慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice
Sub Title	MMP-13遺伝子欠損マウスでは骨折治癒が障害されている
Author	小﨑, 直人
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.3 (2007. 9) ,p.10-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070901-0010

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice

(MMP-13遺伝子欠損マウスでは骨折治癒が障害されている)

小　崎　直　人

内容の要旨

骨折治癒過程では、炎症の惹起により軟骨性仮骨が形成され、さらに血管侵入に伴い骨に置換されるという組織反応が時間的、空間的制御を受けながら進行する。Matrix metalloproteinase（MMP）は細胞外基質の分解や生理活性物質の遊離活性化などに深く関わっている。特にMMP-13はマウスの主要なコラゲナーゼで肥大軟骨細胞、骨芽細胞に発現しており、その遺伝子欠損マウスは軟骨内骨化の遅延をきたすことが知られている。本研究は骨折治癒過程におけるMMP-13の役割を明らかにする目的で、MMP-13遺伝子欠損マウス（MMP-13KO）を用いて骨折モデルを作成し、解析を行った。

実験では、8週齢のMMP-13KOおよび同胞野生型マウス（WT）の脛骨中央に横骨折を加え、髄内釘で固定して骨折モデルを作成した。経時的にX線およびCT撮影を行い、骨密度測定装置による解析も行った。WTでは術後1週から仮骨の形成が認められ、3週で全例が骨癒合していた。一方、MMP-13KOでは術後3週においても仮骨内に未骨化成分が存在し、骨折部の骨塩量もWTと比べて明らかに低下していた。組織計測的解析では、MMP-13KOでは術後2－3週において仮骨に占める軟骨性仮骨の割合がWTより有意に増大しており、骨性仮骨の割合は有意に減少していた。これらの差は術後4週までにほぼ消失した。免疫組織化学的解析では、WTでは軟骨性仮骨の周囲においてCD31陽性の血管内皮細胞が積極的に軟骨基質に侵入しており、またカテプシンK/TRAP陽性の破軟骨細胞が軟骨基質に直接接着する像が観察されたが、MMP-13KOでは両者とも著明に障害されていた。

さらにこの原因を究明するため、MMP-13KOおよびWTから初代骨芽細胞（POB）および初代軟骨細胞（PC）を採取して培養を行い、増殖および分化能を解析した。POBの増殖および分化能とPCの増殖能はMMP-13KOとWTに差を認めなかった。PCをアテロコラーゲンゲルに包埋してペレット培養を行うと、MMP-13KO由来のペレットでは一過性のゲル収縮の遅延と基質産生の低下を認めた。さらに培養3週後の成熟したPCペレットをヒト由来血管内皮細胞（HUVEC）とコラーゲンゲルの中で共存培養すると、WT由来のPCペレットの周囲では旺盛な血管新生が認められたが、MMP-13KOでは著明に抑制されていた。

以上の結果より、MMP-13KOでは、1）骨折治癒の遅延，2）軟骨性仮骨の吸収不全と血管および破軟骨細胞の侵入障害，3）軟骨由来の血管新生誘導能の低下が認められた。このことから、骨折治癒過程における軟骨性仮骨への血管侵入には、その前段階として軟骨細胞自身が産生するMMP-13による軟骨基質の分解が重要な役割を担っていることが考えられた。

論文審査の要旨

骨組織は優れた再生能力を有し、骨折治癒過程では骨発生に類似した分子細胞機序でその形態と機能を回復する。MMP-13は骨芽細胞と肥大軟骨細胞に発現してI型及びII型コラーゲンに対する強い分解活性をもち、その遺伝子欠損マウス（MMP-13KO）では肥大軟骨細胞層の延長を来たす。本研究では骨再生における本酵素の役割を解明する目的で、MMP-13KOの骨折治癒過程を解析した。MMP-13KOおよび同胞野生型マウス（WT）の脛骨骨幹部を骨切りし、髄内釘で固定して骨折モデルを作成した。X線・CT所見では、術後3週でWTは仮骨の骨化を終了していたが、MMP-13KOは仮骨内に未骨化成分を残存していた。組織学的にも、MMP-13KOでは術後2－3週で仮骨に占める軟骨成分の割合が増大していた。免疫組織化学的所見にて、MMP-13KOでは軟骨に対する破軟骨細胞と血管内皮細胞の侵入が障害されている像を認めた。初代培養系では、コラーゲンゲルを用いた軟骨ペレット培養においてMMP-13KO由来の軟骨ペレットは一過性にゲルの収縮遅延と基質産生の低下を来たし、更にヒト血管内皮細胞と共存培養すると著明な血管新生誘導能の低下を認めた。これらの結果から、骨折治癒過程において軟骨細胞が産生するMMP-13は、軟骨基質を分解して血管侵入に関与する生理活性分子を遊離活性化することで軟骨性仮骨の吸収を促進し、骨折治癒を加速することが示唆された。

審査では、まず他のMMPによる代償作用について質問がなされた。破軟骨細胞に発現するMMP-9は、肥大軟骨細胞に発現するMMP-13とは骨軟骨境界において相対する発現パターンを有しているが、MMP-13KOとMMP-9KOの骨表現型は近似しており、またMMP-13KOの仮骨においてMMP-9の発現が亢進していることから代償作用が働いている可能性があると回答された。次に、軟骨性仮骨に対する破軟骨細胞の侵入像について質問がなされた。WTでは破軟骨細胞は軟骨基質に直接面していたが、MMP-13KOでは両者の間に一層の基質が介在しており、この基質について更に解析が必要であると回答された。また、軟骨ペレットのゲル収縮機構について質問がなされた。MMP-13の蛋白分解作用がゲル収縮を促進していると考えられるが、インテグリンなどを介する細胞基質間相互作用も関与している可能性があると回答された。更に、軟骨ペレットの血管新生誘導能に関する機序について質問がなされた。軟骨から分泌されるVEGFなどの血管新生促進因子が関与している可能性があるが、軟骨ペレット培養上清中のVEGF濃度はWTとMMP-13KOで差を認めなかったため、蛋白電気泳動やバイオアッセイによる解析が今後の課題であると回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、軟骨由来のMMP-13が軟骨性仮骨への血管侵入を促進し、骨折治癒に重要な働きを担うことを示唆した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者　主査　整形外科学　戸山　芳昭
病理学　坂元　亨宇　リハビリテーション医学　里宇　明元
発生・分化生物学　須田　年生
学力確認担当者：池田　康夫
審査委員長：坂元　亨宇

試問日：平成19年4月5日