示している。

以上の背景から、細胞外 Ca、P および Mg が軟骨細胞の分化および関節軟骨に与える影響を検討し、OA との関連を明らかにするこ

とは、OA の予防法および治療法を確立するための基礎研究として重要である。また、加齢に伴う OA を再現できるモデルマウスの確立は OA の基礎研究として重要である。

2. 研究の目的

変形性関節症の予防法および治療法確立のために、加齢に伴う関節軟骨初期変性モデルの開発が望まれている。本研究では、リンを過剰摂取させることで、加齢に伴う関節軟骨初期変性マウスを確立することを目的とする。

また、Ca、P および Mg が軟骨細胞の分化に与える影響を検討することで、上記リン誘導性関節軟骨初期変性マウスが作製できるメカニズムを明らかにする。また、細胞外の Ca、P および Mg が OA 発症に関与する可能性を検討する。

研究期間内に以下の項目を検討することを目的とした。

- (1) P の過剰摂取による関節軟骨初期変性モデルマウスの確立
- (2) Ca、P および Mg が軟骨細胞の分化に与える影響の検討
- (3) P 誘導性関節軟骨変性のメカニズムの解明
- (4) 関節軟骨維持因子の同定

(1) のモデルを確立するために、リンを過剰摂取させたマウスから経時的に関節軟骨、大腿骨、血清を採取し、関節軟骨の変性過程を明らかにすることを目的とした。

また、(3) の P 誘導性関節軟骨変性のメカニズムを解明するために、軟骨細胞株 ATDC5 を用いて (2) の研究を行うことを目的とした。(1) ~ (3) の研究を行うことで、(4) の関節軟骨維持因子を同定することを目的とした。

本研究は、変形性関節症の発症メカニズムの一部を解明できるとともに、関節軟骨加齢変性の予防研究にも応用できる。

3. 研究の方法

- (1) リンの過剰摂取が関節軟骨に与える影響の検討

P 誘導性関節軟骨変性の経時的変化の検討

10 週齢 C57BL/6J 雄性マウスを通

常食群と高P食群に分け、各々0日、10日、20日、30日間飼育を行った。飼育期間終了後、後肢を摘出し、パラフィン包埋切片を作製した。

関節軟骨の評価はパラフィン包埋切片を用いた関節軟骨細胞数および厚さ、コラーゲン分解マーカである血清C2C濃度で評価した。

また、関節軟骨変性と関連が示唆されている軟骨下骨の骨密度をpQCT法および μ CT法を用いて測定した。

(2) Ca、PおよびMgが軟骨細胞の分化に与える影響の検討

軟骨細胞株ATDC5を用いて実験を行った。ATDC5に、Ca、無機リン(Pi)、Mgを添加し培養した。細胞増殖の指標としてWST-1活性、初期分化の指標としてアルカリフォスファターゼ(ALP)染色、グリコサミノグリカン(GAG)量の局在の指標としてアルシアンブルー(AB)染色、石灰化の指標としてアリザリンレッド(AR)染色、アポトーシスの指標としてTdT-mediated dUDP nick end labeling (TUNEL)法を用いて、各ミネラルがATDC5の増殖および分化に与える影響を検討した。

また、Ca、Pi、Mgの相互作用も上記方法を用いて検討した。

さらにDNAマイクロアレイを用いて、Ca、PおよびMgが軟骨細胞のmRNA発現レベルに与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) リンの過剰摂取は骨密度および関節軟骨層を減少させた

高リン食を負荷したマウスでは、骨密度が通常マウスと比較して10日後に有意に低下した。高リン食摂取40日後の脛骨を用いて骨形態計測を行った結果、骨芽細胞数と破骨細胞数が高リン負荷によって有意に増加していた。

一方、関節軟骨の厚さをパラフィン包埋切片を作製し比較した結果、リン摂取後10日目は通常マウスと比較して変化がなかったが、20日目は関節軟骨層が減少傾向を示し、40日目で通常食群と比較して関節軟骨層と軟骨細胞数が有意に減少した。

