

論 文 内 容 要 旨

題目 Osteoactivin attenuates skeletal muscle fibrosis after distraction osteogenesis by promoting extracellular matrix degradation/remodeling
(オステオアクチピンは、骨格筋における細胞外マトリクスの分解・リモデリングを亢進させることにより、骨延長術に伴う骨格筋線維化を軽減させる)

著者 Ichiro Tonogai, Mitsuhiro Takahashi, Kiminori Yukata, Ryosuke Sato, Takeshi Nikawa, Natsuo Yasui and Koichi Sairyo
平成 27 年発行 Journal of Pediatric Orthopaedics B に掲載予定

内容要旨

骨延長術は四肢短縮・変形などの治療として用いられている。一方で、それに伴い骨格筋も延長され、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリクスの増加、つまり骨格筋の線維化が生じる。骨格筋が線維化に陥ると、筋緊張が増加し、骨格筋の柔軟性が失われ、しばしば日常生活動作に支障をきたす。オステオアクチピンは 1 型の糖膜蛋白で、活性化すると遊走線維芽細胞での matrix metalloprotease (MMP)-3、MMP-9 の遺伝子発現・蛋白産生を介して、骨格筋線維化を軽減させる可能性が示唆されている。

本研究では、マウスの下腿骨延長モデルを用いて、オステオアクチピンが骨延長術時の骨格筋に与える効果を検討した。8 週齢のオステオアクチピンを過剰発現させた遺伝子改変型マウス、野生型マウスの脛骨に創外固定を装着、骨切り術を施行した。術後 1 週より 0.42 mm/日にて 2 週間骨延長を行った。術後 0、2、4、6、8 週の各時点において、足関節角度 90 度で腓腹筋へ経皮的電気刺激を加え、筋収縮能を反映する足関節底屈自動トルク、筋緊張を反映する足関節底屈受動トルクを測定した。また、各時点において腓腹筋を採取し、筋湿重量を測定した。組織切片を作成し、マッソン・トリクローム染色にて筋線維横断面積の測定ならびに骨格筋線維化の組織学的評価を行った。骨格筋線維化の定量的評価のために、濃塩酸によって加水分解した腓腹筋をクロラミン-T で中性化し、発色させて吸光度を測定し、コラーゲンの主要アミノ酸である hydroxyproline (Hyp) の骨格筋内含有量を測定した。細胞外マトリクスのリモデリングの指標として MMP-3、MMP-9 の遺伝子発現を Real-time PCR にて、蛋白産生を western blotting にて解析した。さらに免疫染色にてその局在を評価した。

筋湿重量、筋線維横断面積、足関節底屈自動トルクは、野生型群、遺伝子改変型群とも術後 2、4 週で減少し、術後 6、8 週で漸増した。両群間に有意差は

様式(8)

なかった。足関節底屈受動トルクは、両群とも術後2、4週で増加した。術後6、8週で減少したが、遺伝子改変型群では術後8週で有意に減少していた ($p < 0.05$)。骨格筋線維化は、組織学的に両群とも術後2、4週で高度であった。術後6、8週で減少したが、遺伝子改変型群では術後8週でより減少していた。骨格筋内 Hyp 含有量は、両群とも術後2、4週で増加した。術後6、8週で減少したが、遺伝子改変型群では術後8週で有意に減少していた ($p < 0.05$)。MMP-3、MMP-9 の遺伝子発現は、遺伝子改変型群では術後2、4週で有意に増加していた ($p < 0.05$)。MMP-3、MMP-9 の蛋白産生は、遺伝子改変型群では術後2、4、6週で増加していた。また MMP-3、MMP-9 の免疫染色では、遺伝子改変型群において術後2、4、6週で細胞外マトリクス内における MMP-3、MMP-9 の存在が確認された。

本研究では、骨延長術により活性化されたオステオアクチビンが、骨格筋における MMP-3、MMP-9 の遺伝子発現・蛋白産生を促すことにより、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリクスのリモデリングを亢進させており、それに伴い骨延長術後の骨格筋線維化が軽減し、増加した筋緊張が軽減し、骨格筋に柔軟性をもたらしていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1239 号	氏名	殿谷 一郎
審査委員	主査 勢井 宏義 副査 加藤 真介 副査 橋本 一郎		

題目 Osteoactivin attenuates skeletal muscle fibrosis after distraction osteogenesis by promoting extracellular matrix degradation/remodeling

(オステオアクチピンは、骨格筋における細胞外マトリクスの分解・リモデリングを亢進させることにより、骨延長術に伴う骨格筋線維化を軽減させる)

著者 Ichiro Tonogai, Mitsuhiro Takahashi, Kiminori Yukata, Ryosuke Sato, Takeshi Nikawa, Natsuo Yasui and Koichi Sairyo

平成 27 年発行 Journal of Pediatric Orthopaedics B に掲載予定
(主任教授 西良 浩一)

要旨 骨延長術は四肢短縮・変形などの治療として用いられる。しかし、それに伴う骨格筋の延長により、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリクスの増加、つまり骨格筋の線維化が生じる。その結果、筋緊張の増加、および骨格筋柔軟性の低下が発生し、日常生活動作に支障をきたす。申請者は骨延長術後の骨格筋線維化ならびに筋緊張を軽減させる蛋白としてオステオアクチピンに注目した。オステオアクチピンは 1 型の糖膜蛋白で、骨格筋において遊走線維芽細胞での matrix metalloprotease (MMP) -3、MMP-9 の遺伝子発現・蛋白産生を促進することが報告されている。本研究では、オステオアクチピンを過剰発現させた遺伝子改変マウスを用いて、下腿骨延長に伴う腓腹筋の変化を観察することで、オステオ

アクチビンが骨延長術時の骨格筋に与える効果について検討した。得られた結果は以下の通りである。

1. 筋湿重量、筋線維横断面積、筋収縮能を反映する足関節底屈自動トルクは、野生型群、遺伝子改変群ともに術後 2、4 週で減少し、術後 6、8 週で漸増した。両群間に有意差はなかった。
2. 筋緊張を反映する足関節底屈受動トルクは、両群ともに術後 2、4 週で増加した。術後 6、8 週で減少したが、遺伝子改変群において術後 8 週で野生型群より有意に減少していた。
3. 筋線維化は、両群ともに術後 2、4 週で増加した。術後 6、8 週で減少したが、遺伝子改変群において術後 8 週で野生型群より有意に減少していた。
4. MMP-3、MMP-9 の遺伝子発現は、遺伝子改変群において術後 2、4 週で野生型群より有意に増加していた。MMP-3、MMP-9 の蛋白産生は、遺伝子改変群において術後 2、4、6 週で野生型群より増加していた。

以上の結果から、骨延長術後の骨格筋においてオステオアクチビンがコラーゲンをはじめとする細胞外マトリクスのリモデリングを亢進させることにより、骨格筋線維化の軽減と筋緊張の軽減をもたらし、骨格筋の機能劣化を改善することが示された。本研究は、骨延長術の合併症である骨格筋線維化に対する新たな治療法の可能性を提示しており、その医学的意義は大きく学位授与に値するものと判定した。