

学位論文

Cartilage Matrix Protein (CMP)の機能解明
－細胞接着・伸展の促進、II型コラーゲン
との相乗作用およびインテグリンとの結合－

学位申請者 牧平清超

広島大学歯学部歯科補綴学第二講座
(主任：濱田泰三教授)

1998年

目次

緒言	1
材料と方法	
I. 材料	3
II. 方法	
1. ウシ CMP の精製	3
2. 抗ウシ CMP 抗血清	4
3. 抗ウシ CMP 抗体の精製	4
4. 細胞培養	4
5. 培養細胞の継代	5
6. CMP とコラーゲンのコーティング	5
7. 細胞接着と伸展率	5
8. 抗インテグリンモノクローナル抗体による抑制実験	6
9. ビオチンによる細胞膜表面のタンパクラベル	6
10. インテグリン抗体による免疫沈降	7
11. ^{125}I による CMP ラベル	7
12. ^{125}I -CMP とインテグリンとの結合	8
結果	
CMP の細胞接着、伸展促進作用	9
細胞伸展に対する CMP とコラーゲンの相乗作用	10
CMP とインテグリンの結合	10
考察	13
結論	18
謝辞	19
参考文献	21

緒 言

近年インプラントなどの生体材料の利用や GBR 法による骨再生誘導が、歯科臨床で広く行われている。骨再生には膜性骨化以外に内軟骨性骨化の過程を経ることがあるため、軟骨の研究は歯科臨床にとってもその基礎として重要である。また、軟骨は他の組織よりも大量の細胞外基質を含有するためコラーゲンや細胞接着因子の生理的役割を追求するための実験系として有用である。

コラーゲン線維は、軟骨細胞に負荷する機械的圧力を伝播し、軟骨細胞の接着、伸展、増殖、分化の足場となる¹⁾。軟骨細胞に対するコラーゲンの生理的作用の一部は、コラーゲン線維に結合している蛋白質 (collagen-associated protein) によって仲介されている。軟骨のコラーゲン線維結合蛋白質としては、cartilage matrix protein (CMP)、フィブロネクチン²⁾、オステオネクチン³⁾、デコリン (PG-II) ⁴⁾、RGD-CAP⁵⁾などが報告されている。

CMP は、気管、鼻中隔、耳、骨端、剣状突起など多数の軟骨に存在し、組織成熟と加齢とともに不溶性マトリックスにより強固に結合する⁶⁾。CMP mRNA は成長板の成熟層に最も高レベルに発現している⁷⁾。しかし関節軟骨では、胎生期には CMP 蛋白質も CMP mRNA も存在しない^{8) 9)}。ただし、Okimura らは変形性関節症の関節軟骨において CMP の産生が著明に亢進することを報告している¹⁰⁾。関節疾患において CMP の産生が著明に亢進することは、CMP が軟骨の再生に重要な働きをしていることを示唆している。一方、軟骨以外の組織では、

角膜やレンズなどにのみ非常に低レベルの CMP が存在するだけで CMP は軟骨に特異的な細胞外基質蛋白である¹¹⁾。しかし CMP の機能は未だ不明である。

CMP は3つの同一のサブユニットが集合した分子量 148 kDa の非コラーゲン線維であり⁸⁾、CMP サブユニットは、二つの類似した繰り返し領域 (CMP1, CMP2) が epidermal growth factor (EGF) 様領域によって連結された構造をとっている¹²⁾。そして CMP のサブユニットはそのカルボキシル末端で S-S 結合と coiled-coil α -helical assembly domain を介して三量体を形成する¹³⁾。CMP の繰り返し領域は type A domain (I domain) と呼ばれ、30-40% の類似のアミノ酸配列は、von Willebrand factor、補体系の C2 (第2成分) と B 因子、 α_1 、 α_2 、 α_M および α_L インテグリン、VI 型コラーゲン、matrillin2¹⁴⁾ などにも存在する¹⁵⁾。興味深いことに type A domain を持つ蛋白の多くは細胞接着に関与している¹⁶⁾ (表 1)。そして type A domain 内の metal ion-dependent adhesion site (MIDAS)¹⁷⁾ が、特に細胞接着に重要と考えられている。

以上の知見は、CMP が細胞接着因子である可能性を示している。そこで本研究では、軟骨コラーゲン線維より精製した CMP を用いて軟骨細胞の接着と伸展に及ぼす CMP の影響を検討した。また CMP と II 型コラーゲンの作用を比較し両者の相乗作用について追求した。さらに CMP の接着伸展促進作用が、インテグリンを仲介するか否かについて検討した。

材 料 と 方 法

I. 材料

マウス IgG (精製品)、ウサギ抗ヒトインテグリン α_1 鎖抗血清¹⁸⁾、ウサギ抗ヒトインテグリン α_2 鎖抗血清¹⁸⁾、ウサギ抗ヒト I 型コラーゲン抗血清は Chemicon International 社から、マウス抗ヒトインテグリン α_1 鎖モノクローナル抗体 (CLONE 5E8D9)¹⁹⁾とマウス抗ヒトインテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体 (CLONE DE9)²⁰⁾ は Upstate Biotechnology Incorporated 社から、マウス抗ヒトインテグリン α_2 鎖モノクローナル抗体 (CLONE P1E6)²¹⁾とマウス抗ヒトインテグリン α_3 鎖モノクローナル抗体 (CLONE P1B5)²¹⁾は Becton Dickinson 社から購入した。ウシ真皮ペプシン可溶化タイプ I コラーゲン、ウシ軟骨ペプシン可溶化タイプ II コラーゲンおよびウシ胎盤ペプシン可溶化タイプ III、IV、V コラーゲンはコーケン社から購入した。

II. 方法

1. ウシ CMP の精製

CMP は II 型コラーゲン線維の表面に強固に結合している²²⁾、本実験では Okimura らの方法により軟骨のコラーゲン線維画分から CMP を精製した¹⁰⁾。精製した CMP を SDS-PAGE 電気泳動後、銀染色を行った。CMP はメルカプトエタノール存在下では 60kDa の、非存在下では 215kDa の単一バンドを示した (図 1A)。市販のフィブロネクチンと II 型コラーゲンを対照とし ELISA 法および SDS 電気泳動と銀染色法により検討すると、これらの接着分子は本 CMP 標品には検出されなかった (<0.01%)。

2. 抗ウシ CMP 抗血清

精製した 14 μg のウシ CMP を含む 0.08 ml の phosphate buffered saline (Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -free) (PBS) を 0.14 ml の RIBI 溶液 (RIBI Immunochem Reseach 社) と混合して、8 週齢の雌 BALB/cAnnNCrj マウスに 2 週間毎に 2 回皮下注射した。最後の注射の 1 週間後に採血した。

3. 抗ウシ CMP 抗体の精製

抗ウシ CMP 血清 0.1 ml を 0.9 ml の 20 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に希釈した後、20 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化した protein G-Sepharose カラム (1 ml) (Pharmacia 社) に展開した。10 ml の同緩衝液で洗浄後、0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH2.7) で溶出し、トリス緩衝液を用いてすぐに pH7.0 に中和した。SDS 電気泳動後、CBB 染色にて IgG の精製の達成を確認した。

4. 細胞培養

Kato ら¹⁾、Shimomura ら²³⁾の方法に準じて、生後 4 週齢の雄性日本白色ウサギ (体重 400 g) (広島実験動物) より肋軟骨、膝関節軟骨細胞および腹膜の線維芽細胞を単離した。ヒト軟骨細胞は長春白求恩医科大学において流産した胎児 (胎生 4 ヶ月) の骨端軟骨より分離した。またヒト胎児肺細胞株である MRC-5 (cell No. RCBO211 理化学研究所) をヒト線維芽細胞として実験に用いた。

単離した細胞は、10 cm 組織培養用培養皿に 50 万個播種し、10%胎仔ウシ血清 (三菱化成)、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カナマイシン (明治製薬)、250 ng/ml アンホテリシン B (ICN Biomedical 社) および 50 U/ml ペニシリン G カリウム (明治製薬)

を含むアルファ変法イーグル培地(α MEM)(三光純薬)にて 37 °C、5% CO₂ 気相下で培養した。

5. 培養細胞の継代

サブコンフルエントの培養細胞に シクロヘキシミド(25 μ g/ml)(和光純薬)を添加し、37 °Cで2時間培養した後、 α MEM で洗浄後、0.1% トリプシンと 0.1% EDTA 含有 PBS にて 37 °Cで3分間インキュベートして細胞を分散させた。

6. CMP とコラーゲンのコーティング

直径 6 mm の培養用マルチウェルプレートまたは浮遊培養用マルチウェルプレートに CMP あるいはコラーゲンあるいは両者を含む 50 μ l の 0.1 M NaHCO₃(pH9.0)溶液を入れて 4 °Cで 18 時間放置した後、PBS で2回洗浄した。さらに非特異的な細胞接着を除くためにウシ血清アルブミン(BSA) (10 mg/ml) を含む PBS (50 μ l)で1時間インキュベートした。

なお、コラーゲンと CMP の共存下での培養皿へのタンパク接着効率は、それぞれ単独での接着効率と同等であることを ELISA 法により確認した(データ示さず)。

7. 細胞接着と伸展率

細胞接着の測定には、CMP あるいはコラーゲンをコートした直径 6 mm の浮遊培養用マルチウェルプレートを用いた。特記しない限り、1 mg/ml の BSA を含有する無血清の α MEM に浮遊した細胞を 5×10^4 細胞/培養系で播種した。2時間後、PBS でゆっくりと2回洗浄し浮遊細胞を除去した後、混合液(MTS 溶液 : PMS 溶液: PBS=0.45 : 0.05 : 9.5) (PROMEGA 社)を 0.1 ml 加え、37 °Cで

2時間インキュベートした後、492 nmでの吸光度を測定した²⁴⁾。本法はミトコンドリアに存在する酵素であるサクシニルデヒドロゲナーゼ活性を測定することにより、生細胞数を検定する方法である。

細胞伸展の測定は、Tuckwellら²⁵⁾の方法に準じ、CMPあるいはコラーゲンをコートした直径6 mmの培養用マルチウェルプレートを用いた。1 mg/mlのBSAを含有する無血清の α MEMに浮遊した細胞を 5×10^3 細胞/培養系で播種した。0から6時間後に伸展した細胞を位相差顕微鏡で観察し、無作為に3視野を写真にとり、全細胞数に対する伸展した細胞の割合を求めた。3つの培養系における値の平均値を伸展率として評価した。

8. 抗インテグリンモノクローナル抗体による抑制実験

細胞を各種抗体とともに0.1 mlの1 mg/mlのBSAを含有する無血清の α MEMで30分間インキュベートした。その後培養皿に播種し、上記のように接着細胞、伸展細胞を測定した。

9. ビオチンによる細胞膜表面のタンパクラベル

細胞表面ラベルはNakamuraら²⁶⁾の変法を用いて行った。サブコンフルエントのヒト線維芽細胞(MRC5)およびヒト軟骨細胞(直径10 cm培養皿5枚)をPBSで洗浄後0.1%トリプシンと0.1% EDTA含有するPBSにて37℃で3分間インキュベートし、さらに細胞をPBSで洗浄した。2 mM $MgCl_2$ 含有のPBS(1 ml)中に10 μ lのLC-BIOTIN (1 mg/ml, PBS)(フナコシ)を加え4℃で30分インキュベートした後、PBSで遠心洗浄後、細胞塊に3mlの1% nonidet P-40、0.1% sodium deoxycholate、0.1% sodium dodecylsulfate (SDS)、0.15 M NaClおよび1 mM

phenylmethanesulfonylfluoride を含有する 10 mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4) (RIPA 溶液) を加えて 4℃で 30 分間インキュベートした。

