

膝靭帯組織の再生時におけるエラスチンの作用に関する研究

Study of the Effect of Elastin during Knee Ligament Regeneration

○ 晝河政希 (三重大) 片山真悟 (三重大) 佐藤辰哉 (三重大) 三浦良浩 (三重大)
海野宏至 (三重大) 鈴木慶亮 (三重大) 白土絵理 (林兼産業) 長谷川正裕 (三重大)
宮本啓一 (三重大) 堀内孝 (三重大)

Masaki HIRUKAWA, Mie University, Shingo KATAYAMA, Mie University, Tatsuya SATO, Mie University,
Yoshihiro MIURA, Mie University, Hironori UNNO, Mie University, Yoshiaki SUZUKI, Mie University,
Eri SHIRATSUCHI, Hayashikane Sangyo Co.,Ltd., Masahiro HASEGAWA, Mie University,
Keiichi MIYAMOTO, Mie University, Takashi HORIUCHI, Mie University

Abstract: When ligament was injured, reconstructive surgery is carried out. The method is transplant of the artificial ligament or autotransplantation of the tendon. However, these methods have some problems about strength of bone-ligament insertion part or the biocompatibility after the surgery. We focused on "Elastin" which is a major component of the elastic fiber and ligament. In this study, we prepared the rabbit model that the knee ligament ruptured and investigated the effect of elastin during knee ligament regeneration. As a result, it showed that the gene and protein expression of collagen and elastin is increased by elastin dosage. In addition, coefficients of elasticity increased in comparison with control. We also investigated the interaction between elastin and elastin binding proteins. The result showed some proteins interact with elastin. These data suggested that elastin was effective for the regeneration of injured ligament and may clear the elastin recognition mechanism.

Key Words: Elastin, Elastin binding protein, Ligament, MALDI-TOFMS

1. 緒言

サッカーなどのスポーツ活動時や、加齢、肥満によって靭帯組織に過剰な負荷が加わることによって靭帯損傷が引き起こされる。損傷が激しい場合には靭帯の断裂につながり、適切な治療を施さなければ変形性関節症などの合併症を引き起こす可能性がある。特に、前十字靭帯などの関節内靭帯は血管が乏しい環境下に存在するため、損傷した際の自然治癒は望めない。さらに損傷した状態で長期間放置すると断裂した靭帯が退縮するという報告もある⁽¹⁾。我々の前研究より、*in vitro*において靭帯基質の1つであるエラスチンを培養靭帯細胞へ添加することで、I型およびIII型コラーゲン、エラスチンといった基質に加え、靭帯マーカーであるテノモジュリンの産生が促進されることが明らかとなった。また、水溶性エラスチンを性質ごとに分画して得られたアイソタイプ型エラスチンを添加した際には靭帯細胞の骨分化を促すこともわかった⁽²⁾。そこで本研究では、エラスチンの靭帯組織への作用およびその認識メカニズムに関する研究を行った。

2. 方法

2-1 膝靭帯損傷モデルの作製

ジャパニーズホワイトラビット(12週齢, メス)の内側副靭帯(MCL)を鈍的に損傷させ、1週間ごとに注射による局所投与を行い、術後6週間、12週間でMCLサンプルを採取した。実験群としてコントロール(生理食塩水)群, アイソタイプ型エラスチン(エラスチンA)群を作製した。また、非手術群も作製した。(各群5羽以上)

2-2 遺伝子発現解析

採取したMCLサンプルを断裂部, 末端部(骨接合部)に切り分け、遺伝子発現解析を行った。結果は正常群の値を1とした相対発現量として算出した。

2-3 組織学的評価

採取したMCLサンプルを断裂部, 末端部(骨接合部)に切り分け、凍結切片を作製し、免疫蛍光染色を行った後、画像解析ソフトImageJを用いて蛍光強度を解析した。

2-4 組織の力学特性

MCLサンプルを大腿骨, 脛骨とともに採取し、MCL以外の組織を取り除き、靭帯部の厚さ, 自然長, 幅, 骨接合部面積, 全長を測定した。また、膝関節を応力歪測定装置に固定し、弾性率測定および破断強度測定を行った。

2-5 エラスチン結合タンパク質の同定

培養ウサギ靭帯細胞からタンパク質を抽出し、この抽出サンプルを不溶性エラスチンを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、エラスチン結合タンパク質を単離した。得られたエラスチン結合タンパク質をSDS-PAGEにて分子量分画を行った後に、Western blotting, MALDI-TOFMSを用いて同定した。同定時のデータベースにはNCBIを用いた。

3. 結果

3-1 エラスチン投与による遺伝子発現変化

術後6週においてMCL断裂部では、コントロールに比べアイソタイプ型エラスチン投与により、I型コラーゲンは6倍、エラスチンは42倍の遺伝子発現を示し、有意に発現が増加した(Fig.1)。MCL末端部においては、骨基質であるI型コラーゲンや骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼの発現も増加することが分かった。

3-2 MCL 組織染色

免疫蛍光染色の結果、術後6週において、アイソタイプ型エラスチン投与によりMCL断裂部でI型コラーゲンやエラスチン等の発現増加が示された。画像の蛍光強度解析より、コントロールと比較してI型コラーゲンは1.4倍、

エラスチンは 1.9 倍増加した (Fig.2).

