

学位論文題名

力学的負担減少による腱組織リモデリングにおける
オステオポンチンの役割

学位論文内容の要旨

序論：骨や筋肉は力学的ストレスの環境下で人体の動きに対し力学的な支えを提供し、その構造や組成、再構築（リモデリング）は力学的負荷に感受性がある。腱は骨と筋肉を連結する組織であるが、筋肉によって発生する力を骨に伝達し関節の動きやその保護作用に重要な役割を持つ。骨や筋肉が力学的負荷感受性組織であることと同様に、これまで腱に対する力学的負荷減少の効果は腱の力学的強度の低下や腱の構成成分であるコラーゲン線維径を減少することが知られている。しかしながら、力学的負荷による腱組織リモデリング過程における分子生物学的メカニズムは十分に解明されていない。オステオポンチン（以下 OPN : osteopontin）は、元来骨組織中に存在する非コラーゲン性細胞外マトリックス蛋白質として同定されているが、力学的負荷による骨リモデリングの引き金となる重要な因子であることが示されている。OPN は皮膚創傷治癒過程や損傷筋肉再生過程でも関係しており、多彩な機能を有するサイトカイン様の分子である。

筋・骨格系組織の細胞である骨芽細胞、筋芽細胞、皮膚や腱の線維芽細胞は間葉型幹細胞から分化しており、骨・腱・靭帯・筋肉は多能性幹細胞から分化した同一の機能的なユニットであると考えられる。OPN は力学的負荷に関係するサイトカインであり、著者らは腱に対する力学的負荷減少の効果はオステオポンチンの存在によって調節されるという仮説を考えた。本研究の目的は、(1) 正常腱組織におけるオステオポンチンの発現を確認すること、(2) Wild-type (WT) マウスと OPN knockout (KO) マウスの両群で力学的負荷減少後、膝蓋腱の超微細構造変化を形態学的に解析すること、(3) 力学的負荷減少後の膝蓋腱における OPN mRNA の発現変化を調べること、(4) OPN に基づいた腱組織リモデリングのメカニズムを明らかにすることである。

方法と結果：1. 腱線維芽細胞における OPN の発現解析。RT-PCR により正常膝蓋腱からの OPN mRNA の発現を確認し、また OPN は WT マウス正常膝蓋腱の線維芽細胞に局在していることが免疫組織化学染色の結果より明らかになった。2. コラーゲン線維の超微細構造解析。透過型電子顕微鏡による腱の形態学的解析の結果、6 週間除負荷された腱はコントロールと比較しコラーゲン線維径や $1\mu\text{m}^2$ あたりのコラーゲン線維の面積率は有意に減少した。しかし OPN KO マウスではそのような変化はみられず、統計学的にコラーゲン線維径及び面積率の平均変化率は共に、WT マウスは OPN KO マウスと比較し有意に低値を示した。これらの結果より、除負荷による腱リモデリング過程に OPN が関係していることが示唆された。3. 除負荷後の腱組織中における OPN 遺伝子の発現変化の解析。除負荷後の膝蓋腱組織中の OPN mRNA の経時的発現変化を定量的 real-time PCR 解析を行った。OPN mRNA の発現は除負荷後 3 日目に有意に増加し、その後除負荷後 5 日にかけて急激な減少を示し除負荷 6 週目まで抑制された状態であった。免疫組織化学染色によ

る OPN 蛋白質の発現変化も同様の結果であった。4. OPN に基づいた腱組織リモデリングにおけるメカニズムの解析。本実験で示唆された除負荷による腱コラーゲン線維径減少のメカニズムの 1 つとして、コラーゲン産生の変化が関係するかどうか検討した。Real-time PCR 解析結果より、除負荷 3 日目と 14 日目の腱組織はそれぞれ反対側のコントロール腱組織と比較しコラーゲン mRNA の発現に有意な差は無かった。さらに、除負荷された腱組織中における線維芽細胞のアポトーシスの程度を経時的に調べたがアポトーシス陽性細胞の存在は認められなかった。以上より、本モデルによる腱リモデリング過程でコラーゲン産生変化の関与は少ないことが示された。次にコラーゲン分解に関係する MMP-13 mRNA の経時的発現変化について解析を行い、MMP-13 の発現は除負荷後 2 週目に有意な増加を示した。この MMP-13 の発現の増加は OPN の発現が一過性に増加しその後減少する頃に見られるため、同様の腱リモデリング過程において OPN の有無による MMP-13 の発現を比較した。WT マウスでは、MMP-13 の発現は除負荷後 2 週目で平均 21 倍まで増加したが、OPN KO マウスでは平均 4 倍のみの増加であった。さらに腱線維芽細胞における OPN と MMP-13 の直接の関係性を明らかにするために、培養腱細胞を用いた実験を行った。OPN とその受容体の結合を阻害する GRGDS の合成ペプチドや OPN の受容体を阻害する抗 α V インテグリン抗体の添加により MMP-13 mRNA の発現増加がみられ、OPN はインテグリン受容体を介して MMP-13 の発現を調節することが示された。