10. インテグリン抗体による免疫沈降

非特異的吸着を取り除くため、ビオチンラベルした 100 μ l の細胞抽出液に RIPA 溶液で平衡化した 40 μ l の protein G-Sepharose 懸濁液(1:1,V/V)を加え 4℃で 2 時間回転させながらインキュベートした。遠心後、上清に抗体 1 μ l(最終濃度、抗血清 1%、モノクローナル抗体 10 μ g/ml)を加え、4℃で 2 時間回転させながらインキュベートした。さらに 40 μ l の protein G-Sepharose 懸濁液(1:1,V/V)を加え、4℃で 2 時間回転させながらインキュベートした。RIPA 溶液で遠心洗浄を 3 回繰り返す、最後に上清を取り除いた後 protein G-Sepharose に Laemmli 溶液(2 倍濃縮)を 40 μ l 加え、100℃で 5 分間加熱した。

各サンプル(20 μ l)を SDS 電気泳動し、その後タンパクを PVDF 膜に転写し²⁷⁾、メンブレンを 1 μ l の Streptavidin HRP (フナコシ)を含む 10ml の PBS 中で 1 時間インキュベートし、0.05%の Tween20 を含む PBS で 15 分間 1 回洗浄後、PBS で 15 分間ずつ 2 回洗浄した。その後、ECL(Amersham 社)と反応後、オートラジオグラフィーにより分析した²⁸⁾。

11. ¹²⁵I による CMP ラベル

ChloraminT 蛋白標識用キット(ICN Biomedical 社)を用いた。0.1 mg の CMP を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)(緩衝液 A)(0.25 ml)に溶かし、10 μ l の Na¹²⁵I (100 mCi/ml・緩衝液 A)を加え攪拌した。2 μ l の ChloraminT 溶液(1 mg/ml・緩衝液 A)を加え室温で 1 分間反応させた。2.5 μ l の Na₂S₂O₅ 溶液 (2

mg/ml)を加え反応を停止した。反応液を Sephadex G10(1 ml)に展開し、緩衝液 A で溶出して ^{125}I -CMP を分離した。本実験ではモノマーに還元された ^{125}I -CMP を用いた(図 1B)。

12. ^{125}I -CMP とインテグリンとの結合

サブコンフルエントのヒト線維芽細胞(直径 10 cm 培養皿 5 枚)を PBS で洗浄後 0.1%トリプシンと 0.1%EDTA を含有する PBS にて 37 °C で 3 分間インキュベートした後 PBS で洗浄した。次に細胞塊に 3 ml の RIPA 溶液 を加え 4 °C で 30 分間インキュベートした。Protein assay kit (Bio-Rad 社)を用いて蛋白定量を行い 450 μg 蛋白/ml に調整した。

次に、ヒト線維芽細胞抽出液またはヒト軟骨細胞抽出液(100 μl)と ^{125}I -CMP(150 ng)を 4 °C で 2 時間回転しながらインキュベートした。各種インテグリン抗体 1 μl (最終濃度、抗血清 1%、モノクローナル抗体 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を加えさらに 4 °C で 2 時間回転させながらインキュベートした。さらに 40 μl の protein G-Sepharose 懸濁液(1:1,V/V)を加え 4 °C で 2 時間インキュベートした。遠心してペレットに RIPA 溶液を加えて遠心洗浄を 3 回繰り返す、最後に上清を取り除いた後 proteinG-Sepharose に 40 μl の Laemmli 溶液(2 倍濃縮)を加え、100 °C で 5 分間加熱した。サンプル 20 μl を SDS 電気泳動しゲル乾燥後、オートラジオグラフィーで分析した。

結果

1. CMP の細胞接着、伸展促進作用

CMP をコートしたあるいは通常のプラスチック培養皿にウサギ関節軟骨細胞を播種し、2時間後の細胞伸展を観察した。対照では細胞は伸展せず球形のままであった。しかし、CMP をコートした培養皿上では細胞は伸展し、細胞突起を出して星状または多角形を呈した(図 2A)。CMP の伸展促進作用は 30 分以内に観察され、6 時間後に 70%以上の細胞が伸展した。一方、対照では 6 時間後でも 10%以下の細胞しか伸展しなかった(図 2B)。CMP の細胞伸展促進作用は、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ より現れて 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でほぼ最大に達した(図 2A)。また細胞接着促進作用も 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ より現れ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でより顕著となった(図 2C)。しかし、低濃度(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)では CMP は細胞接着と伸展に全く影響しなかった(図 2A、2C)。なお、以下の実験では低濃度として 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、高濃度として 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CMP を用いた。

本培養系に抗 CMP 抗体(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加すると CMP の接着促進作用は対照の約 40%のレベルまで低下したが、コントロール IgG は接着にほとんど影響しなかった(図 3)。CMP をコートした培養皿で細胞をインキュベート中にシクロヘキシミド(和光純薬)を添加し、内在性の基質蛋白合成を完全に阻害した条件下においても CMP は細胞播種の 2 時間後における細胞接着を促進した(データ示さず)。一方、CMP の細胞伸展作用は 4°C では観察できなかつた(データ示さず)。以上の結果は、CMP の細胞伸展作用は単なる物理的な接着現象ではなく細胞の代謝活性に依存する生理的現象であり、かつ他の基質蛋白を介在していないことを示唆している。

ウサギ関節軟骨(rAC)以外の細胞、ウサギ線維芽細胞(rFB)、ヒト胎児骨端軟骨細胞(hEC)、ヒト線維芽細胞(hFB、MRC-5)およびウサギ成長板軟骨細胞(rGC)に対しても CMP は細胞伸展を促進した(図 4)。また、還元剤(2% β -メルカプトエタノール)で前処理した CMP もこれらの細胞に対して伸展促進活性を示した(データ示さず)。

2. 細胞伸展に対する CMP とコラーゲンの相乗作用

II 型コラーゲン(3 $\mu\text{g/ml}$)は軟骨細胞の接着を促進したが、接着細胞の伸展をほとんど促進しなかった(図 6A、C)。また前述したように、低濃度の CMP は接着と伸展にほとんど影響しなかった(図 2A、2C)。しかし、低濃度の CMP と II 型コラーゲンが共在すると、細胞の伸展が開始した(図 5A-d)。II 型コラーゲン(0.1-10 $\mu\text{g/ml}$)(図 6B)と CMP (0.5-10 $\mu\text{g/ml}$)(図 6D)は、それぞれ濃度依存性に細胞伸展を相乗的に促進した。II 型コラーゲン(3 $\mu\text{g/ml}$)が存在すると単独に比較して CMP は 40 倍低い濃度で軟骨細胞の伸展を促進した(図 2A、6D)。この相乗効果は 15 分以内に観察され、1 時間以内に 70%以上の細胞が伸展した(図 5B)。しかし II 型コラーゲン(0.1-10 $\mu\text{g/ml}$)存在下で CMP (0.5-10 $\mu\text{g/ml}$)は、細胞接着にはほとんど影響しなかった(図 6A、6C)。また、多数のコラーゲンの中で CMP は特に II 型コラーゲンと顕著な相乗作用を示した(図 7)。しかし、II 型コラーゲンを熱処理したゼラチンは CMP との相乗作用を示さなかった(図 8)。またフィブロネクチンおよびラミニンも II 型コラーゲンとの相乗作用を示さなかった(データ示さず)。

3. CMP とインテグリンの結合

CMP の接着および伸展促進活性は 1 mM の EDTA で約 50%、2 mM の EDTA で完全に抑制された(図 9)。また 10 mM HEPES-saline(pH7.4)培養液中で、2 mM Mg^{2+} あるいは 1 mM Mn^{2+} の添加は CMP でコートした培養皿への細胞接着と伸展を著しく促進した。一方、 Ca^{2+} は弱い促進しか示さなかった(図 10)。これらの結果は、2 mM の EDTA が α MEM に含まれる 0.8 mM の Mg^{2+} と 1.5 mM の Ca^{2+} をキレートしたため、CMP への細胞接着が起こらなかったこと、および CMP の作用がインテグリンを仲介していることを示唆している。そこで次に、抗インテグリン抗体を用いて以下の実験を行った。ただし市販インテグリン抗体はヒトに対するものが多く、またヒト軟骨細胞は入手困難なため一部の実験を除いてヒト肺線維芽細胞(MRC-5)を用いた。

まず MRC-5 細胞膜表面にインテグリン α_1 、 α_2 、 α_3 、 β_1 鎖が存在することを免疫沈降法にて確認した(図 11A)。 α_1 鎖は約 180kD、 α_2 鎖は約 160kD、 α_3 鎖は約 100kD、 β_1 鎖は約 130kD 付近に検出された。無傷のヒトインテグリン α_3 鎖は 145kD-155kD であるが、本実験では重鎖と軽鎖のジスルフィド結合が外れた重鎖のみが検出されたと考えられる。

抗ヒトインテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体はヒト線維芽細胞の接着を抑制しその効果は 3 μ g/ml で現れた。しかし、抗ヒトインテグリン α_1 、 α_2 および α_3 鎖モノクローナル抗体は細胞接着にほとんど影響しなかった(図 11B)。なおヒト線維芽細胞のフィブロネクチン(20 μ g/ml)への接着を本抗インテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体はほとんど抑制しなかったが、抗インテグリン α_3 鎖モノクローナル抗体は約 70%抑制した(データ示さず)。

次にヒト軟骨細胞膜表面に発現しているインテグリンを確認するためヒト軟骨細胞膜表面をビオチンラベルして抗インテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体で免疫沈降を行った。その結果、インテグリン α_1 、 α_2 、 α_3 が β_1 鎖と共に沈降した(図 12A)。ヒト軟骨細胞培養液委系において抗ヒトインテグリン α_1 鎖モノクローナル抗体および抗ヒトインテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体は細胞接着を約 40%抑制した(図 12B)。

次に、ヒト線維芽細胞抽出液と ^{125}I でラベルした CMP をインキュベートしたものを、各種インテグリン抗体(抗ヒトインテグリン α_1 鎖、抗 α_2 鎖、抗 β_1 鎖抗血清)および抗ヒト I 型コラーゲン抗血清で免疫沈降を行った。そして、この抗ヒトインテグリン α_1 鎖抗血清は ^{125}I -CMP を沈降した(図 13A)。抗ヒトインテグリン α_1 鎖抗血清による ^{125}I -CMP の沈降は試験管に加える ^{125}I -CMP の濃度に依存して増加した(図 14)。一方、抗ヒトインテグリン抗 α_2 鎖と抗ヒト I 型コラーゲン抗血清は ^{125}I -CMP を沈降しなかった(図 13A)。また、ヒト軟骨細胞抽出液と ^{125}I でラベルした CMP をインキュベートしたものを、抗ヒト α_1 鎖抗血清で免疫沈降を行うと、抗ヒト α_1 鎖抗血清が ^{125}I -CMP を沈降した(図 13C)。しかしコントロール実験として、ヒト線維芽細胞抽出液の代わりに抽出に用いた溶液のみで実験を同時に行ったが ^{125}I -CMP は沈降しなかった(図 13B)。なおヒト線維芽細胞抽出液において抗インテグリン α_5 、 β_1 、 β_2 鎖モノクローナル抗体は、 ^{125}I -CMP を沈降しなかった(データ示さず)。また本実験条件下では、抗ヒト α_3 鎖抗血清は ^{125}I -CMP と直接結合しやすいため、詳しい解析は困難であった(データ示さず)。

考 察

抗 CMP 抗体を用いてブタ肋軟骨成長板における CMP の分布を検討したところ CMP は細胞膜周囲に高レベルに局在していた(Okimura と Makihira らのデータ、未発表)。この観察は、ウシ軟骨で軟骨細胞の細胞膜周囲に CMP が局在するという Hauser らの報告と一致する²⁹⁾。本研究では、CMP の細胞膜周囲への局在と CMP 分子内の type A domain 様のアミノ酸配列に着目し、細胞接着に及ぼす CMP の作用を検討した。その結果、CMP は軟骨細胞と線維芽細胞に対する接着因子であることが判明した。

本研究では、接着細胞を MTT assay を用いて浮遊細胞と区別した。また、位相差顕微鏡による観察で、細胞突起を出して扁平となった細胞を伸展細胞として、浮遊あるいは接着細胞と区別した。これら 2 種類の実験方法を用いることにより、CMP と II 型コラーゲンの接着と伸展に及ぼす影響の相違について検討した。その結果、II 型コラーゲン(3 $\mu\text{g/ml}$)と共存させると低濃度(0.5 $\mu\text{g/ml}$)の CMP は接着には影響することなく II 型コラーゲンの伸展活性を強力に増強することが判明した。このような機能を有した蛋白が発見されたのは初めてである。フィブロネクチンおよびラミニンは、単独で接着・伸展を促進したものの II 型コラーゲンとの相乗作用を示さなかった。

コラーゲンとの重量比が 1/6 以下で CMP の伸展活性が最大となったことは、生体内で CMP がコラーゲンよりも含量が少ないことと一致している³⁰⁾。さらに

II型コラーゲンを変性したゼラチンは、II型コラーゲン自身の単独での伸展作用を少し増強したが、低濃度(0.5 $\mu\text{g/ml}$)のCMPとの相乗作用を示さなかった。また、コラーゲンの中でCMPはII型コラーゲンの伸展促進活性のみを特に強く増強した。I、II、III、V型コラーゲンは線維形成性コラーゲンであり結合組織の主要成分である。IV型コラーゲンは、基底膜コラーゲンであり線維を形成しない。各コラーゲン分子は類似したアミノ酸配列をもっているにもかかわらず、CMPがII型コラーゲンの伸展作用を特に増強したことは、II型コラーゲンが他のコラーゲンと異なる分子構造を部分的に持っていることを示唆している。例えば、VI型コラーゲンは他のコラーゲンよりも強い伸展促進活性を示すことが知られている³⁰⁾。また、CMPはII型コラーゲン存在下で低濃度で接着に影響することなく伸展のみを促進し、高濃度では接着と伸展の両者を促進した。生体内でCMPはII型コラーゲンの発現に続いて同部位に発現する³¹⁾。生体内でCMPはその発現初期ではII型コラーゲンとともに細胞伸展を促進し、さらに分化が進行した段階あるいは組織再生過程でCMP濃度が高レベルに達すると、CMP単独でも細胞の接着・伸展能を活性化すると推察される。

さらに、CMPとインテグリン α_1 鎖が直接結合することが示された。インテグリンは多様な細胞外基質と結合し情報伝達を行っている膜蛋白であり、分子量120-180kDの α 鎖と分子量90-110kDの β 鎖が非共有結合で会合してヘテロダイマーを形成する。 β 鎖の細胞内領域にはリン酸化されるチロシン残基があり、細胞内シグナル伝達に関与している。リガンドとインテグリンが結合すると接着斑が形成されるが、これには細胞内エネルギー代謝を必要とする³²⁾。

また、リガンドとインテグリンの結合には2価の金属イオンが必要であるものの³³⁾、新規蛋白合成を必要としない³⁴⁾。また、インテグリンにはそれぞれ数種類の α 鎖と β 鎖が存在して、その組み合わせの違いにより、リガンド特異性が異なる。軟骨細胞ではインテグリン β_1 鎖が特に重要な役割を果たしている³⁵⁾。

細胞は最初、基質中のリガンドと弱く結合して接着する。次に、リガンドとインテグリンの結合が細胞内にシグナルを伝え、インテグリンの会合やアクチン線維の集合を誘起して接着斑を形成する。接着斑の形成により細胞は強くリガンドと結合して伸展し場合によっては移動を開始する³⁶⁾。一方、抗接着因子である SPARC、PG-M³⁷⁾およびテネイシン³⁸⁾は基質との結合(接着)を阻害することなく細胞伸展を阻止する。したがって、接着因子と抗接着因子のバランスによって細胞の挙動が制御される。

本研究で示したように、CMP と細胞との結合は EDTA で抑制された。また Mg^{2+} と Mn^{2+} は CMP への細胞接着と伸展を促進した。一方 Ca^{2+} はこれらの金属イオンよりも弱い作用を示した。また、他の接着分子³³⁾の場合と同様に CMP の接着促進活性は 4℃では観察されず、新規蛋白合成を必要としなかった。これらの観察は CMP の作用発現にはインテグリンとの結合が必須であることを示唆している。

本実験に使用したインテグリン β_1 、 α_1 、 α_2 および α_3 鎖に対するモノクローナル抗体は、基質タンパクやウィルスなどと細胞の結合を阻止する中和抗体である¹⁹⁻²¹⁾。しかし本研究で用いた各種インテグリン抗体のなかで、抗インテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体のみが線維芽細胞の CMP への接着・伸展を阻止

した。抗インテグリン α_1 、 α_2 、 α_3 鎖モノクローナル抗体は、3-10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では、接着にほとんど影響しなかった。一方、軟骨細胞に対しては抗インテグリン β_1 および α_1 鎖モノクローナル抗体両者が CMP への接着を約 40% 阻害した。以上の知見は、CMP へのヒト線維芽細胞の接着にはインテグリン β_1 鎖が、ヒト軟骨細胞の接着にはインテグリン β_1 鎖および α_1 鎖が特に重要な役割を果たしていることを示している。

また、 ^{125}I -CMP を用いた免疫沈降実験では線維芽細胞抽出液および軟骨細胞抽出液の両者で、抗インテグリン α_1 鎖抗血清は、 ^{125}I -CMP を沈降した。抗インテグリン β_1 鎖抗体は ^{125}I -CMP を沈降しなかったのは、 β_1 インテグリンのリガンド認識部位を抗インテグリン β_1 鎖抗体がブロックした可能性、あるいは α_1 、 α_3 インテグリンの CMP との結合部位は、おもに α 鎖に存在し β 鎖は接着斑の形成に関与している可能性を示唆している。さらに多種類の抗インテグリン抗体を用いて研究する必要があるが、市販の抗体を用いた本研究の結果から、CMP を認識するインテグリンのひとつが線維芽細胞と軟骨細胞の両者で $\alpha_1 \beta_1$ インテグリンであることが判明した。また抗ヒト I 型コラーゲン抗血清が ^{125}I -CMP を沈降しなかったことは CMP と $\alpha_1 \beta_1$ インテグリンの結合に I 型コラーゲンが存在していないことを示唆している。

I 型および II 型コラーゲンは $\alpha_1 \beta_1$ ³⁹⁾、 $\alpha_2 \beta_1$ ⁴⁰⁾、 $\alpha_3 \beta_1$ インテグリン⁴¹⁾ と結合する。II 型コラーゲンは $\alpha_1 \beta_1$ インテグリンとは結合しないとの報告がある³⁹⁾。また、熱変性によってコラーゲンの高次構造が変化すると I 型コラーゲンと心臓の線維芽細胞の結合は $\alpha_5 \beta_1$ インテグリンにより仲介される⁴⁰⁾。また、熱変

性によってコラーゲンの高次構造が変化すると $\alpha_2 \beta_1$ インテグリンに代わって $\alpha_5 \beta_1$ インテグリンが II 型コラーゲンと軟骨肉腫(HCS-2/8)細胞の結合を仲介する²⁵⁾。つまり、インテグリンと細胞の結合は、コラーゲンの立体構造に依存している。

CMP とコラーゲンの複合体が、どのインテグリン分子と相互作用するかは実験系が複雑になるため本研究ではまだ検討していない。しかし CMP はコラーゲンと複合体を形成することにより互いのコンフォメーションを変化させインテグリンへの結合能を高める可能性がある。あるいは CMP と $\alpha_1 \beta_1$ インテグリンの結合によって $\alpha_2 \beta_1$ や $\alpha_3 \beta_1$ インテグリンの II 型コラーゲンへの親和性が亢進するかもしれない。実際、抗インテグリン β_1 鎖抗体は $\alpha_5 \beta_1$ インテグリンのフィブロネクチンへの親和性を 20 倍上昇させることによって、K562(赤白血症細胞株)のフィブロネクチンへの接着を促進する⁴²⁾。また、抗 $\alpha_5 \beta_1$ インテグリン抗体は胎生ウシ耳介軟骨細胞の fibrillin-1 への接着を促進する⁴³⁾。

最近、インテグリンはそのリガンドに加わる力学的負荷を認識しうるということが明らかになった⁴⁴⁾。沖村らは、変形性関節症およびリュウマチ性関節炎において CMP 産生が亢進することを報告している¹⁰⁾。免疫染色および免疫沈降にて、ヒト軟骨細胞にも $\alpha_1 \beta_1$ インテグリンが存在することが示されている⁴⁵⁾。さらに、変形性関節症で $\alpha_1 \beta_1$ 、 $\alpha_3 \beta_1$ インテグリンの合成が亢進することがすでに報告されている⁴⁶⁾。軟骨培養細胞にメカニカルストレスをかけると数種のインテグリンレベルが変動することも報告されている⁴⁷⁾。したがって、変形性関節症お

よびリュウマチ性関節炎での CMP およびインテグリン合成の亢進は、軟骨の炎症反応あるいは再生反応に重要な役割を果たしていると推察される。

CMP など type A domain を有する各種の蛋白群は、細胞接着、血液凝固、免疫系などに関与している。本実験で、CMP は $\alpha_1\beta_1$ インテグリンと結合することが示唆された。両者とも type A domain を有している。 $\alpha_1\beta_1$ インテグリンと CMP の type A domain 同士がホモフィリックな結合をしている可能性も考えられる。しかし、この結合に直接 type A domain が関与しているかは不明である。いずれにせよ CMP および CMP 分子中の接着促進活性を担う分子内ドメインは、骨再生誘導などの歯科臨床に役立つものと期待される。

結論

1. CMP は軟骨特異的接着因子であることが判明した。
2. CMP は II 型コラーゲンの接着促進活性には影響しないが、その細胞伸展促進活性を著しく増強した。
3. CMP は $\alpha_1\beta_1$ インテグリンと直接結合することが判明した。

謝 辞

稿を終えるにあたりまして、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学歯科補綴学第二講座濱田泰三教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に際し、終始御懇切なる御指導、御助言を頂いた本学口腔生化学講座加藤幸夫教授に感謝の意を表します。さらに、本論文作製上、御助言、御校閲を賜りました本学口腔生理学講座柴芳樹教授に感謝致します。

また、本研究遂行上始終御指導、御鞭撻を頂いた本学口腔生化学講座 Yan Weiqun 博士に深謝致します。さらに、本研究遂行上および本論文作製上御指導、御助言を頂いた本学口腔生化学講座能城光秀助教授、河本健博士、藤本勝巳博士、申鳴博士、沖村昭信博士、橋本和人博士、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所大宅芳枝博士に深謝致します。

最後に本研究を進める際に、多大なる御支援を頂いた本学歯科補綴学第二講座ならびに口腔生化学講座の教室員の方々に感謝致します。

本論文は主として以下の論文に基づき Thesis としてまとめたものである。

Makihira, S., Yan, W., Ohno, S., Okimura, A., Kawamoto, T., Hamada, T., Noshiro, M., and Kato, Y.: Cartilage matrix protein (CMP) is an adhesion factor for chondrocytes and fibroblasts. (submitted)

Okimura, A., Okada, Y., Makihira, S., Pan, H., Yu, L., Tanne, K., Imai, K., Yamada, H., Kawamoto, T., Noshiro, M., Yan, W. and Kato, Y. : Enhancement of cartilage matrix protein synthesis in arthritic cartilage. Arthritis. Rheum. 40, 1029-1036, 1997.

本論文の要旨は、平成9年2月第10回日本軟骨代謝学会、平成9年3月第97回日本補綴歯科学会および平成9年7月第15回日本骨代謝学会において発表した。

参 考 文 献

- 1) Kato, Y. and Gospodarowicz, D. : Effect of exogenous extracellular matrices on proteoglycan synthesis by cultured rabbit costal chondrocytes. *J. Cell. Biol.* 100, 486-495, 1985.
- 2) Owens, R. J. and Baralle, F. E. : Mapping the collagen-binding site of human fibronectin by expression in *Escherichia coli*. *EMBO. J.* 5, 2825-2830, 1986.
- 3) Kelm, R. J. Jr. and Mann, K. G. : The collagen binding specificity of bone and platelet osteonectin is related to differences in glycosylation. *J. Biol. Chem.* 266, 9632-9639, 1991.
- 4) Onodera, S., Kuboki, Y. and Tashiro, S. : Purification of a noncollagenous high molecular weight protein from bovine articular cartilage. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 11-17, 1996.
- 5) Hashimoto, K., Noshiro, M., Ohno, S., Kawamoto, T., Satakeda, H., Akagawa, Y., Nakashima, K., Okimura, A., Ishida, H., Okamoto, T., Pan, H., Shen, M., Yan, W. and Kato, Y. : Characterization of a cartilage-derived 66-kDa protein (RGD-CAP/beta ig-h3) that binds to collagen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1355, 303-314, 1997.
- 6) Paulsson, M. and Heinegard, D. : Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage. *Biochem. J.* 183, 539-545, 1979.
- 7) Chen, Q., Johnson, D. M., Haudenschild, D. R. and Goetinck, P. F. : Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. *Dev. Biol.* 172, 293-306, 1995.
- 8) Paulsson, M. and Heinegard, D. : Radioimmunoassay of the 148-kilodalton cartilage protein. Distribution of the protein among bovine tissues. *Biochem. J.* 207, 207-213, 1982.
- 9) Mundlos, S. and Zabel, B. : Developmental expression of human cartilage matrix protein. *Dev. Dyn.* 199, 241-252, 1994.
- 10) Okimura, A., Okada, Y., Makihiro, S., Pan, H., Yu, L., Tanne, K., Imai, K., Yamada, H., Kawamoto, T., Noshiro, M., Yan, W. and Kato, Y. :

- Enhancement of cartilage matrix protein synthesis in arthritic cartilage. *Arthritis. Rheum.* 40, 1029-1036, 1997.
- 11) Tsonis, P. A. and Goetinck, P. F. : Expression of cartilage-matrix genes and localization of their translation products in the embryonic chick eye. *Exp. Eye Res.* 46, 753-764, 1988.
 - 12) Argraves, W. S., Deak, F., Sparks, K. J., Kiss, I. and Goetinck, P. F. : Structural features of cartilage matrix protein deduced from cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 464-468, 1987.
 - 13) Kiss, I., Deak, F., Holloway, R. G., Jr., Delius, H., Mebust, K. A., Frimberger, E., Argraves, W. S., Tsonis, P. A., Winterbottom, N. and Goetinck, P. F. : Structure of the gene for cartilage matrix protein, a modular protein of the extracellular matrix. Exon/intron organization, unusual splice sites, and relation to alpha chains of beta 2 integrins, von Willebrand factor, complement factors B and C2, and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 264, 8126-8134, 1989.
 - 14) Deak, F., Piecha, D., Bachrati, C., Paulsson, M. and Kiss, I. : Primary structure and expression of matrilin-2, the closest relative of cartilage matrix protein within the von Willebrand factor type A-like module superfamily. *J. Biol. Chem.* 272, 9268-9274, 1997.
 - 15) Colombatti, A. and Bonaldo, P. : The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood.* 77, 2305-2315, 1991.
 - 16) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Roberts, J. R., Kostel, P., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S. : A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728. *J. Biol. Chem.* 262, 1734-1739, 1987.
 - 17) Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A. and Liddington, R. : Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell.* 80, 631-638, 1995.
 - 18) Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. : New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238, 491-497, 1987.
 - 19) Luque, A., Sanchez Madrid, F. and Cabanas, C. : Functional regulation of the human integrin VLA-1 (CD49a/CD29) by divalent cations and stimulatory beta 1 antibodies. *FEBS Lett.* 346, 278-284, 1994.

- 20) Bergelson, J. M., Chan, B. M., Finberg, R. W. and Hemler, M. E. : The integrin VLA-2 binds echovirus 1 and extracellular matrix ligands by different mechanisms. *J. Clin. Invest.* 92, 232-239, 1993.
- 21) Carter, W. G., Wayner, E. A., Bouchard, T. S. and Kaur, P. : The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J. Cell Biol.* 110, 1387-1404, 1990.
- 22) Winterbottom, N., Tondravi, M. M., Harrington, T. L., Klier, F. G., Vertel, B. M. and Goetinck, P. F. : Cartilage matrix protein is a component of the collagen fibril of cartilage. *Dev. Dyn.* 193, 266-276, 1992.
- 23) Shimomura, Y., Yoneda, T. and Suzuki, F. : Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif. Tissue Res.* 19, 179-187, 1975.
- 24) Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., and Cory, J. G. : Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3, 207-212, 1991.
- 25) Tuckwell, D. S., Ayad, S., Grant, M. E., Takigawa, M. and Humphries, M. J. : Conformation dependence of integrin-type II collagen binding. Inability of collagen peptides to support alpha 2 beta 1 binding, and mediation of adhesion to denatured collagen by a novel alpha 5 beta 1-fibronectin bridge. *J. Cell Sci.* 107, 993-1005, 1994.
- 26) Nakamura, K., Iwamoto, R. and Mekada, E. : Membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and diphtheria toxin receptor-associated protein (DRAP27)/CD9 form a complex with integrin alpha 3 beta 1 at cell-cell contact sites. *J. Cell Biol.* 129, 1691-1705, 1995.
- 27) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979 [classical article]. *Biotechnology.* 24, 145-149, 1992.
- 28) Stephens, L. E., Sonne, J. E., Fitzgerald, M. L. and Damsky, C. H. : Targeted deletion of beta 1 integrins in F9 embryonal carcinoma cells affects morphological differentiation but not tissue-specific gene expression. *J. Cell Biol.* 123, 1607-1620, 1993.
- 29) Hauser, N. and Paulsson, M. : Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil alpha-helix. *J. Biol. Chem.* 269, 25747-25753, 1994.
- 30) Aumailley, M., Mann, K., von der Mark, H. and Timpl, R. : Cell attachment properties of collagen type VI and Arg-Gly-Asp dependent binding to its alpha 2(VI) and alpha 3(VI) chains. *Exp. Cell Res.* 181, 463-474, 1989.

- 31) Franzen, A., Heinegard, D. and Solursh, M. : Evidence for sequential appearance of cartilage matrix proteins in developing mouse limbs and in cultures of mouse mesenchymal cells. *Differentiation*. 36, 199-210, 1987.
- 32) Xia, Y., Gil, S. G. and Carter, W. G. : Anchorage mediated by integrin alpha6beta4 to laminin 5 (epiligrin) regulates tyrosine phosphorylation of a membrane-associated 80-kD protein. *J. Cell Biol.* 132, 727-740, 1996.
- 33) Elices, M. J., Urry, L. A. and Hemler, M. E. : Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differentially influenced by Arg-Gly-Asp peptide and by divalent cations. *J. Cell Biol.* 112, 169-181, 1991.
- 34) Arroyo, A. G., Garcia Pardo, A. and Sanchez Madrid, F. : A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti-beta 1 chain monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 268, 9863-9868, 1993.
- 35) Enomoto, M., Leboy, P. S., Menko, A. S. and Boettiger, D. : Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp. Cell Res.* 205, 276-285, 1993.
- 36) Gumbiner, B. M. : Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 84, 345-357, 1996.
- 37) Yamagata, M. and Kimata, K. : Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. *J. Cell Sci.* 107, 2581-2590, 1994.
- 38) Fischer, D., Brown Ludi, M., Schulthess, T. and Chiquet Ehrismann, R. : Concerted action of tenascin-C domains in cell adhesion, anti-adhesion and promotion of neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* 110, 1513-1522, 1997.
- 39) Aumailley, M., Mann, K., von der Mark, H. and Timpl, R. : Cell attachment properties of collagen type VI and Arg-Gly-Asp dependent binding to its alpha 2(VI) and alpha 3(VI) chains. *Exp. Cell Res.* 181, 463-474, 1989.
- 40) Franzen, A., Heinegard, D. and Solursh, M. : Evidence for sequential appearance of cartilage matrix proteins in developing mouse limbs and in cultures of mouse mesenchymal cells. *Differentiation*. 36, 199-210, 1987.
- 41) Riikonen, T., Vihinen, P., Potila, M., Rettig, W. and Heino, J. : Antibody against human alpha 1 beta 1 integrin inhibits HeLa cell adhesion to laminin and to type I, IV, and V collagens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 205-212, 1995.
- 42) Gullberg, D., Gehlsen, K. R., Turner, D. C., Ahlen, K., Zijenah, L. S., Barnes, M. J. and Rubin, K. : Analysis of alpha 1 beta 1, alpha 2 beta 1 and alpha 3

- beta 1 integrins in cell--collagen interactions: identification of conformation dependent alpha 1 beta 1 binding sites in collagen type I. *EMBO J.* 11, 3865-3873, 1992.
- 43) Takada, Y., Wayner, E. A., Carter, W. G. and Hemler, M. E. : Extracellular matrix receptors, ECMRII and ECMRI, for collagen and fibronectin correspond to VLA-2 and VLA-3 in the VLA family of heterodimers. *J. Cell Biochem.* 37, 385-393, 1988.
 - 44) Faull, R. J., Kovach, N. L., Harlan, J. M. and Ginsberg, M. H. : Affinity modulation of integrin alpha 5 beta 1: regulation of the functional response by soluble fibronectin. *J. Cell Biol.* 121, 155-162, 1993.
 - 45) Sakamoto, H., Broekelmann, T., Cheresch, D. A., Ramirez, F., Rosenbloom, J. and Mecham, R. P. : Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J. Biol. Chem.* 271, 4916-4922, 1996.
 - 46) Choquet, D., Felsenfeld, D. P. and Sheetz, M. P. : Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell.* 88, 39-48, 1997.
 - 47) Woods, V. L., Jr., Schreck, P. J., Gesink, D. S., Pacheco, H. O., Amiel, D., Akeson, W. H. and Lotz, M. : Integrin expression by human articular chondrocytes. *Arthritis-Rheum.* 37, 537-544, 1994.
 - 48) Loeser, R. F., Carlson, C. S. and McGee, M. P. : Expression of beta 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp. Cell Res.* 217, 248-257, 1995.
 - 49) Holmvall, K., Camper, L., Johansson, S., Kimura, J. H. and Lundgren Akerlund, E. : Chondrocyte and chondrosarcoma cell integrins with affinity for collagen type II and their response to mechanical stress. *Exp. Cell Res.* 221, 496-503, 1995.

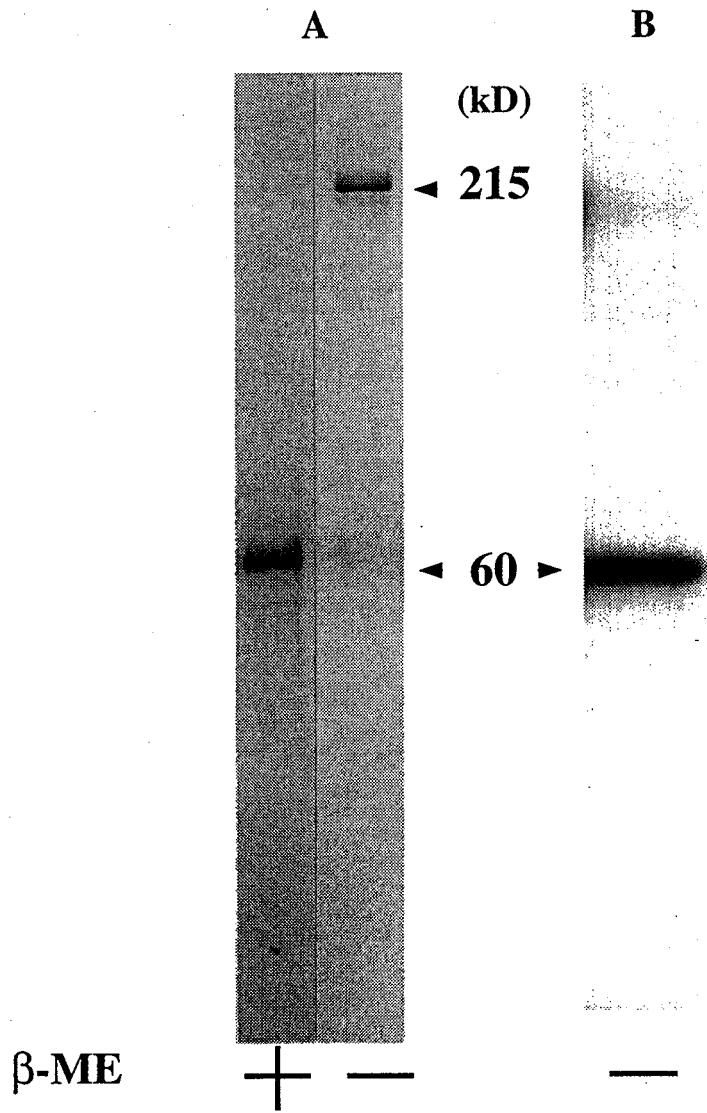


図1 精製したCMP(A)および ^{125}I でラベルしたCMP(B)の電気泳動パターン
(A 銀染色、B オートラジオグラフィー)

- A 精製したウシCMPは還元条件で60kD、非還元条件で215kDであった。
B ^{125}I でラベルしたCMPは60kDであった。

細胞外マトリックス	Cartilage Matrix Protein matrillin 2 type VI collagen
インテグリン	α_M 鎖 α_L 鎖 α_X 鎖 α_1 鎖 α_2 鎖
凝血系	von Willebrand factor
補体	補体C2 補体活性系のB因子

表1 Type A domain を持つ蛋白群

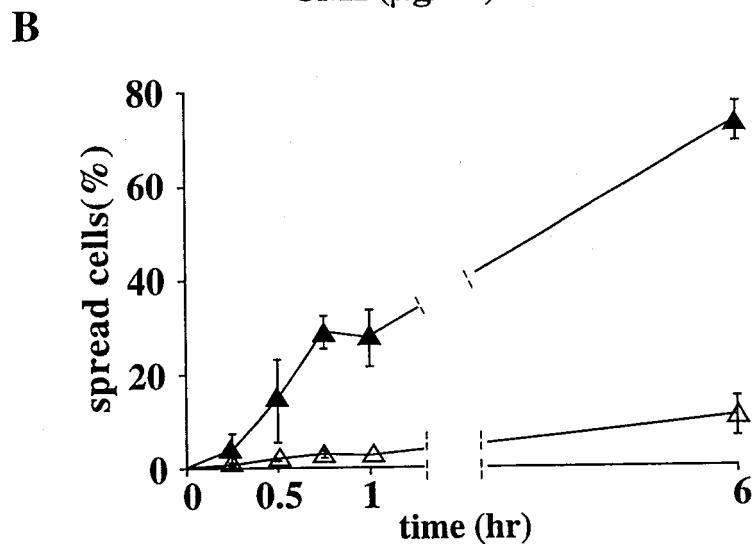
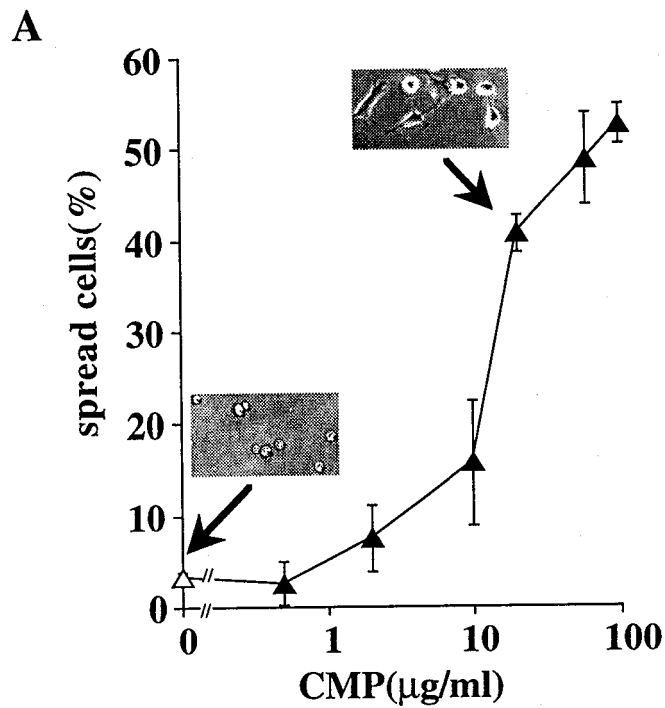
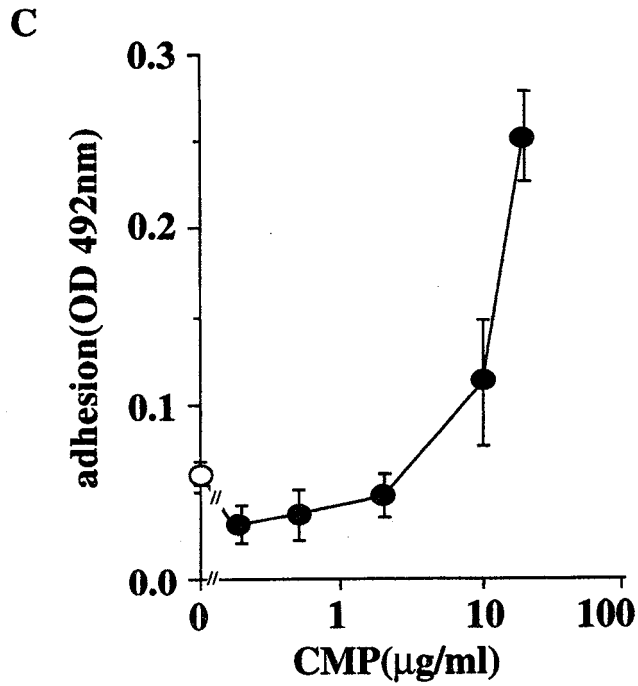


図2 軟骨細胞の接着、伸展に及ぼすCMPの影響

A CMP(0-100 $\mu\text{g/ml}$)をコートした直径6 mmの培養用マルチウェルプレートにBSA(1 mg/ml)を含有する無血清の αMEM に浮遊したウサギ関節軟骨細胞を 5×10^3 細胞/培養系で播種した。2時間後に伸展した細胞を位相差顕微鏡で観察し3視野の写真をとり全細胞数に対する伸展した細胞の割合を求めた。3つの培養系における値の平均値を伸展率として評価した。(Δ; コントロール、▲; CMP(0-100 $\mu\text{g/ml}$))

B ウサギ関節軟骨細胞の伸展に及ぼすCMP(20 $\mu\text{g/ml}$)の影響を経時的に観察した。(Δ; コントロール、▲; CMP(20 $\mu\text{g/ml}$))



C CMP(0-20 $\mu\text{g/ml}$)をコートした直径 6mm の浮遊培養用マルチウェルプレートにウサギ関節軟骨細胞を 5×10^4 細胞/培養系で播種し2時間後洗浄によって浮遊細胞を除去した後、MTT法にて492nmでの吸光度を測定し接着細胞数を評価した。(○; コントロール、●; CMP(0-20 $\mu\text{g/ml}$))

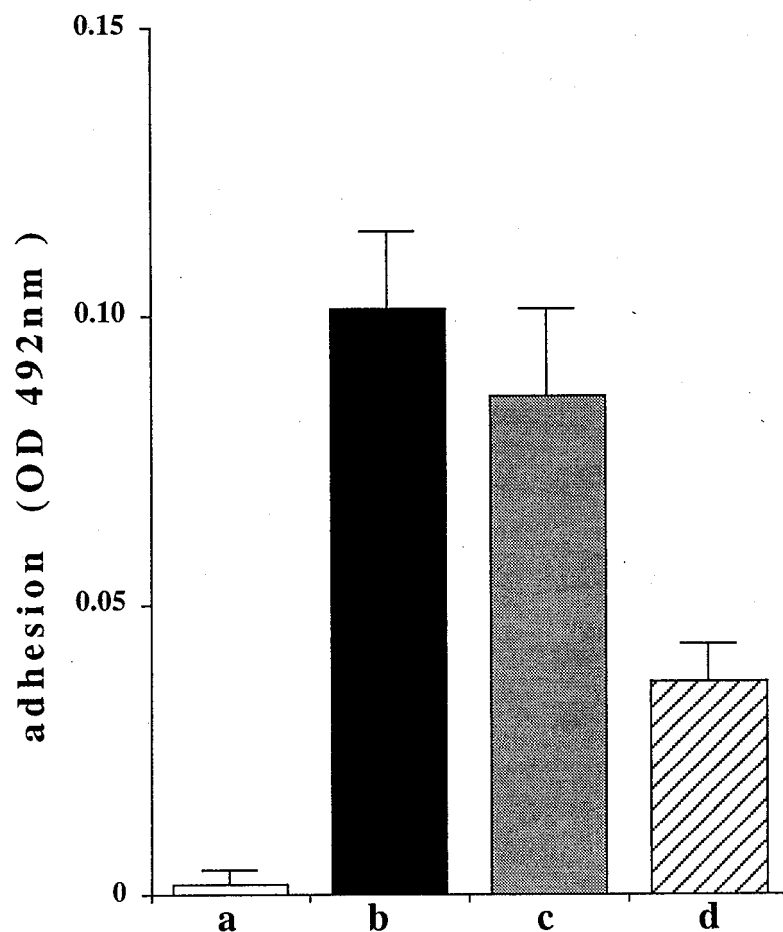


図3 抗CMP抗体のCMP接着活性に及ぼす影響

無コート(a)あるいはCMP(20 $\mu\text{g/ml}$)をコートした(b、c、d)直径6 mm の培養用マルチウェルプレートにウサギ関節軟骨細胞をを 5×10^3 細胞/培養系で播種した。同時に抗CMP抗体(20 $\mu\text{g/ml}$)(d)あるいはコントロールIgG(20 $\mu\text{g/ml}$)(c)を添加した。細胞播種1時間後MTT法にて492nmでの吸光度を測定した。(c; コントロールIgG(20 $\mu\text{g/ml}$), d; 抗CMP抗体(20 $\mu\text{g/ml}$))

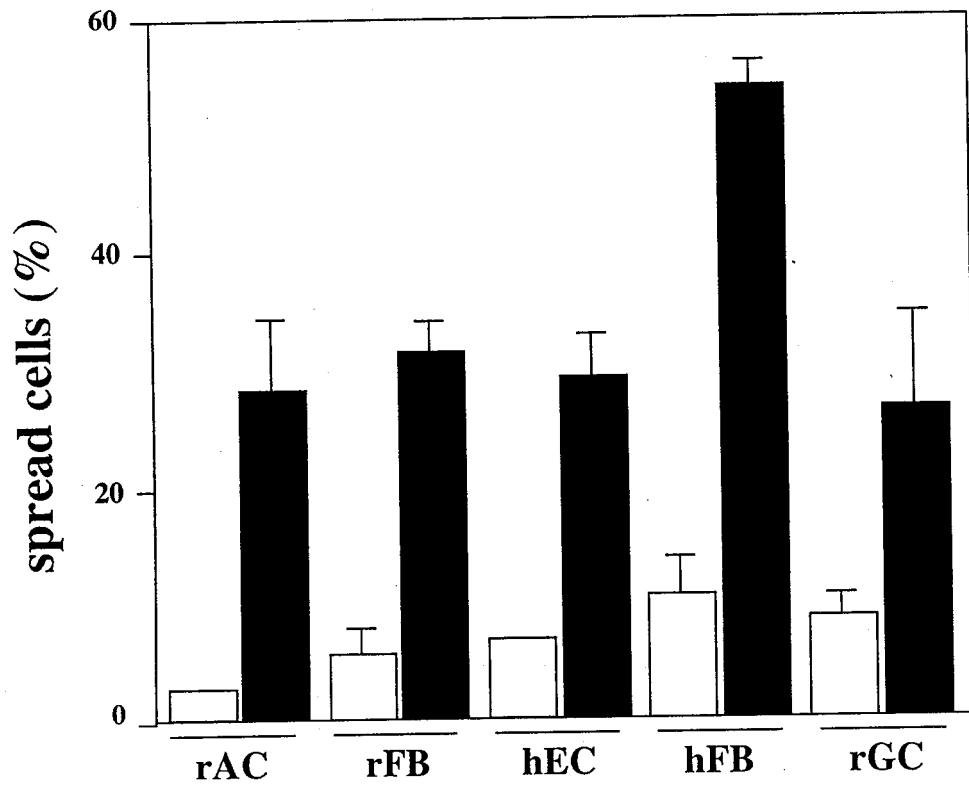


図4 各細胞の接着、伸展に及ぼすCMPの影響

ウサギ関節軟骨(rAC)、ウサギ線維芽細胞(rFB)、ヒト関節軟骨(hEC)、ヒト線維芽細胞(rFB)およびウサギ成長板軟骨(rGC)をCMP(20 $\mu\text{g/ml}$)をコートした直径6 mmの培養用マルチウェルプレートに播種した。rAC、rFB、hECおよびMRC5は細胞播種1時間後、rGCは2時間後に伸展率を測定した。(□; コントロール, ■; CMP)

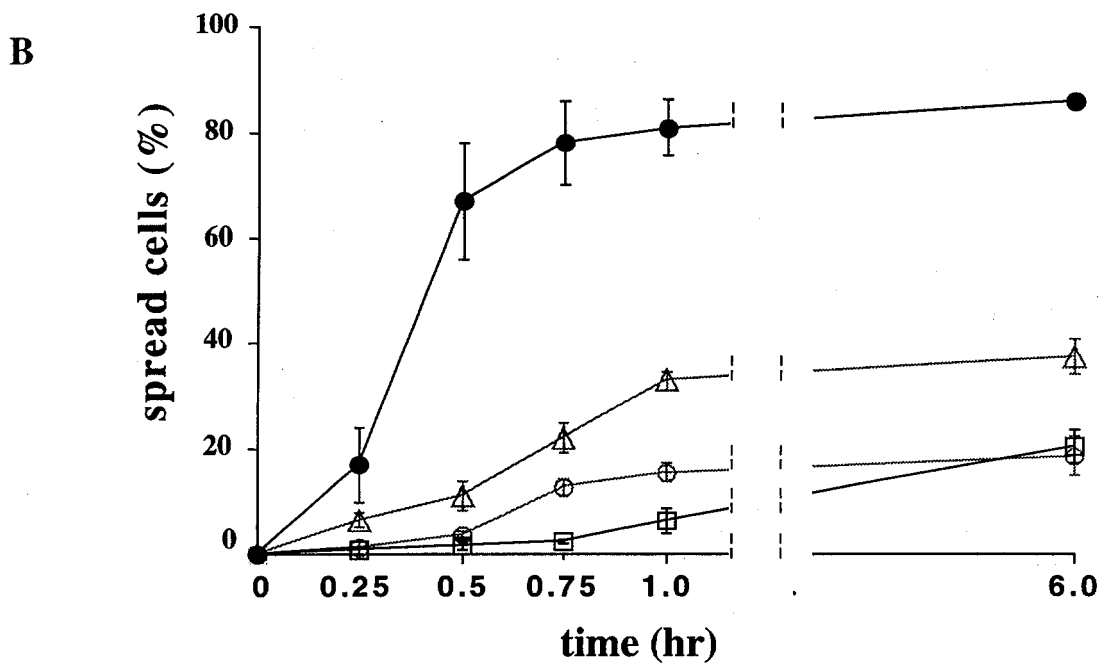
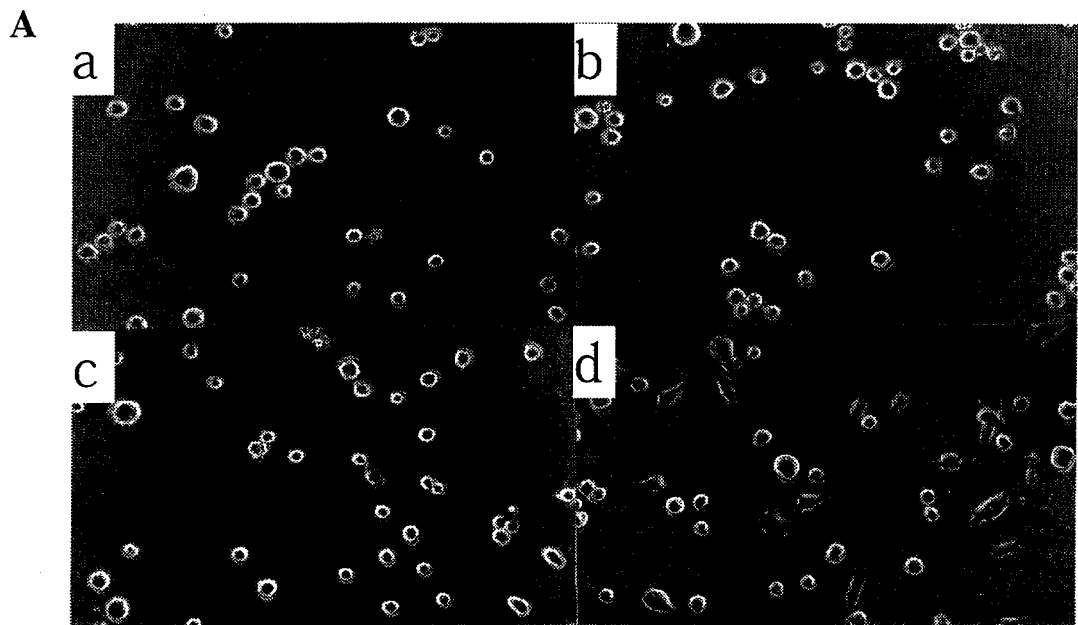


図5 軟骨細胞の伸展に及ぼすCMPとII型コラーゲンの影響

A コントロール(a)あるいはCMP(0.5 $\mu\text{g/ml}$)(b)、II型コラーゲン(3 $\mu\text{g/ml}$)(c)およびCMP(0.5 $\mu\text{g/ml}$)とII型コラーゲン(3 $\mu\text{g/ml}$)(d)の両者をコートした直径6 mmの培養用マルチウェルプレートにウサギ関節軟骨細胞を 5×10^3 細胞/培養系で播種した。1時間後に細胞を位相差顕微鏡を用いて観察した(x 200)。

B A-a, b, cおよびdの条件で細胞播種後0から6時間での伸展率を測定した。(○; A-a, △; A-b, □; A-c, ●; A-d)

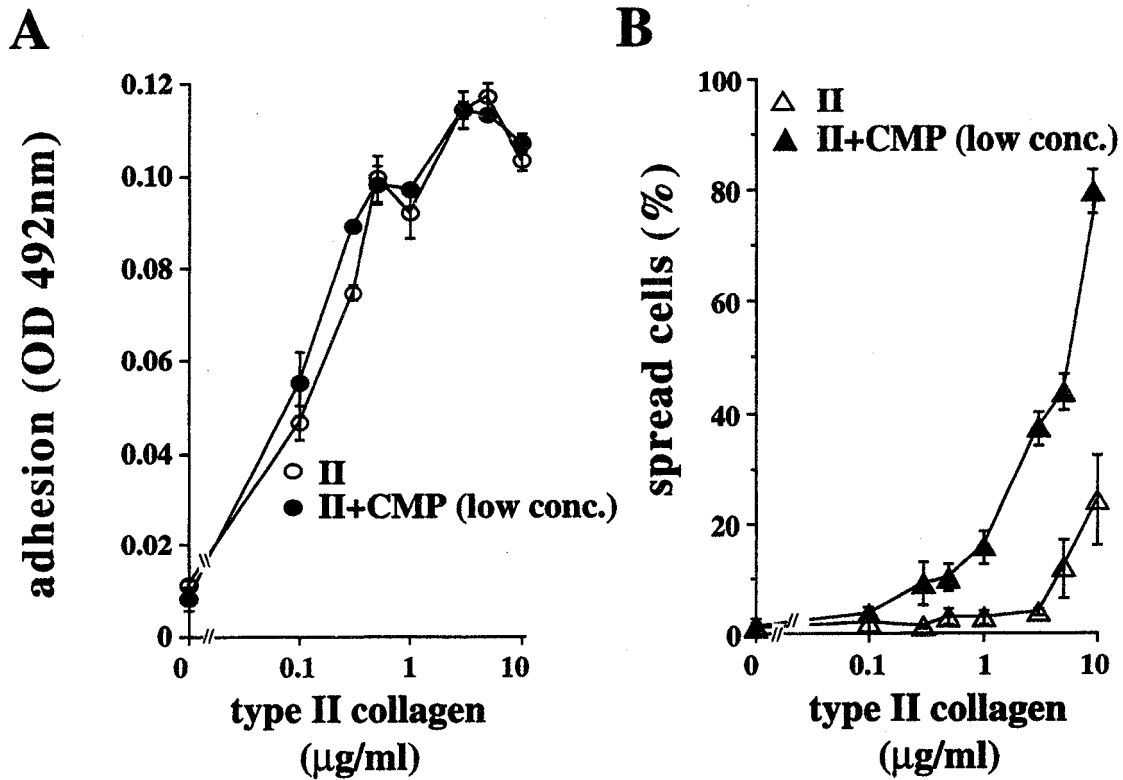
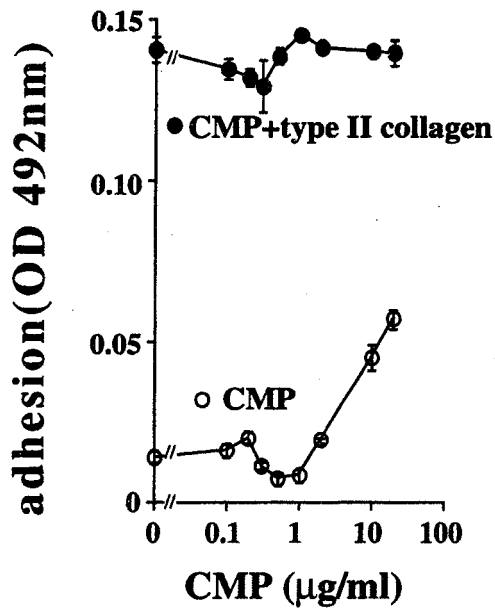
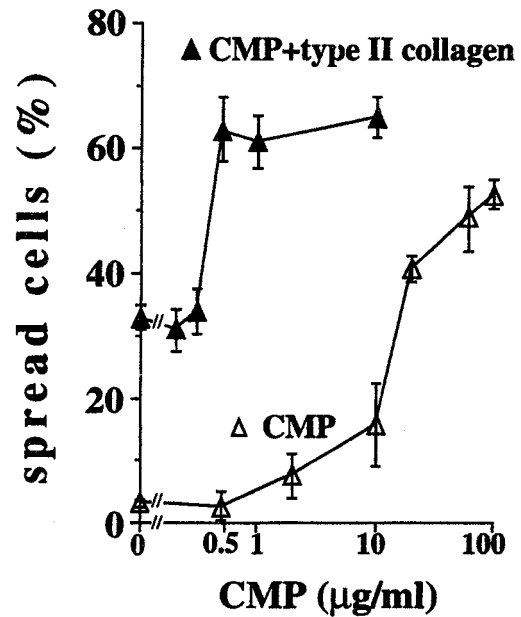


図6 軟骨細胞の接着、伸展に及ぼすCMPとII型コラーゲンの影響

A CMP(0.5 µg/ml)とII型コラーゲン(0-10 µg/ml)をコートした直径6 mmの浮遊培養用マルチウェルプレートにウサギ関節軟骨細胞を 5×10^4 細胞/培養系で播種し1時間後洗浄によって浮遊細胞を除去した後、MTT法にて492nmでの吸光度を測定した。

B CMP(0.5 µg/ml)とII型コラーゲン(0-10 µg/ml)をコートした直径6 mmの培養用マルチウェルプレートにウサギ関節軟骨細胞を 5×10^3 細胞/培養系で播種し1時間後に伸展率を測定した。

C**D**

C CMP(0-20 $\mu\text{g/ml}$)とII型コラーゲン(3 $\mu\text{g/ml}$)をコートした直径6 mm の浮遊培養用マルチウェルプレートにウサギ関節軟骨細胞を 5×10^4 細胞/培養系で播種し1時間後洗浄によって浮遊細胞を除去した後、MTT法にて492nmでの吸光度を測定した。

D CMP(0-100 $\mu\text{g/ml}$)とII型コラーゲン(3 $\mu\text{g/ml}$)をコートした直径6 mm の培養用マルチウェルプレートにウサギ関節軟骨細胞を 5×10^3 細胞/培養系で播種し1時間後に伸展率を測定した。

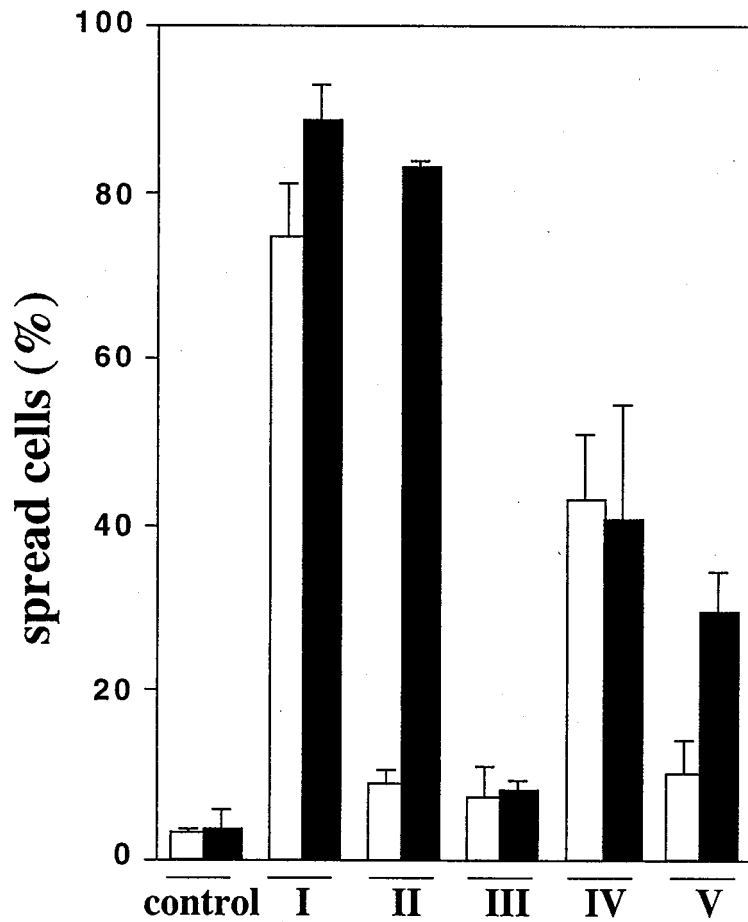


図7 軟骨細胞の伸展に及ぼすCMPと各コラーゲンの影響

CMP(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と各種コラーゲン(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)をコートした直径6 mm の培養用マルチウェルプレートにウサギ関節軟骨細胞を 5×10^3 細胞/培養系で播種し1時間後に伸展率を測定した。(□; コラーゲン、■; コラーゲンと CMP(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の共存)

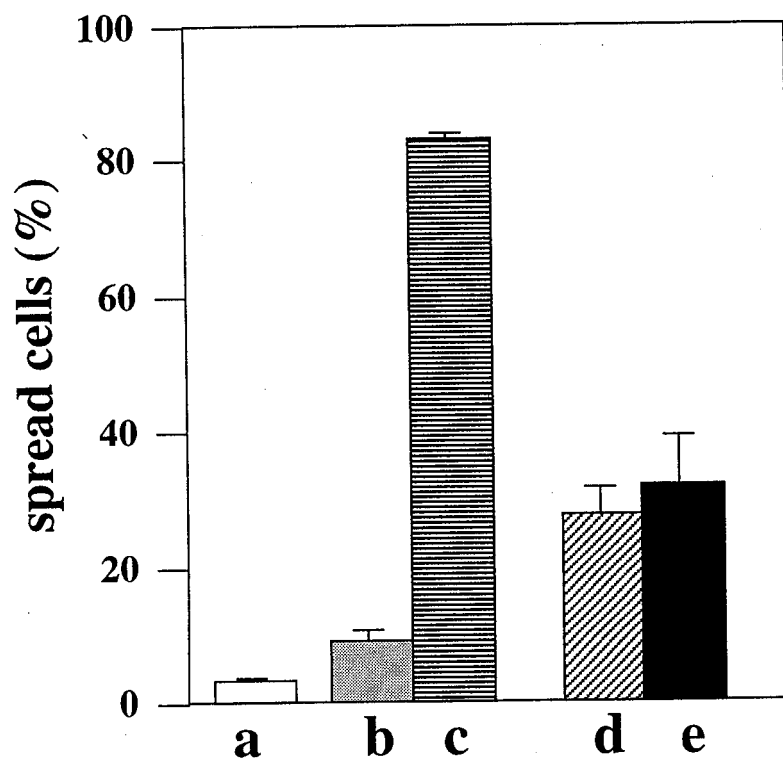


図8 軟骨細胞の伸展に及ぼすCMPとゼラチンの影響

CMP(0.5 µg/ml) とII型コラーゲン(3 µg/ml) あるいは熱変性したII型コラーゲン(3 µg/ml) をコートした直径6 mm の培養用マルチウェルプレートにウサギ関節軟骨細胞を 5×10^3 細胞/培養系で播種し1時間後に伸展率を測定した。(a; コントロール、b; II型コラーゲン(3 µg/ml)、c; CMP(0.5 µg/ml) とII型コラーゲン(3 µg/ml)、d; 熱変性したII型コラーゲン(3 µg/ml)、e; CMP(0.5 µg/ml) と熱変性したII型コラーゲン(3 µg/ml))

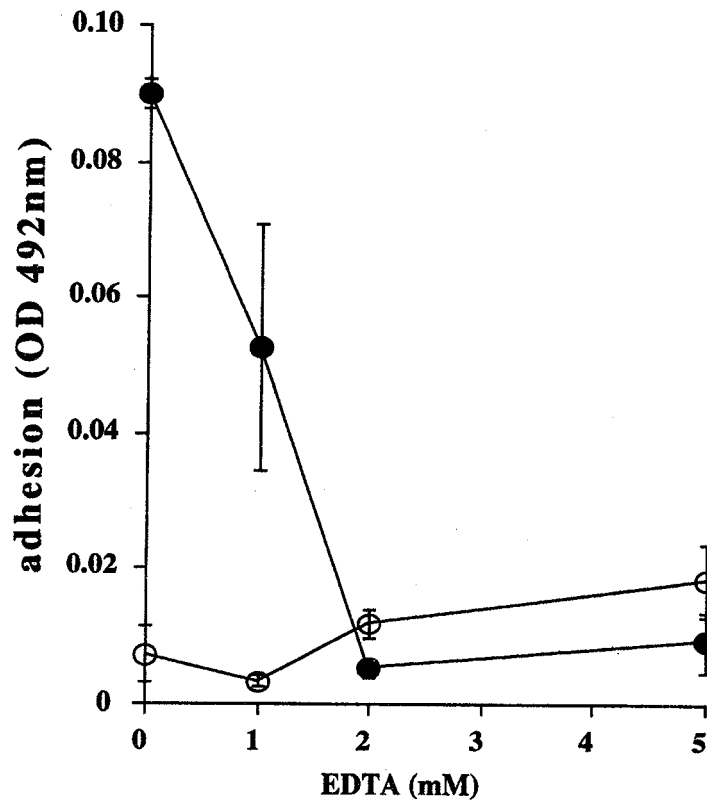


図9 CMPの接着活性に及ぼすEDTAの影響

CMP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) をコートした直径6 mm の浮遊培養用マルチウェルプレートにウサギ関節軟骨細胞を 5×10^4 細胞/培養系で播種した。同時にEDTA(0-5 mM)を添加し、1時間後洗浄によって浮遊細胞を除去した後、MTT法にて492nmでの吸光度を測定した。(○; コントロール、●; CMP)

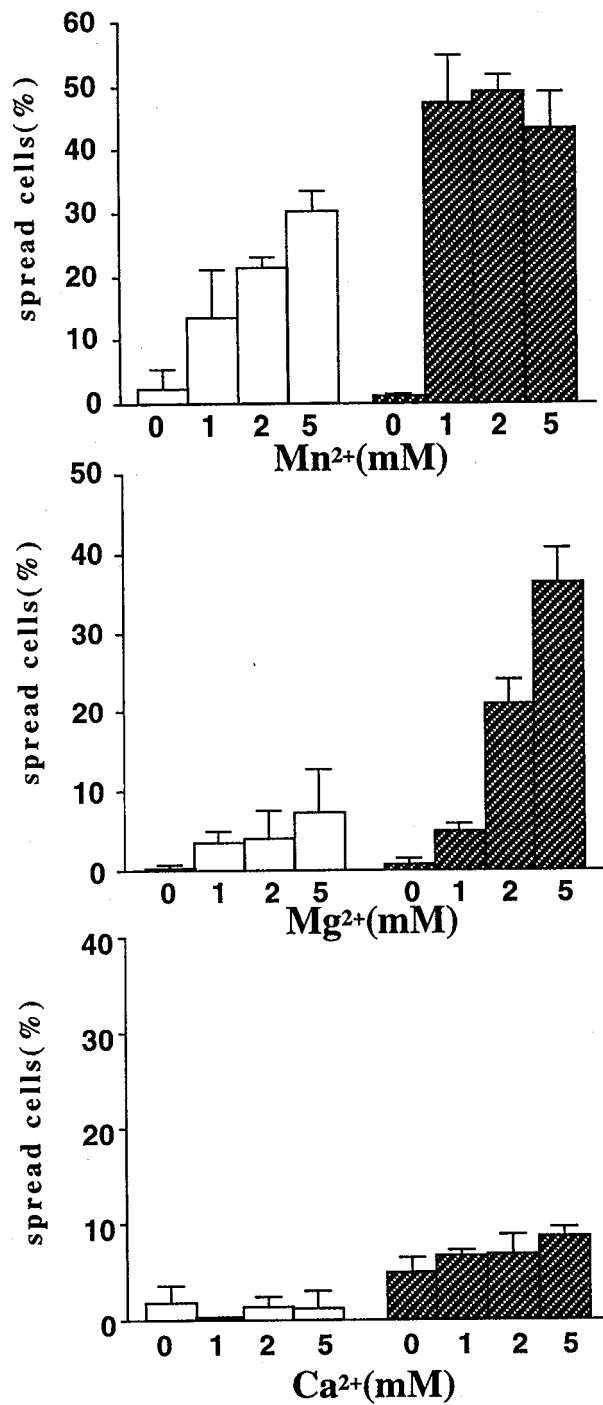


図10 CMPの接着活性に及ぼすMg²⁺とMn²⁺およびCa²⁺の影響

CMP(20 μg/ml) をコートした直径6 mm の培養用マルチウェルプレートに10 mM HEPES-saline(pH7.4) に浮遊した細胞を5×10⁴細胞/培養系で播種した。同時にMg²⁺、Mn²⁺またはCa²⁺(0-5 mM)を添加し、1時間後に伸展率を測定した。

(□; コントロール、■; CMP)