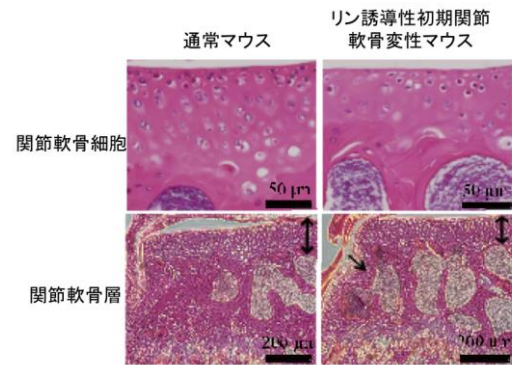


図 高リン食の摂取が関節軟骨に与えた影響

高リン食摂取40日目の血清中C2C濃度を測定した結果、高リン群のC2C濃度は通常食群と比較して有意な差が見られなかったが、高リン食群では増加傾向を示した。

以上の結果から、本実験で作製したマウスは高回転型骨粗鬆症を併発する関節軟骨初期変性モデルマウスとして有用であることが示唆された。

(2) Ca、PおよびMgが軟骨細胞の分化に与えた影響

Ca、PおよびMgがATDC5の細胞増殖に与える影響を検討した結果、8 mM Caの添加および6 mM Piの添加はATDC5の増殖を低下させた。一方、Mgは測定した10 mMまでの濃度ではATDC5の増殖に影響を与えなかった。この結果から、Ca、PおよびMgの相互作用は6 mM Ca、4 mM Pi、10 mM Mgの濃度で検討することとした。

次に、Ca、PおよびMgがATDC5のALP活性に与える影響を検討した結果、6 mM CaはATDC5のALP活性を増加させた。また、Mgは2 mM、4 mM、6 mM、8 mM、10 mMの測定したすべての濃度においてALP活性を促進していた。一方、Piの添加は本実験ではATDC5のALP活性に影響を与えなかった。

AB染色を用いてATDC5のGAG量に与える影響を検討した結果、6 mM CaはATDC5のGAG量を減少させた。一方、4 mM Pi、4 mM MgはATDC5のGAG量を増加させた。

(3) 軟骨細胞株ATDC5におけるCa、PおよびMgの相互作用の検討

Ca+Piの添加は通常培養した

ATDC5 および単独添加と比較して、ATDC5 の細胞増殖と GAG 量の局在を低下させた。

しかし、Ca+Pi にさらに Mg を添加すると、ATDC5 の細胞増殖、GAG 量の減少を抑制し、通常培養で培養した ATDC5 と同程度の結果を示した。

そこで、TUNEL 法を用いて各ミネラルがアポトーシスに与える影響を検討した結果、Ca+Pi はアポトーシスを誘導し、Mg は Ca+Pi によるアポトーシスを抑制した。

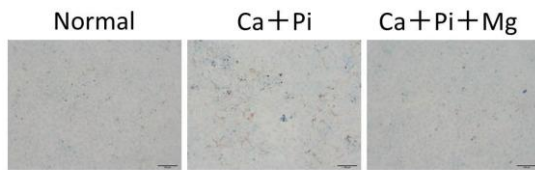
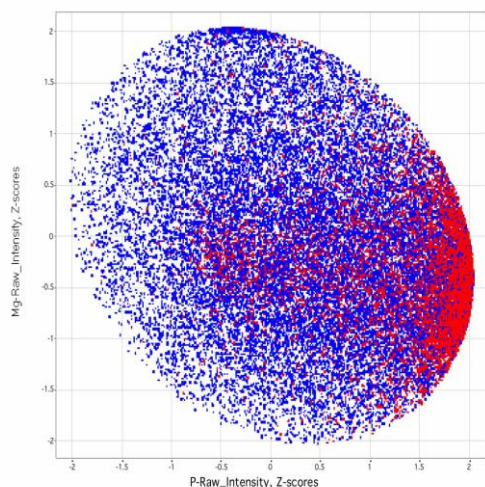


図 Ca、PおよびMgがアポトーシスに与える影響

以上の結果から、軟骨細胞外基質に Ca と P が同時に存在すると、軟骨細胞のアポトーシスを誘導し、軟骨の GAG 量を減少させることを明らかにした。Mg は Ca と P による軟骨細胞の GAG 減少とアポトーシスを抑制することから、軟骨の維持に重要なミネラルである可能性が示唆された。

(4) Ca、P および Mg が軟骨細胞の遺伝子発現に与える影響

DNA マイクロアレイを用いて、Ca、P および Mg が軟骨細胞の遺伝子発現に与える影響を検討した。クラスター解析を行った結果、P と N が同じクラスター、Ca と Mg が同じクラスター



PMg

に分類された。また、P と Mg がトランスクリプトの発現レベルが最も異なっていた。また、P で mRNA 発現レベルが誘導された遺伝子が、Mg で mRNA 発現レベルが抑制されていることが多かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Sachie Nakatani, Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage *in vitro* and *in vivo*. *Osteoarthritis and Cartilage*, (査読有) 17, 1620-7 (2009).

〔学会発表〕(計2件)

Sachie Nakatani, Hiroshi Mano, Jun Shimizu, Kenji Kobata and Masahiro Wada. Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage *in vitro* and *in vivo*. 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月, 神奈川.

片岡綾, 清水純, 中谷祥恵, 杉原富人, 和田政裕, 羽毛田慈之, 真野博., (リユージュリン) の骨代謝改善作用機序. 第29回日本骨代謝学会, 2011年7月, 大阪.

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 祥恵 (NAKATANI SACHIE)

研究者番号 : 20453425

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :