

# 学位論文の要旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 臨床医学系講座 運動器外科学・腫瘍集学治療学分野	氏 名	はっとり 徹也
<p>主論文の題名</p> <p>TNIIIA2, The Peptide of Tenascin-C, as a Candidate for Preventing Articular Cartilage Degeneration</p> <p>主論文の要旨</p> <p>【目的】</p> <p>TNIIIA2は細胞外マトリックスの糖タンパクであるテネイシンC (Tenascin-C:TN-C) に含まれるペプチドである。TN-Cは複数のドメインから成り、それぞれのドメインが様々な作用を持つことが知られている。軟骨欠損モデルマウスへのTN-C関節内投与による軟骨修復促進効果や、変形性膝関節症モデルマウスへのTN-C関節内投与による軟骨変性抑制効果が報告されている一方、TN-Cのドメインであるfibrinogen-like globe (FBG) ドメインはマウスにおいて関節炎を誘発することが報告された。TNIIIA2は細胞の分化・増殖を促進することが報告されており、TN-Cの軟骨変性抑制効果はTNIIIA2を含む機能部位が担っている可能性を考えた。変形性膝関節症モデルマウスへの関節内投与による軟骨変性抑制効果に加えて、軟骨細胞への添加による細胞増殖への影響と各種因子の発現促進、およびヒト関節軟骨におけるTNIIIA2を含む機能部位の発現を評価した。</p> <p>【方法】</p> <p>1) マウス関節内にTNIIIA2の投与を行い、滑膜炎の発生をコントロール群と比較し評価した。組織学的評価はHE染色を行い、synovitis scoreを用いて評価した。2) 前十字靭帯および内側側副靭帯を切離した変形性膝関節症モデルマウスの関節内にTNIIIA2を投与し、投与後2週間から12週間までの軟骨変性をコントロール群と比較し評価した。組織学的評価はHematoxylin Eosin(HE)染色、サフラニンO染色を行い、Mankin scoreを用いて評価した。3) ヒト関節軟骨から単離した軟骨細胞を用いて細胞増殖アッセイを行った。軟骨細胞にTNIIIA2を添加し、コントロール群と比較し細胞増殖を評価した。4) ヒト関節軟骨から単離・単層培養した軟骨細胞にTNIIIA2を添加し、real-time polymerase chain reaction(PCR)を用いて炎症性サイトカイン、軟骨細胞におけるanabolic factor、catabolic factorの遺伝子発現量を測定し、非添加群と比較した。5) ヒト軟骨におけるTNIIIA2の発現を評価した。変形性膝関節症のヒト変性関節軟骨組織および正常軟骨組織に抗TN-C抗体および抗TNIIIA2抗体による染色を行い、HE染色およびサフラニンO染色と比較し軟骨組織における局在性を評価した。</p>			

## 【結果】

1) マウス膝関節内へのTNIII A2の投与では、投与後2週において軽度滑膜炎の発生を認めたが、投与後4週では改善していた。コントロール群でも同様の変化を認めた。Synovitis scoreでも両群に有意差は認められなかった。すなわち、TNIII A2の関節内投与においては有意な関節炎の誘発は認められなかった。2) 変形性膝関節症モデルマウスに対してTNIII A2の関節内投与を行った。投与後4週・8週においてコントロール群と比較し、投与群で軟骨変性の進行が抑制された。Mankin scoreはTNIII A2投与群において有意に低値であり（投与後4週:p=0.04、8週:p=0.03）、TNIII A2投与により有意に変性が抑制されたと考えられた。投与後12週においては両群に差は認められなかった。3) 軟骨細胞に対してTNIII A2の添加を行ったところコントロール群と比較して、投与後6日目において有意に細胞増殖が促進された（p=0.005）。軟骨細胞に対してTNIII A2の添加を行うことで軟骨細胞の増殖を促進することが分かった。4) 軟骨細胞へTNIII A2を添加し、real-time PCRを行ったところ炎症性サイトカインであるtumor necrosis factor- $\alpha$ 、軟骨細胞のanabolic factorであるbasic fibroblast growth factor（bFGF）、catabolic factorであるmatrix metalloproteinase（MMP）3の遺伝子発現量がコントロール群と比較し有意に多かった。TNIII A2が炎症性サイトカイン、anabolic factor、catabolic factorの発現を促すことが分かった。5) ヒト変性関節軟骨に抗TN-C抗体および抗TNIII A2抗体による染色を行うと、軟骨変性を認める軟骨表面に染色性を認めた。TNIII A2を含む部位はTN-Cでは常時発現している部位ではないため、変性の条件下ではTN-CおよびTNIII A2を含む部位は同様の発現をしている可能性があると考えられた。

## 【考察】

TNIII A2はTN-CのドメインであるFNIIIに含まれ、MMP2の存在下で発現し、 $\beta$ 1インテグリンの活性化を調節することが報告されている。また、 $\beta$ 1インテグリンは軟骨細胞増殖を促進させ、FGFによる軟骨細胞増殖にも関与していることが報告されている。本研究ではTNIII A2はbFGFの発現を促進させること、および軟骨細胞増殖を促進させることからTNIII A2による $\beta$ 1インテグリンの活性化が軟骨細胞増殖を促進させている可能性が考えられた。またマウス関節内注射により滑膜炎を誘発させることなく、軟骨変性を抑制させた。TN-Cは成人正常軟骨には発現を認めず変性軟骨に発現を認めることが報告されているが、TNIII A2も同様の発現様式を持つ可能性が示唆された。軟骨変性部位はリモデリングが生じている部位であり、TN-Cの持つ軟骨リモデリングへの効果はTNIII A2を含む機能部位が担っている可能性が考えられた。

本研究ではTNIII A2は滑膜炎を誘発せず、8週間において軟骨変性を抑制することが分かった。TN-Cの軟骨変性抑制効果はTNIII A2を含む機能部位が担っている可能性が示唆された。