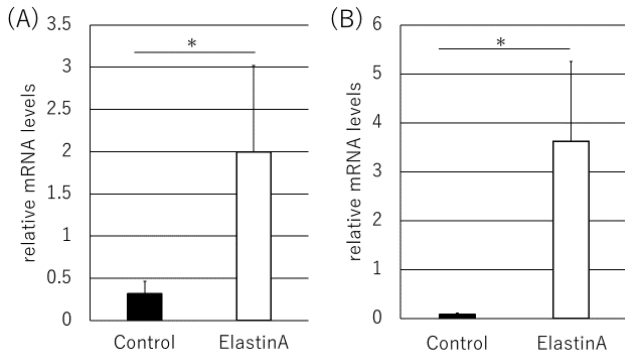


Fig.1 Relative gene expression of (A) Collagen type I, and (B) Elastin. (6week, ruptured region, *: $p < 0.05$)

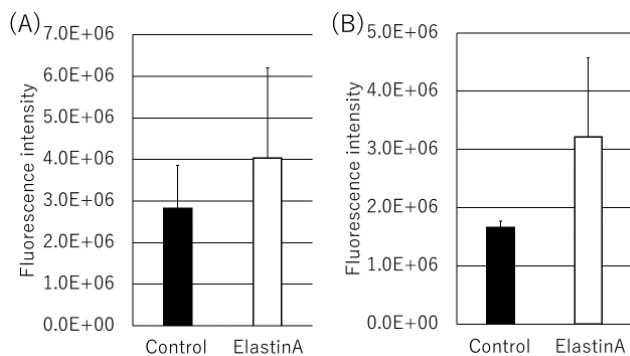


Fig.2 Fluorescence intensity of (A) Collagen type I, and (B) Elastin. (6week, ruptured region)

3-3 MCL 組織強度

MCL の弾性率を測定した結果、アイソタイプ型エラスチン投与により、コントロール群と比較しておよそ 2 倍の値を示し、有意に上昇していることが確認できた (Fig.3).

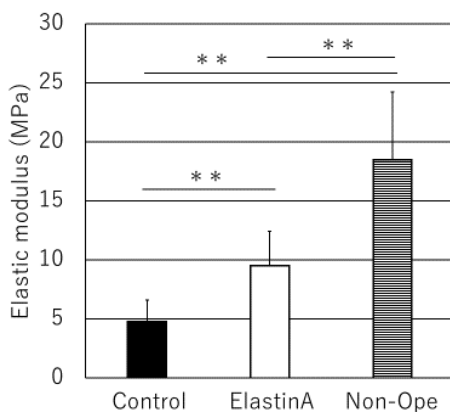


Fig.3 Elastic modulus (6week, **: $p < 0.01$)

3-2 靱帯細胞のエラスチン認識

不溶性エラスチンアフィニティークロマトグラフィにより得られたサンプルを MALDI-TOFMS により解析した結果、NCBI データベース上の複数のタンパク質と高い配列一致率 (%Cov) が示された (Table.1).

Table.1 Identified elastin binding proteins

%Cov	Name
33.88	Galectin-3
34.26	Cyclophilin B
7.602	Antimicrobial protein CAP18

4. 考察

4-1 エラスチン投与による遺伝子・タンパク発現への作用

遺伝子発現解析によって得られた結果より、アイソタイプ型エラスチンの局所投与により靱帯基質である I 型コラーゲンとエラスチンの遺伝子発現が有意に上昇することが示された。染色結果からも、エラスチン投与によりタンパク量の増加が示唆された。遺伝子およびタンパク発現が同じ発現傾向を示しており、投与されたエラスチンに靱帯細胞が応答し、基質産生が促されたと考えられる。

4-2 エラスチン投与による組織強度への作用

アイソタイプ型エラスチンを局所投与することによって、コントロールと比較し有意に弾性率が上昇した。投与されたエラスチンが基質産生を促し、損傷靱帯の組織再生を助けたと考えられる。しかし、非手術群ほどの弾性率を示していないため、6 週間では組織再生がまだ不完全であることが示唆された。

4-3 細胞によるエラスチン認識

MALDI-TOFMS の結果より、複数のタンパクがデータベース検索により該当した。このうち Galectin-3 はエラスチンを認識することが既に示されている⁽³⁾。また、Cyclophilin-B はイムノフィリンファミリーに属するタンパクであり、同ファミリーに属する別のタンパクがエラスチン結合タンパクとして示されている。これらのことから、エラスチン投与試験において今回同定されたエラスチン結合タンパクがエラスチンを認識、応答したことが示唆された。

5. 結論

本研究によって、エラスチンの生体内における損傷靱帯に対する作用が明らかとなり、エラスチンの投与は断裂した靱帯組織に対し、再生を促進するように働くため、治療法の 1 つとして有用であることが示唆された。

また、エラスチン結合タンパク質の同定によって複数のタンパク質が認識に関わることが示された。今後、これらのタンパク質とエラスチンとの相互作用に関して検討を進めることで、より詳細な修復過程の理解および新規のエラスチン認識メカニズムの解明が期待できる。

参考文献

- (1) Attia E, et al, Patterns of gene expression in a rabbit partial anterior cruciate ligament transection model: The potential role of mechanical forces. *Am J Sports Med.* 38:348, 2010
- (2) N. Mizutani, et al, The behavior of ligament cells cultured on elastin and collagen scaffolds. *J Artif Organs.* 17:50-59, 2014
- (3) Poczta P, et al, Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *Int J Cancer.* 122:1972-1980, 2008