

Cartilage Matrix Protein (CMP) の機能と発現調節

沖 村 昭 信

Roles of cartilage matrix protein (CMP) and regulation of its synthesis by chondrocytes

Akinobu Okimura

(平成8年1月17日受付)

緒 言

軟骨は軟骨細胞とこれを取り囲む大量の細胞外基質から構成されていることから、細胞外基質の生合成の調節機構、基質構成成分の相互作用、細胞の接着、移動、増殖および分化に対する基質成分の役割を追求するための実験系として有用である。

一般にコラーゲンと細胞との相互作用は細胞増殖と分化に不可欠である。また、軟骨細胞においてもビタミンCがコラーゲン合成を介してその増殖と分化を促進することからも、両者の相互作用が重要であることが示唆される。軟骨基質の主成分はコラーゲンと軟骨型高分子プロテオグリカン（アグリカン）であるが、他の非コラーゲン蛋白質も軟骨基質の構築と軟骨細胞の機能に不可欠な役割を果たしていることが推察される¹⁾。また、コラーゲン線維に結合している蛋白質（collagen-associated protein）が介在してコラーゲンと細胞とが間接的に結合し、この蛋白質がコラーゲンの生理作用の少なくとも一部を仲介している可能性がある。

コラーゲン線維に結合している蛋白質としては、軟骨基質ではフィブロネクチン、オステオネクチン（SPARC; secreted protein acidic and rich in cysteine）、デコリン（PG-II）があり、他の基質では骨シアロ蛋白質（BSP; bone sialoprotein）、ホスフォホリンなどが知

られている²⁻⁵⁾。Paulsson と Heinegård⁶⁾ が1979年に発見した cartilage matrix protein (CMP) も、軟骨基質においてコラーゲン線維に結合することが最近報告されている⁷⁾。

CMP は3つの同一のサブユニットが集合した分子量 148 kDa の非コラーゲン蛋白質であり、当初はアグリカンと結合する蛋白質として発見された^{6,8)}。しかし、その後の研究で、CMP はアグリカンよりもコラーゲンとより強固に結合することが明らかになった⁷⁾。また、cDNA と遺伝子のクローニングにより、ニワトリ^{9,10)} およびヒト¹¹⁾ CMP の構造は、二つの類似した繰り返し領域（CMP 1, CMP 2）が epidermal growth factor (EGF) 様領域によって連結されていることが明らかにされた。この繰り返し領域間の核酸レベルでの相同性は、ニワトリでは50%であり⁹⁾、EGF 様領域はマウスの EGF precursor と56%の相同性を有する。最近、CMP のサブユニットが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ことが示された^{10,12)}。

CMP の繰り返し領域のアミノ酸配列は type A domain と呼ばれ、von Willebrand factor, 補体系の C2 (第2成分) と B 因子、 β_1 と β_2 インテグリンの α 鎖、VI型コラーゲンにも30-40%相同なアミノ酸配列が存在する¹³⁾。Type A domain を持つこれらの蛋白質は、細胞接着、免疫機構、凝血などに関与している(表1)¹³⁾。

CMP はコラーゲン線維表面へ結合する⁷⁾。また、in vitro で CMP はコラーゲン線維形成を濃度依存的に促進する。コラーゲンと CMP がモル比 5:1 で存在する条件下で、コラーゲン線維が形成されることは電子顕微鏡を用いた研究でも確認された¹⁴⁾。なお、

広島大学歯学部歯科矯正学講座（主任：丹根一夫教授）本論文の要旨は、平成5年10月第66回日本生化学会大会、平成5年10月第35回歯科基礎医学会総会、平成5年12月第41回国際歯科研究学会日本部会（JADR）総会、平成6年12月第42回国際歯科研究学会日本部会（JADR）総会および平成7年9月第37回歯科基礎医学会総会において発表した。

表1 Type A domain を持つ蛋白群

1	免疫系	白血球インテグリン LFA-1 (ICAM-1, ICAM-2)*, Mac-1 (iC3b, Factor X, Fibrinogen), p 150-95 (iC3b), 補体活性系の B 因子 (C3b), 補体 C2 (C4b)
2	凝血系	Von Willebrand factor (Collagen I, III, GPIb, Heparin)
3	細胞外マトリックス	CMP (Collagen II, Proteoglycan), タイプ VI コラーゲン (collagen I, VI)
4	他の接着因子受容体	VLA-1 インテグリン (Collagens), VLA-2 インテグリン (Collagens, Laminin)

* () にこれらの蛋白に結合するリガンド名を記した

CMP のコラーゲン結合部位は二つの類似した繰り返し領域 (CMP 1, CMP 2) の両方に存在することは判明しているが¹⁴⁾, その結合部位は未だ特定されていない。

関節軟骨と椎間板では CMP 含量が非常に少ない。しかし、気管、鼻中隔、耳、骨端、剣状突起の軟骨には CMP が高レベルに存在し、特に気管に最も多く存在していると報告されている¹⁵⁾。気管軟骨の CMP レベルは、出生後20日までは非常に低いが、出生後40-100カ月にかけて著しく増加する^{16,17)}。ヒト胚の *in situ hybridization* の結果では、関節表層を被う軟骨細胞では CMP の発現は休止していることが明らかになっている¹⁸⁾。また、ニワトリ胚の角膜やレンズなど眼球周囲組織にも低レベルの CMP は存在するが、他の組織には全く存在しない¹⁹⁾。

ニワトリの CMP 遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスでの免疫染色の結果では、ニワトリ及び内在性のマウスの CMP はいずれも軟骨増殖層で高度に発現し、肥大層では低レベルであった²⁰⁾。胎生13-18日のマウスの四肢での免疫染色では、II型コラーゲンの発現に続いて同じ部位で CMP の存在が認められたが、関節軟骨では CMP は存在していなかった²¹⁾。また、マウスの肢芽由来の間葉系培養細胞の免疫染色では、II型コラーゲンが培養3日目より出現したのに対して、CMP は培養6日に出現し、培養14日には軟骨結節全体にII型コラーゲンと共に CMP が存在していた²¹⁾。

しかし、従来の研究では、CMP の機能、発現調節および関節疾患での CMP 合成能の有無あるいは変動はほとんど検討されなかった。そこで本研究では、まずウシ肋軟骨より CMP を精製し抗体を作製した。次

に、抗ウシ CMP 抗体を用いて、免疫染色法によりブタ正常肋軟骨での CMP の分布を検討した。また、成長因子、サイトカイン、ホルモンが軟骨細胞培養系での CMP 合成に及ぼす影響について探求した。さらに、CMP と他の細胞外基質成分との結合能および軟骨細胞の接着・伸展に与える CMP の効果を検討した。最後に、ヒト正常関節軟骨と比較して、リウマチ性関節炎 (RA) および変形性関節症 (OA) の軟骨での CMP 合成の変動を免疫染色法により観察した。

材料と方法

I. ウシ CMP の精製と抗ウシ CMP 抗体の作製

1. 軟骨基質線維の分離

ウシ肋軟骨より分離した静止軟骨 (5 g) をメスで細断した (約 0.5×0.5×0.5 mm)。この組織片を、50 ml の 0.5% triton X-100 と蛋白分解酵素阻害剤 (10 μM amidinophenyl methanesulfonyl fluoride, 10 mM N-ethylmaleimide, 0.1 mM pepstatin A) を含む PBS 中で 0°C でポリトロン型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。次に、この懸濁液を遠心してその沈殿画分を PBS に懸濁し、25 ml の 100 U/ml ウシ精巢ヒアルロニダーゼ (Type IV-S, Sigma 社) と 37°C で5時間インキュベートしてプロテオグリカンを消化した。さらに、この懸濁液を遠心してその沈殿画分を 10 ml の超純水に懸濁し、未消化の組織をガラスホモジナイザーで50回上下運動を行い粉碎した。懸濁液を 120 μm ナイロンメッシュに通過させて、大きな組織塊を除いた後、500 g で10分間遠心して沈殿画分の線維様組織を回収した。以上の操作で、細胞成分とプロテオグリカンは除かれ、不溶性のコラーゲン線維様基質 (乾燥重量 0.37 g) が得られた。

2. 60 kDa コラーゲン線維結合蛋白質の精製

線維様組織 (乾燥重量 0.37 g) を前述の3種類の阻害剤に 1 mM EDTA と 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride を加えた蛋白分解酵素阻害剤と 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.8) を含む 4M グアニジン塩酸溶液 (緩衝液 A) 10 ml で溶解して、4°C 下で18時間攪拌した。この溶液を 5000 g で10分間遠心して不溶物質を除いた後、上清を遠心式限外濾過 (セントリプレップ Mr 100 kDa cut, グレースジャパン社) を用いて、100 kDa 以上の蛋白を分離した。次に、同じセントリプレップ上で溶媒を 7M 尿素, 0.1% CHAPS を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) (緩衝液 B) と交換した。この画分を緩衝液 B で平衡化した Mono Q (5×50 mm, Pharmacia Biotech 社) カラムに展開し、まず緩衝液 B (10 ml) で溶出した。次に 0.1M NaCl を含む緩衝液 B (10 ml) で溶出した後、1M NaCl を含

む緩衝液 B (10 ml) で蛋白を溶出した。

60 kDa コラーゲン線維結合蛋白質は 0.1M NaCl 画分に溶出したので、さらにこの 60 kDa コラーゲン線維結合蛋白質を含む蛋白画分を、0.2M NaCl を含む緩衝液 B で平衡化した Superose 12 (10×300 mm, Pharmacia Biotech 社) に展開した。なお、流速は 0.4 ml/分で、溶出液は 0.8 ml 毎に分画した。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびアミノ酸配列の決定

精製した 60 kDa コラーゲン線維結合蛋白質の蛋白画分を、1%メルカプトエタノールを添加した Laemmli の緩衝液で溶解して 100°C で 5 分間煮沸した。これらの試料は、4–20%のポリアクリルアミドゲルの濃度勾配を作製したゲル (第一化学薬品社) 中で、電気泳動にかけた。蛋白質は銀染色 (第一化学薬品社) で染色し、精製の達成を確認した。さらに、Townsin²²⁾ の方法で、蛋白質を電気的に PVDF 膜 (Applied Biosystems 社) に転写した後、クマーシーブプリリアントブルーで染色した。次に、60 kDa の蛋白バンドを切り出して、気相自動タンパクシークエンサー (476A, Applied Biosystems 社) を用いてアミノ末端近傍のアミノ酸配列を決定した。

4. 抗ウシ CMP 抗体

精製した 14 μg のウシ CMP を含む 0.08 ml の PBS を 0.14 ml の RIBI 溶液 (RIBI ImmnoChem Research 社) に混合して、8 週齢の雌 BALB/cAnnNCrj マウスに 2 週間毎に 2 回腹腔内注射した。最後の注射の 1 週間後に採血し、同血清を採取した。

II. ブタ軟骨組織での CMP の免疫組織染色

1. ブタ軟骨組織の免疫組織染色

生後 10 日齢のブタから肋軟骨を切除後、3.7%ホルムアルデヒドにて室温で 24 時間固定してから 12 時間水洗し、固定・パラフィン包埋後 6 μm の厚さの切片を作製し、脱パラフィン処理を施した。切片はまず 0.3% H₂O₂ および 0.1% NaN₃ を含むメタノールにて内在性のペルオキシダーゼを非活性化し、以後ペクスタイン免疫組織化学染色システム (ABC-PO: mouse-IgG kit, Vector Lab. 社) を用いて、以下の通り CMP の免疫染色を行った。

まず、ウシ精巢ヒアルロニダーゼ 250 U/ml で 37°C 下で 10 分間処置して、さらに 0.15% 正常ウマ血清とインキュベートすることにより非特異的結合を阻止した。その後、100 倍希釈した抗ウシ CMP 血清あるいは非免疫動物のコントロール血清と 30 分間インキュベートし、PBS で洗浄した。続いて、マウス IgG に対するビオチン標識ウマ IgG (200 倍希釈) と 30 分間

インキュベートし、PBS で洗浄した。次に、標準試薬と 30 分間インキュベートし、PBS で洗浄後、DAB 基質 (ペクスタイン DAB 基質キット, Vector Lab. 社) と 2 分間インキュベートし、5 分間水洗した。なお、ヘマトキシリンにて対比染色も行った。

2. ブタ軟骨組織の蛍光免疫染色

生後 10 日齢のブタから肋軟骨を切除後、3.7%ホルムアルデヒドにて室温で 24 時間固定してから 12 時間水洗し、脱水後通常通りパラフィン包埋した。厚さ 6 μm の切片を作製し、脱パラフィン処理後、ウシ精巢ヒアルロニダーゼ (250 U/ml) と 37°C 下で 10 分間インキュベートした。次に、4%スキムミルク (雪印乳業) を含む PBS で 30 分間室温でブロッキングした後、PBS で洗浄し、さらに抗ウシ CMP 抗体と室温で 30 分間インキュベートした。次いで 0.05% Tween 20 を含む PBS で洗浄後、500 倍希釈した FITC-conjugated goat IgG fraction to anti-mouse (Cappel 社) と室温で遮光して 30 分間インキュベートした。0.05% Tween 20 を含む PBS で洗浄後封入し、直ちに、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM410, Carl Zeiss 社) を用いて観察した。用いた封入剤は、グリセロール、1%パラフェニレンジアミン (和光純薬社) を含む PBS、0.5M Na₂CO₃/0.5M NaHCO₃ 緩衝液 (pH 9.0)、PBS の混合液 (5:1:1:3, V/V) である。