考察：本研究結果より、OPN 欠損では除負荷による腱組織リモデリング過程において有意なコラーゲン線維の形態学的変化はなく、OPN は除負荷による腱リモデリング過程に重要な役割を果たす分子であることが示唆された。また、同リモデリング過程において OPN mRNA 発現増加は除負荷後 3 日目までに起こり、この結果は骨リモデリング過程や損傷筋肉再生過程における OPN の早期発現増加を示す過去の報告と一致する。筋・骨格系軟部組織リモデリングにおいては、細胞外マトリックス蛋白質の合成と分解の微妙な調節を行う。そのリモデリング過程を行う主要な因子は、コラーゲン合成に関してはタイプ I コラーゲンであり、分解に関してはコラゲナーゼである。コラーゲン合成に関しては、本研究結果より除負荷による腱組織リモデリング過程にコラーゲン産生抑制やアポトーシスの関与はみられなかった。コラーゲン分解に関しては、本研究モデルにおいてはマウスにおける有力な組織コラゲナーゼである MMP-13 の遺伝子発現変化の解析を行った。その結果、力学的負荷減少による腱リモデリング過程において MMP-13 の有意な発現変化に先行して OPN の発現変化が起きていることが示され、OPN 欠損ではこの MMP-13 の有意な発現変化が抑制された。これらの結果は OPN が腱線維芽細胞の力学負荷を感知するトランスデューサーとして機能している可能性が示され、さらに同リモデリング過程で OPN が MMP-13 を調節していることを示した。また、培養腱線維芽細胞による OPN と MMP-13 の関係を示す実験から、OPN は RGD を介し α V integrin に接着することにより腱細胞からの MMP-13 遺伝子発現を調節していることが示唆された。

以上より OPN は力学的負荷減少により一過性に発現変化が起き、その発現変化から MMP-13 の発現が誘導され腱組織リモデリング過程の形態学的改変に関与することが示唆された。今後、OPN の局所発現を操作したり、OPN とその受容体の相互作用を制御したりすることにより、筋・骨格系軟部組織のリモデリング過程をコントロールできる可能性があり、病的な組織リモデリング過程を含めてさまざまな筋・骨格系軟部組織疾患に対する新しい治療戦略に有効であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 山 本 有 平

学 位 論 文 題 名

力学的負担減少による腱組織リモデリングにおける オステオポンチンの役割

骨や筋肉が力学的負荷感受性組織であることと同様に、これまで腱に対する力学的負荷減少の効果は腱の力学的強度の低下や腱の構成成分であるコラーゲン線維径を減少することが知られている。しかしながら、力学的負荷による腱組織リモデリング過程における分子レベルのメカニズムは十分に解明されていない。オステオポンチン（以下 OPN: osteopontin）は、元来骨組織中に存在する非コラーゲン性細胞外マトリックス蛋白質として同定されているが、力学的負荷による骨リモデリングの引き金となる重要な因子であることが示されている。筋・骨格系組織の細胞である骨芽細胞、筋芽細胞、皮膚や腱の線維芽細胞は間葉型幹細胞から分化しており、骨・腱・靭帯・筋肉は多能性幹細胞から分化した同一の機能的なユニットであると考えられる。これらの理論的背景と分子レベルにおける OPN の役割から、学位申請者は腱に対する力学的負荷減少の効果は骨同様に OPN の存在によって調節されるという仮説を考えた。本研究目的は力学的負荷減少による腱組織リモデリング過程におけるオステオポンチンの役割を解析することである。

結果は、まず腱組織に OPN 発現と OPN 蛋白の局在を確証した。次に除神経によるマウス膝蓋腱除負荷モデルを作成し、このモデルによる腱組織リモデリング過程 6 週における超微細構造解析において、WT マウスはコラーゲン線維径が統計学的に有意に減少したのに対し、OPN KO マウスではコラーゲン線維径の変化がなかった。これらの結果は、OPN は除負荷による腱組織リモデリング過程に重要な役割を果たす分子であることを示唆した。また、WT マウスにおいて同リモデリング過程では OPN 遺伝子発現増加は除負荷後 3 日目までに認められ、さらに組織コラゲナーゼである MMP-13 の遺伝子発現増加が除負荷後 2 週目に認められた。OPN の遺伝子発現変化が MMP-13 の有意な発現変化に先行して起きていることから、OPN 欠損マウスにおいて同様な実験を行ったところ、WT マウ

スで観察された除負荷2週目のMMP-13の有意な発現増加はOPN欠損では抑制されていることが明らかになった。さらに培養腱線維芽細胞によるOPNとMMP-13の直接の関係を示す実験では、OPNはRGDを介し αv integrinに接着することにより腱細胞からのMMP-13遺伝子発現を調節していることも示唆された。

以上より、OPNは力学的負荷減少により一過性の発現増強が起き、その一過性刺激からMMP-13の発現増強が起こり腱組織リモデリング過程の形態学的改変に関与することが示唆された。

審査にあたり、山本有平教授から、(1) 除負荷によるOPNとMMP-13遺伝子の経時的発現変化に関して両者のピークにタイムラグが起きている理由について、(2) OPNのオートクライン、パラクラインによる機序による差が*in vitro*と*in vivo*の結果の違いに影響しているかどうかについて、三浪明男教授から(3) ワイヤで腱の周囲を締結し固定する完全な除負荷モデルと本研究モデルである除神経による除負荷モデルとの違いについて、(4) 骨代謝に関係しているBMPとOPNの関連性について、(5) 本研究結果から治療薬への発展性について、上出利光教授から(6) MMP切断OPN、トロンビン切断OPNでは αv インテグリン以外の受容体に相互作用することによる影響について、(7) 本研究の実験動物であるマウスのようなclearな実験系ではなくヒトのような複雑な場合の影響について、(8) *in vivo*のように*in vitro*においても力学的負荷刺激による細胞培養実験は可能であるかについて、以上これら(1)～(8)の質問に対して学位申請者は今回行った実験結果と過去の文献を引用し、適切に回答した。

この論文は、力学的負荷減少による腱組織リモデリング過程にオステオポンチンが関係することを*in vivo*及び*in vitro*で証明したことは高く評価され、今後腱組織の研究発展や腱劣化予防剤の開発に大いに期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。