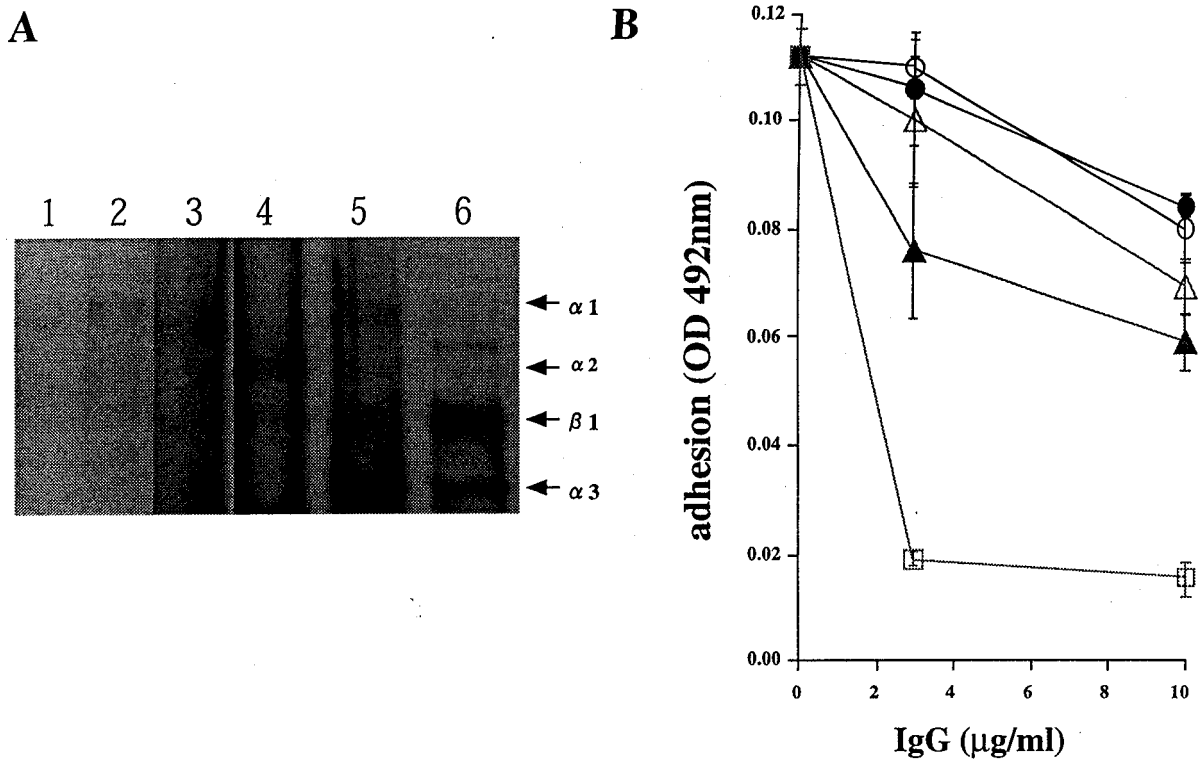
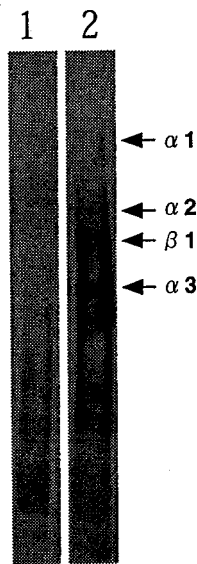


図11 ヒト線維芽細胞(MRC5)におけるインテグリンの発現(A)およびCMPと線維芽細胞の結合に及ぼすインテグリン抗体の影響(B)

A ビオチンラベルした線維芽細胞(MRC5)抽出液を各インテグリン抗体で免疫沈降を行った。サンプルをSDS電気泳動した後PVDF膜にブロッティングし、オートラジオグラフィーで分析した。(1; コントロール血清、2; 抗インテグリン α_1 鎖抗血清、3; コントロールIgG、4; 抗インテグリン α_2 鎖モノクローナル抗体、5; 抗インテグリン α_3 鎖モノクローナル抗体、6; 抗インテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体)

B CMP(20 $\mu\text{g/ml}$)をコートした直径6 mmの培養用マルチウェルプレートにMRC5を 5×10^3 細胞/培養系で播種した。同時にコントロールIgG(3-10 $\mu\text{g/ml}$)または抗インテグリン抗体(3-10 $\mu\text{g/ml}$)を添加し1時間後にMTT法にて492nmでの吸光度を測定した。(○; コントロールIgG、●; 抗インテグリン α_1 鎖モノクローナル抗体、△; 抗インテグリン α_2 鎖モノクローナル抗体、▲; 抗インテグリン α_3 鎖モノクローナル抗体、□; 抗インテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体)

A



B

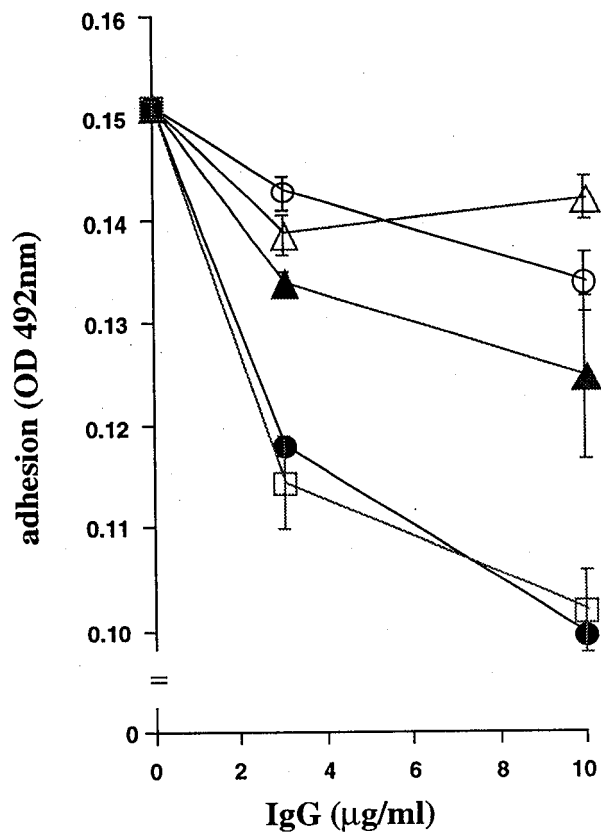


図12 ヒト軟骨細胞におけるインテグリンの発現(A)およびCMPと線維芽細胞の結合に及ぼすインテグリン抗体の影響(B)

A ビオチンラベルしたヒト軟骨細胞抽出液を抗インテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体で免疫沈降を行った。サンプルをSDS電気泳動した後PVDF膜にブロッティングし、オートラジオグラフィーで分析した。(1; コントロールIgG、2; 抗インテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体)

B CMP(20 $\mu\text{g/ml}$)をコートした直径6 mm の培養用マルチウェルプレートにヒト軟骨細胞を 5×10^3 細胞/培養系で播種した。同時にコントロールIgG(3-10 $\mu\text{g/ml}$)または抗インテグリン抗体(3-10 $\mu\text{g/ml}$)を添加し1時間後にMTT法にて492nmでの吸光度を測定した。(○; コントロールIgG、●; 抗インテグリン α_1 鎖モノクローナル抗体、 Δ ; 抗インテグリン α_2 鎖モノクローナル抗体、 \blacktriangle ; 抗インテグリン α_3 鎖モノクローナル抗体、□; 抗インテグリン β_1 鎖モノクローナル抗体)

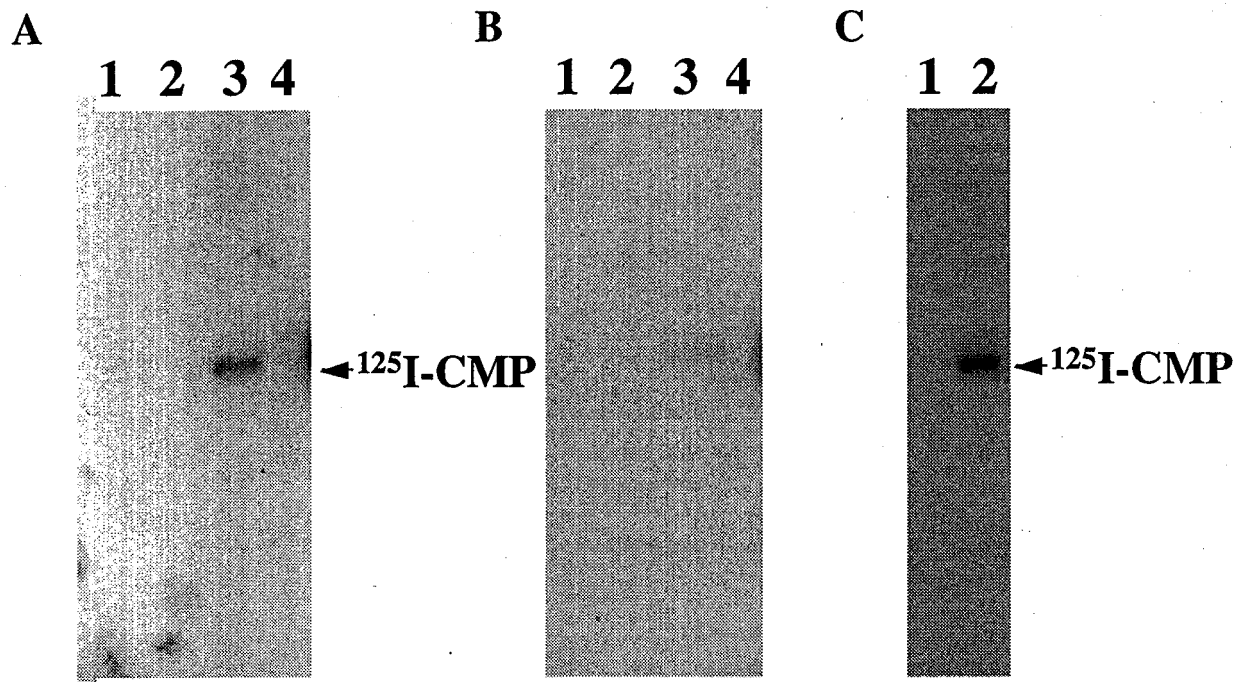


図13 ^{125}I -CMPとインテグリンとの結合

ヒト線維芽細胞(MRC5)抽出液 (A) またはヒト軟骨細胞抽出液 (C) と ^{125}I -CMP (150 ng) を各種インテグリン抗体 (1、2、3、4) で免疫沈降を行い、SDS電気泳動、ゲル乾燥後、オートラジオグラフィーで分析した。コントロール実験として、ヒト線維芽細胞抽出液の代わりに抽出に用いた溶液のみの存在下で実験を行った (B)。A,B (1; コントロール血清、2; 抗I型コラーゲン抗血清、3; 抗インテグリン α_1 鎖抗血清、4; 抗インテグリン α_2 鎖抗血清)、C (1; コントロール血清、2; 抗インテグリン α_1 鎖抗血清)

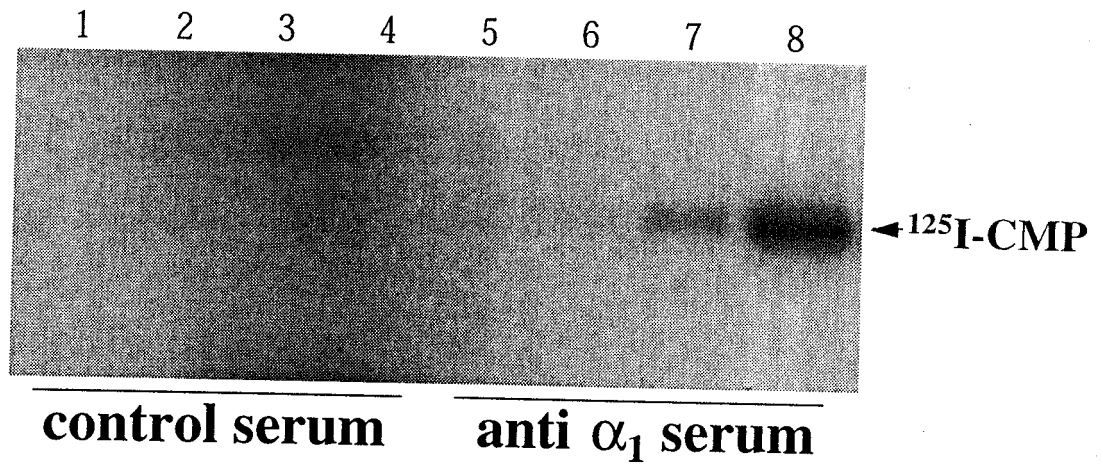


図14 ¹²⁵I-CMPとインテグリンα₁鎖との結合(¹²⁵I-CMPの濃度を変化した場合)
 ヒト線維芽細胞抽出液と¹²⁵I-CMP(1.5-150 ng)をコントロール血清または抗
 インテグリンα₁鎖抗血清で免疫沈降を行い、SDS電気泳動、ゲル乾燥後、オ
 ートラジオグラフィーで分析した。(¹²⁵I-CMP添加量 1,5; (0 μg/ml)、2,6;
 (0.015 μg/ml)、3,7; (0.15 μg/ml)、4,8; (1.5 μg/ml))