III. CMP の発現調節因子の検討

1. ブタ軟骨細胞の培養

生後 10 日齢のブタの肋軟骨静止部あるいは関節表層部軟骨をメスで細断 (約 0.3×0.3×0.3 mm) した。これを Shimomura²³⁾, Kato²⁴⁾ の方法に準じて、0.1% EDTA を含む 0.1% トリプシン (Difco 社) と 1 時間インキュベートした。続いて 0.03% crude bacterial コラゲナーゼ (type I, Sigma 社) と 37°C で 2 時間インキュベートした。その後、120 μm ナイロンフィルターを通過した細胞を回収した。直径 6 mm の培養用マルチウェルプレート (96 マルチウェルプレート, Corning 社) に 10 μg/ml の I 型コラーゲン (高研社) を含む 0.1M NaHCO₃ 溶液でコーティング後、分散させた細胞を 2×10⁵ 細胞/培養系の密度で播種し、37°C、5% CO₂ 気相下にて 10% ウシ胎仔血清 (三菱化成社)、50 U/ml のペニシリン G カリウム (明治製薬社)、60 μg/ml のカナマイシン (明治製薬社)、250 ng/ml の Amphotericin (ICN Biochemocal 社) を含む α-MEM 培地 (三光純薬社) (培養液 A) 存在下で培養した。なお、特に記述しない限り 25 μg/ml のビタミン C (和光純薬社) を 2 日毎に添加した。

2. ブタ軟骨細胞培養系からの CMP の抽出

ブタ軟骨細胞培養系での CMP 発現量を検討するために、直径 6 mm の培養用マルチウェルプレート (96 マルチウェルプレート) において 10% ウシ胎仔血清と 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のビタミン C を含む α -MEM 存在下で培養した。コンフルエント後 12 日まで培養した後に細胞一基質成分を、50 μl の 4M グアニジニン溶液、Laemmli 緩衝液、EDTA 溶液、あるいは先ず EDTA 溶液にて 18 時間 4°C 下で抽出後さらに Laemmli 緩衝液で、各々 18 時間で抽出した。なお、4M グアニジニン溶液は、4M グアニジニン塩酸、10 μM amidinophenyl methanesulfonyl fluoride, 2 mM N-ethylmaleimide, 0.1 mM pepstatin A, 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.8) を含有する。EDTA 溶液は、10 mM EDTA, 0.25M NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 10 μM amidinophenyl methanesulfonyl fluoride, 2 mM N-ethylmaleimide, 0.1 mM pepstatin A をそれぞれ含む。

3. ブタ軟骨細胞培養系で合成された CMP のイムノプロット

細胞一基質層の抽出物に含まれる蛋白質を、1%メルカプトエタノール存在下又は非存在下で電気泳動により分離し、PVDF 膜 (Immobilon, Millipore 社) に転写した。この PVDF 膜を 4% スキムミルクを含む PBS で 2.5 時間ブロッキングして、300 倍希釈の抗 CMP 血清を含む PBS と 4°C 下で 18 時間インキュベートした。さらに、 ^{125}I -標識抗マウス IgG F(ab')₂ 断片 (アマシャム社) と 2.5 時間インキュベートし、洗浄後、オートラジオグラフィにより反応バンドを検出した。次に、バイオ・イメージングアナライザー (BAS 2000, 富士写真フィルム社) を用いて、この反応バンドの同一面積当たりの放射線量 (radioactivity) あるいは、background を除いた単位面積当たりの放射線量 ($|\text{radioactivity-background}|/\text{mm}^2$) を計測した。

4. ブタ軟骨細胞培養系への成長因子の添加条件

ブタの永久静止軟骨と関節軟骨細胞は、直径 6 mm の培養用マルチウェルプレート (96 マルチウェルプレート) 上で培養液 A にて培養した。細胞がコンフルエントまで増殖した後、ビタミン C (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、コンカナバリン A (Con A) (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、bFGF (1 ng/ml)、TGF- β (3 ng/ml)、IL-1 β (1 ng/ml)、PTH (10^{-7} M)、レチノイン酸 (1 μM) を 3 日毎に添加した。その後 12 日目の細胞一基質層を Laemmli 緩衝液で抽出し、非還元条件下でイムノプロットして CMP を検出した。あるいは、細胞一基質層を 10 mM EDTA 溶液抽出後さらに Laemmli 緩衝液で抽出して、同様に実験を行った。

5. ヒト軟骨細胞培養系での CMP 合成

ヒト胎児の成長板より、上記の方法で軟骨細胞を分離した。なお、この成長板は中華人民共和国白求恩医科大学の協力を得て自然流産した胎児から摘出されたもので、これより分離された細胞を同大学の好意により提供された。直径 3.5 cm の培養用マルチウェルプレート (Corning 社) に 5 $\mu\text{g}/\text{培養系}$ の I 型コラーゲンをコーティング後、分離した細胞を 5×10^5 細胞/培養系の密度で播種し、培養液 A 存在下で培養した。コンフルエント後 2 日目から培地交換時の 2 日毎に 1 mM のジブチリル cAMP を 3 回添加し、培養液を PBS で 2-3 回洗浄後、細胞一基質層の CMP を 1 ml の Laemmli 緩衝液で抽出した。このサンプル (5 μl) を非還元条件下でイムノプロットした。

IV. CMP と基質高分子との結合能の検討

1. ^{125}I -CMP の作製

精製した CMP をラクトペルオキシダーゼ法によって ^{125}I でラベルした²⁵⁾。この過程で三量体の CMP は 95% 以上単量体となった。

2. 細胞外基質タンパクによりコーティングした ELISA プレートの作製

同一濃度 (0.01 mg/ml) の I, II, IV, V 型コラーゲン、フィブロネクチン、アグリカンコア蛋白、ウシ血清アルブミンを含む 0.05 ml の 0.1M NaHCO₃ 溶液を直径 6 mm の ELISA プレート (住友ベークライト社) に加えて、37°C 下で 3 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、0.1% ウシ血清アルブミンを添加した 0.1 ml の PBS と 37°C で 2 時間インキュベートした。その後、同プレートを PBS で 5 回洗浄した。

3. 細胞外基質タンパクと ^{125}I -CMP の結合

^{125}I -CMP (1200 cpm/well) と 0.1% CHAPS を含む 0.1 ml の PBS を各種の蛋白質でコーティングした ELISA プレートの各ウェルに添加して、37°C で 3 時間インキュベートした。その後プレートを PBS で 7 回洗浄し、さらに 0.1 ml の 4M グアニジニン塩酸を加えて 15 分間インキュベートした。この溶液中の放射能をガンマーカウンター (auto well gamma system: ARC-600, Aloka 社) で測定した。

V. 軟骨細胞の伸展に対する CMP の効果の検討

1. ウサギ軟骨細胞の培養

生後 4 週齢の雄性日本白色ウサギの肋軟骨静止部あるいは関節表層部軟骨をメスで細断 (約 0.3 × 0.3 × 0.3 mm) した。これを Shimomura ら²³⁾、Kato ら²⁴⁾の方法に準じて、0.1% EDTA を含む 0.1% トリプシンと 1 時間インキュベートした。続いて 0.03% crude

bacterial コラゲナーゼと 37°C 下で 3 時間インキュベートした。その後、120 μm ナイロンフィルターを通過した細胞を回収した。直径 10 cm の培養用プラスチックプレート (Corning 社) に 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の I 型コラーゲンを含む 5 ml の 0.1M NaHCO_3 溶液でコーティング後、分散させた細胞を 5×10^5 細胞/培養系の密度で播種し、37°C、5% CO_2 気相下にて培養液 A 存在下で培養した。なお、特に記述しない限り 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のビタミン C を 2 日毎に添加した。

2. ウサギ軟骨細胞の継代

ウサギ関節軟骨細胞を直径 35 mm の培養用マルチウェルプレート (6 マルチウェルプレート, Corning 社) に播種し、培養液 A 存在下で培養した。70%コンフルエントまで増殖した後、軟骨細胞を 0.1% トリプシンと 0.02% EDTA を含む PBS と 37°C 下で 5-10 分間インキュベートした。

3. CMP とコラーゲンのコーティングと軟骨細胞の伸展率の算出

直径 6 mm の培養用マルチウェルプレート (96 マルチウェルプレート) または直径 11 mm の培養用マルチウェルプレート (48 マルチウェルプレート, Corning 社) に、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の I 型コラーゲンまたは 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CMP を含む 50 μl の 0.1M NaHCO_3 溶液を入れて、4°C 下で 18 時間放置した後、PBS で 5 回洗浄した。

軟骨細胞を無血清の α -MEM 培地に浮遊させて、コラーゲンまたは CMP でコーティングした 96 マルチウェルプレートまたは 48 マルチウェルプレートに 5×10^3 細胞/培養系の割合で播種した。接着・伸展した細胞を経時的に位相差顕微鏡で観察し、一定視野を写真に撮り、全細胞数に対する伸展した細胞数の割合 (%) を求めた。三つの培養系における値の平均を伸展率として評価した。

VI. ヒト関節疾患での CMP 合成量の検討

1. モネンシン処置標本

ヒト関節軟骨は、防衛医科大学において癌手術の際に分離された足の膝関節あるいは大腿骨骨折の手術で分離された大腿骨関節軟骨から摘出されたもので、これより分離された細胞片を RA, OA, 正常軟骨に鑑別して同大学の好意により提供された。RA および OA に罹患したヒト膝関節または股関節からの軟骨片 (約 2 mm 厚, それぞれ 5 および 13 症例) あるいは組織学的に正常な軟骨の軟骨片 (約 2 mm 厚, 6 症例) を、2 μM のモネンシン (Sigma 社) と 10% ウシ胎仔血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium 存在下で 3 時間インキュベートした。この組織片を PLP

(periodate-lysine-paraformaldehyde) 固定液と 4°C で 24 時間インキュベートした後、パラフィンワックスに包埋した。切片はまず 0.3% H_2O_2 および 0.1% NaN_3 を含むメタノールにて内在性のペルオキシダーゼを非活性化し、さらに 10% 正常ウマ血清とインキュベートすることにより非特異的結合を阻止した後、500 倍希釈した抗ウシ CMP 血清あるいは非免疫動物のコントロール血清と 1 時間インキュベートした。これらの切片は、PBS で洗浄した後、マウス IgG に対するビオチン化ウマ IgG (200 倍希釈, Vector Lab. 社) と 30 分間インキュベートした。なお、ヘマトキシリン・エオジンにて対比染色を行った。

2. モネンシン未処置標本

RA および OA のヒト膝関節または股関節からの軟骨 (それぞれ 8 および 12 症例) を上記の通り採取後、通法通り 3.7% ホルムアルデヒド固定して切片を作製した。以下の手順は、モネンシン処置標本と同様に行った。

結 果

I. ウシ CMP の精製と抗ウシ CMP 抗体の作製

1. 軟骨基質線維におけるコラーゲンと 60 kDa コラーゲン結合蛋白質の局在

ウシ胎仔の静止軟骨片をヒアルロニダーゼ消化によりプロテオグリカンを除き、かつ 0.5% triton X-100 存在下でホモジナイズすることにより、細胞成分と非線維性基質を除去して、コラーゲン線維様組織を得た (図 1)。得られたコラーゲン線維様組織には II 型コ

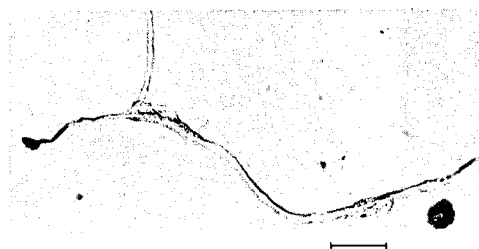


図 1 コラーゲン線維様組織。

ウシ胎仔の静止軟骨片から得たコラーゲン線維様組織の位相差顕微鏡像を示す。(—: 4 μm)

ラーゲンと 60 kDa (還元条件下) 蛋白質が高濃度に存在していた (図 2B)。

2. ウシ CMP の精製とアミノ末端のアミノ酸配列の決定

ウシ軟骨から分離したコラーゲン線維様組織 (乾燥重量 0.37 g) から蛋白質を 4M グアニジン塩酸で抽出して、限外濾過によりコラーゲンと CMP を含む 100

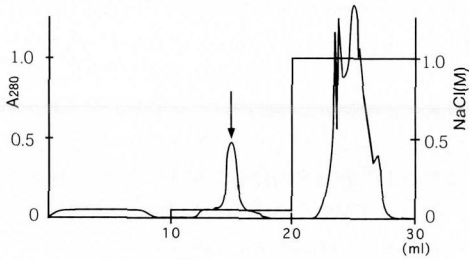
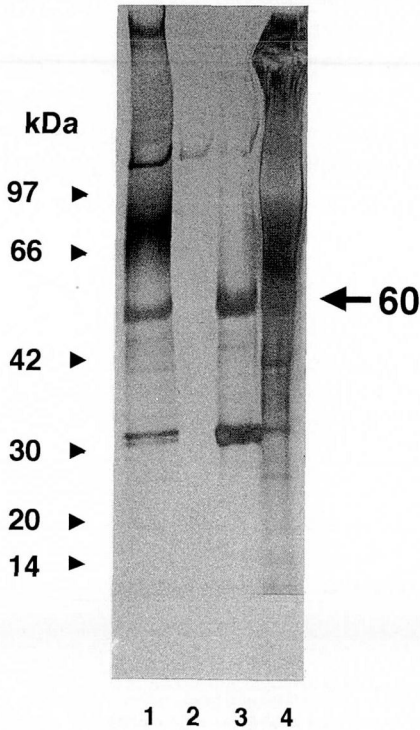


図2 Mono Q を用いた CMP のイオン交換クロマトグラフィー.

A イオン交換クロマトグラフィーによる溶出パターン

7M 尿素, 0.1% CHAPS を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) (緩衝液 B) に可溶化しているコラーゲン線維様組織抽出画分を, Mono Q カラムに展開した. 緩衝液 B で溶出させた後, NaCl の濃度を 0.1, 1.0M と段階的に上げて結合画分を溶出させた.

extract NaCl(M)
0 0.1 1.0



B 各溶出画分の電気泳動パターン.

各溶出画分を還元条件化で電気泳動し, 銀染色した. 各レーンは左より, コラーゲン線維様組織抽出画分, NaCl の濃度 0, 0.1, 1.0M の各溶出画分を示す.

kDa 以上の高分子を分離した. 次に, Mono Q クロマトグラフィーで, 60 kDa 蛋白質 (CMP) は 0.1M NaCl 画分に溶出した (図 2B). 蛋白質の溶出パターンを図 2A に示す. 0.1M NaCl 画分を Superose 12 に展開すると画分 12 に精製標品 (62 μg) が得られた (図 3).

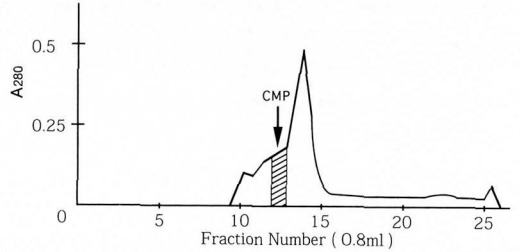
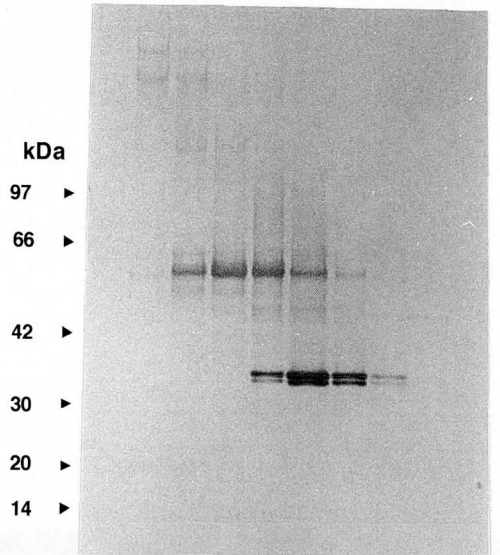


図3 Superose 12 を用いた CMP のゲル濾過クロマトグラフィー.

A ゲル濾過クロマトグラフィーによる溶出パターン

イオン交換クロマトグラフィーでの NaCl 濃度 0.1M の画分を, 0.2M NaCl を含む緩衝液 B で平衡化した Superose 12 に展開した.

Fraction 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



B 各溶出画分の電気泳動パターン

各溶出画分を還元条件化で電気泳動して, 銀染色した.

次に, 気相自動タンパクシーケンサーを用いて 60 kDa 蛋白質のアミノ末端の近傍のアミノ酸配列を決定した (図 4). その結果, 60 kDa 蛋白質はヒトお

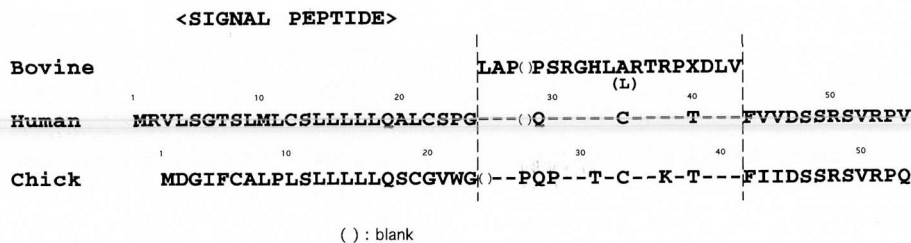


図4 CMPのアミノ末端のアミノ酸配列の比較.

気相自動タンパクシーケンサーを用いて 60 kDa 蛋白質のアミノ末端の近傍のアミノ酸配列を決定した. その結果, 60 kDa 蛋白質はヒトおよびニワトリの CMP と高い相同性を示し, ウシの CMP であることが判明した.

よびニワトリの CMP と高い相同性を示し, ウシの CMP であることが判明した. 電気泳動においては, 精製したウシ CMP は還元条件では 60 kDa, 非還元条件では 215 kDa の位置に移動した (図5). この電気泳動の泳動パターンもヒトおよびニワトリの CMP と一致した. なお, 従来の研究で 215 kDa 付近に泳動されるバンドは, 54 kDa の CMP が三量体を形成したものであり, 実際の分子量は 148 kDa であることが判明している⁸⁾.

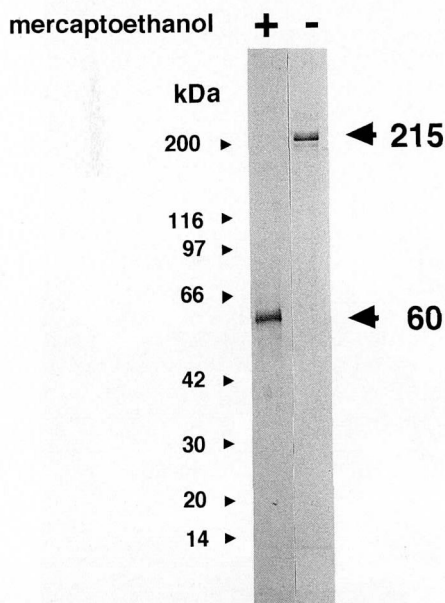


図5 精製した CMP の電気泳動パターン (銀染色).
精製したウシ CMP は還元条件では 60 kDa, 非還元条件では 215 kDa であった.

3. 抗ウシ CMP 抗体の特異性

抗ウシ CMP 抗体は, 精製した CMP を還元条件下でも非還元条件下でも認識した (図6). ウシ永久静

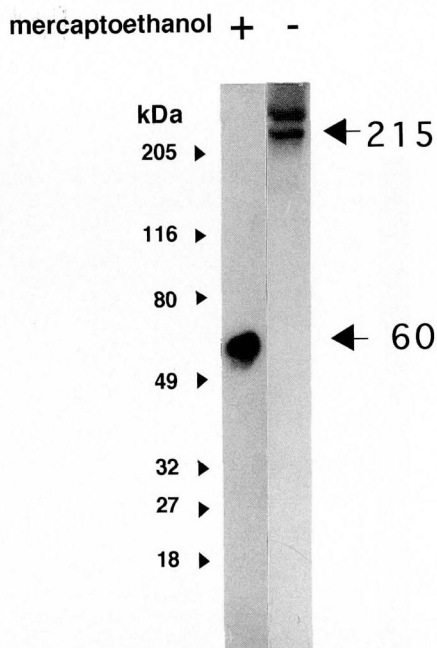


図6 ウシ肋軟骨静止部の CMP のイムノブロット.
ウシ肋軟骨静止部の 4M グアニジン抽出物を電気泳動で分離して, イムノブロットを行った. 抗ウシの CMP 抗体は, 還元条件と非還元条件とでそれぞれ 60 kDa の単量体及び 215 kDa の三量体の CMP を特異的に認識した.

止肋軟骨の 4M グアニジン塩酸抽出物を電気泳動で分離して, イムノブロットを行うと, この抗体は還元条件と非還元条件とでそれぞれ単量体及び三量体の CMP のみと特異的に反応した (図6). しかも, この抗体はブタおよびヒト CMP とも特異的に反応した (データ示さず).

II. ブタ軟骨組織での CMP の免疫組織染色

新鮮な軟骨を入手することができるブタの肋軟骨を

用いて、CMP の分布を免疫組織染色法により検討した。CMP は成長板の細胞周囲に濃く存在し、また細胞外マトリックスに網目状に存在していた。一方、静止層では、成長板に比較して、細胞外マトリックスでの CMP レベルは低く、細胞内部または外周においてのみ検出された（データ示さず）。

ブタの肋軟骨成長板における CMP の分布状態をより詳細に明らかにするために、蛍光標識に FITC を用いて、CMP の免疫組織学的分布状態を検討した。増殖層では軟骨細胞内部または周囲に CMP が存在し、肥大層では基質に広く分布していた（図7）。なお、肋軟骨の静止層においても増殖層とほぼ同様の結果が示された（データ示さず）。

Ⅲ. CMP 発現の調節因子についての検討

1. 軟骨細胞培養系の細胞-基質層からの CMP の抽出

まず、細胞-基質層から CMP を抽出する方法を検討した。4M グアニジニン塩酸溶液、Laemmli 緩衝液、10 mM EDTA 溶液で CMP を抽出した。さらに、10 mM EDTA 溶液抽出後 Laemmli 緩衝液で CMP を抽出した。各条件で抽出した蛋白質を電気泳動で分離し、さらに抗 CMP 抗体を用いたイムノブロットを行った。その後、CMP と結合した ^{125}I -二次抗体の放射能を計測した（図8）。

Laemmli 緩衝液抽出では、非還元条件にもかかわらず CMP の大部分が三量体から単量体に変化した。しかし、他の溶液ではほとんど三量体のままで CMP が

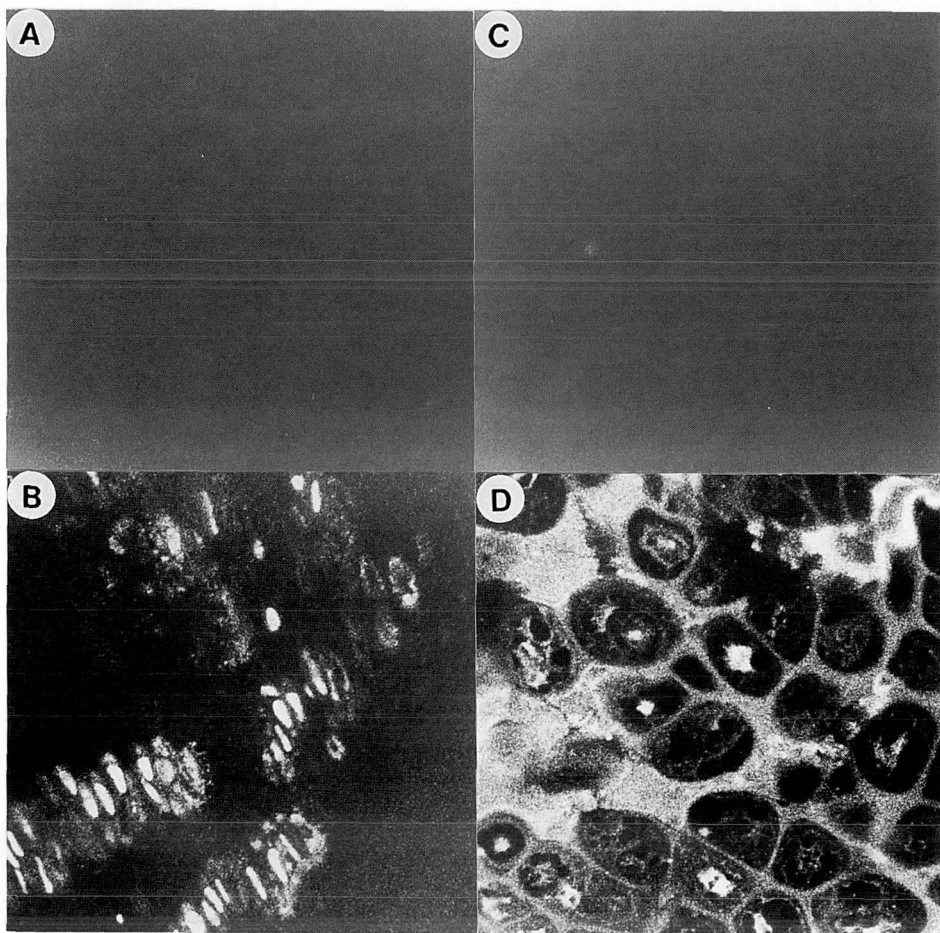


図7 ブタ肋軟骨成長板での免疫蛍光染色.

- A : 増殖層 (コントロール血清)
- B : 増殖層 (抗 CMP 抗体)
- C : 肥大層 (コントロール血清)
- D : 肥大層 (抗 CMP 抗体)

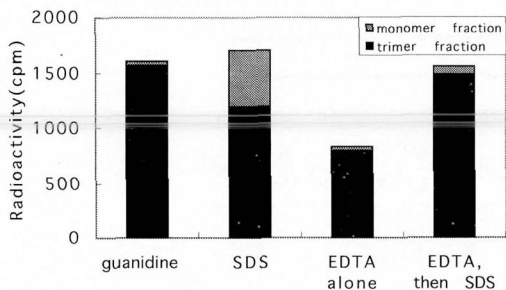


図8 軟骨細胞培養系の細胞基質層からのCMP抽出量の比較。

ブタ静止細胞培養系の細胞基質層から、以下に述べる溶液を用いてCMPを抽出した。各抽出液中のCMP量を、抗ウシのCMP抗体を用いたイムノブロットを行い、CMPと結合した¹²⁵I-二次抗体のradioactivityを計測した。左より、4M グアニジニン塩酸溶液、Laemmli (SDS) 溶液、10 mM EDTA 溶液、10 mM EDTA 溶液抽出後 Laemmli (SDS) 溶液で各々CMPを抽出した場合のradioactivityを示す。また、三量体は黒色で、単量体は灰色で示す。

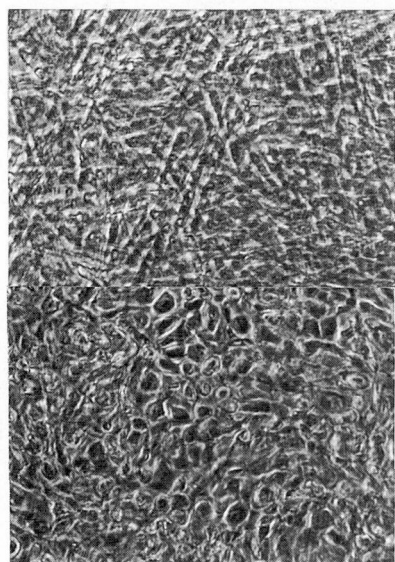


図9 ジブチリル cAMP によるヒト胎児成長板軟骨細胞の形態変化。

ヒト胎児成長板軟骨細胞の培養系(-)では、軟骨細胞は線維芽細胞様になり容易に脱分化した。一方、ジブチリル cAMP 添加群(+)では、細胞形態が球形となり分化が進行した。

可溶化できた。EDTA 溶液のみでは50%しかCMPは回収できなかったが、EDTA 溶液抽出後さらにLaemmli 緩衝液にて抽出するとほとんど100%回収で

きると共に三量体で可溶化できた。すなわち、EDTA が三量体を維持するように作用した。

4M グアニジニン塩酸溶液での抽出では電気泳動の前に透析が必要のため、以後の実験では Laemmli 緩衝液単独、又は 10mM EDTA 溶液抽出後さらに Laemmli 緩衝液を用いて、細胞-基質層から CMP を抽出した。

2. ヒト胎児成長板軟骨細胞での CMP 合成に及ぼすジブチリル cAMP の影響

ヒト胎児成長板軟骨細胞の培養系で、軟骨細胞は線維芽細胞様になり容易に脱分化したが、ジブチリル cAMP 添加群では、細胞形態が球形となり分化が進行した(図9)。次に、これらの細胞-基質層を Laemmli 緩衝液で抽出し、非還元条件でイムノブロットした。コントロールでは CMP は発現していなかった。しかし、ジブチリル cAMP 添加群では 215 kDa の三量体と 60 kDa の単量体の CMP が出現した(図10)。

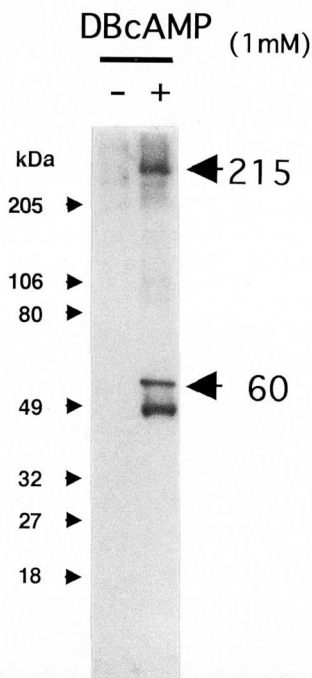


図10 ヒト胎児成長板軟骨細胞での CMP 合成に及ぼすジブチリル cAMP の影響。

ヒト胎児成長板軟骨細胞において、細胞基質層を Laemmli (SDS) 溶液で抽出し、非還元条件でイムノブロットした。コントロール(-)では CMP は発現していなかった。しかし、ジブチリル cAMP 添加群(+)では 215 kDa の三量体と 60 kDa の単量体の CMP が出現した。

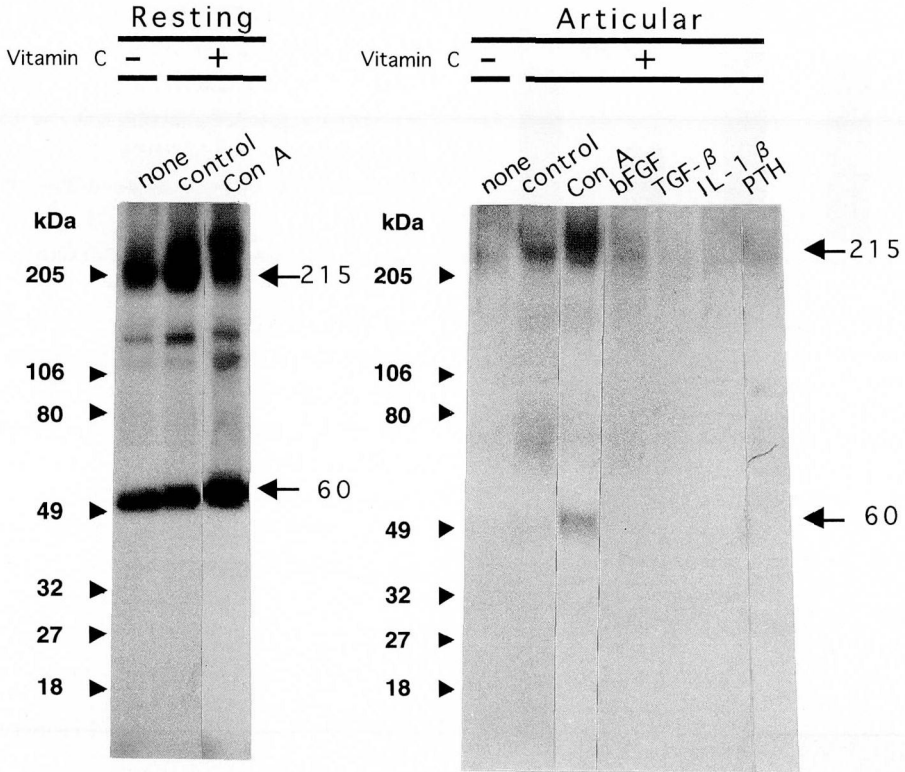


図11 ブタの静止軟骨及び関節軟骨細胞培養系における、CMP レベルに及ぼす成長因子、ビタミンおよびホルモンの影響。

ブタの静止軟骨と関節軟骨細胞をコンフルエントから0-12日間培養し、12日目の細胞基質層のCMPをLaemmli (SDS) 溶液にて抽出し、非還元条件でイムノブロットを行った。なお、培養液Aを用いて培養し、コンフルエントから3日毎にビタミンC (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、コンカナバリンA (Con A) (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、bFGF (1 ng/ml)、TGF- β (3 ng/ml)、IL-1 β (1 ng/ml)、PTH (10⁻⁷ M) を添加した。

3. ブタの永久静止軟骨及び関節軟骨細胞培養系における CMP 合成に及ぼす成長因子、ビタミン、ホルモンの影響

ブタの永久静止軟骨と関節軟骨細胞をコンフルエントから0-12日間培養し、交換した培地と細胞-基質層のCMPをイムノブロット法により検出した (図11)。

静止軟骨細胞の基質層からは、関節軟骨細胞よりも高レベルのCMPが215 kDaの三量体と60 kDaの単量体として抽出された。両細胞培養系で、ビタミンCとCon Aは細胞層のCMPレベルを増加させた。しかし、TGF- β 、PTH、bFGF、IL-1 β は、CMPレベルを増加させなかった。また、添加前および12日後の細胞-基質層では60 kDaおよび215 kDaのCMPが抽出された。この培養期間中にCMP量は約5倍に増加した (図12A)。一方、コンフルエント後0、3、6、9、12日目の培養液ではCMPが検出されなかった (データ示さず)。

ブタの永久静止軟骨細胞培養系において、Con A添加後の経時的なCMPレベルの変化をイムノブロット法により検討した。Con A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 添加後6日目よりCMPレベルは上昇した (図12A)。その効果は0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で発現して、濃度依存的に増大した (図12B)。

一方、レチノイン酸 (1 μM) を添加すると、3日目にはCMPレベルは減少した (図13)。なお、レチノイン酸 (0.1 μM) を12日間添加するとCMPはほぼ完全に消失した (データ示さず)。

TGF- β (3 ng/ml) を添加すると、CMPレベルは3日目から対照よりも減少した (図14A)。また、TGF- β は10 ng/mlまで濃度依存的にCMP量を減少させた (図14B)。一方、BMP-2はTGF- β と異なり、0.1-10 ng/mlの全濃度範囲でCMP量を増加させた (図15)。

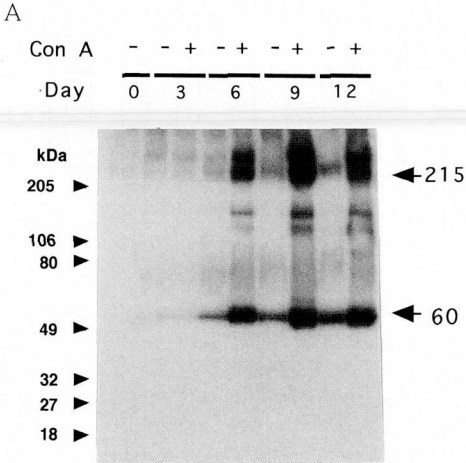
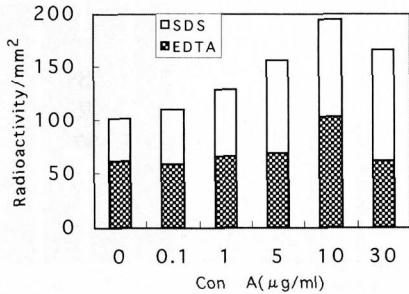


図12 ブタ静止軟骨細胞における CMP レベルに及ぼす Con A の影響.

A CMP レベルの経時的変動

ブタの静止軟骨をコンフルエントから 0-12 日間培養液 A を用いて培養し、コンフルエントから 3 日毎に Con A (5 μg/ml) を添加した。3 日毎に細胞基質層の CMP を Laemmli (SDS) 溶液にて抽出し、非還元条件でイムノブロットを行った。



B CMP レベルに及ぼす各種の濃度の Con A の影響.

上記と同様に培養し、0, 0.1, 1.5, 10, 30 μg/ml の Con A を添加した。12 日目の細胞基質層より CMP を先ず EDTA 溶液で抽出し、引き続き Laemmli (SDS) 溶液にて抽出した。非還元条件のイムノブロット法で各々の CMP 量を検出して、background を除いた単位面積当たりの放射線量 ($\frac{\text{radioactivity} - \text{background}}{\text{mm}^2}$) を計測した。EDTA 抽出の CMP 量を灰色、Laemmli (SDS) 溶液抽出した CMP 量を白色で示す。

IV. CMP と基質高分子との結合能の検討

従来の研究で、CMP がコラーゲンへ結合することが示された⁷⁾。しかし単量体でもコラーゲンと結合するか否かは II 型コラーゲン以外では不明である。そこ

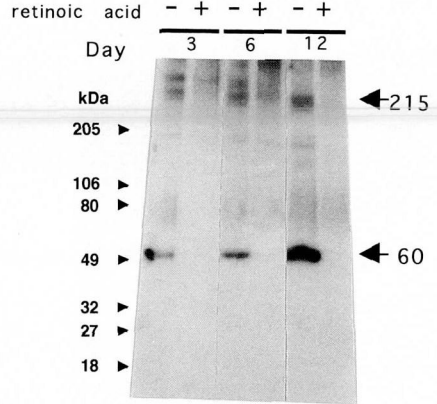


図13 ブタ静止軟骨細胞培養系における CMP 合成に及ぼすレチノイン酸の影響.

ブタの静止軟骨細胞をコンフルエントから 0-12 日間培養液 A を用いて培養し、コンフルエントから 3 日毎にレチノイン酸 (1 μM) を添加した。3 日毎に細胞基質層の CMP を Laemmli (SDS) 溶液にて抽出し、非還元条件でイムノブロットを行った。

で CMP をラクトペルオキシダーゼを用いて ¹²⁵I にてラベルした。この操作により、三量体 CMP は 95% 以上単量体となり、非還元条件でも 60 kDa の分子量を示した。この単量体 ¹²⁵I-CMP は、I 型、II 型、IV 型および V 型コラーゲンと結合したが、アグリカンコア蛋白、ウシ血清アルブミンあるいはフィブロネクチンとは結合しなかった (図16)。

V. 軟骨細胞の伸展に与える CMP の影響

次に、ウサギ軟骨細胞の接着伸展に与える CMP の作用を検討した。プラスチックプレート、コラーゲンあるいは CMP をコーティングしたプレートと比較して、CMP とコラーゲンの両方をコーティングしたプレート上では軟骨細胞の伸展は播種 1 時間以内に著しく充進した (図17)。なお、コラーゲン (150 ng/plate) と各種の濃度の CMP をコーティングした場合、5 ng/plate の濃度において、CMP は伸展を最も促進した (データ示さず)。

VI. ヒト関節疾患での CMP 合成量の検討

4M グアニジン塩酸抽出のイムノブロット法および in situ hybridization の研究では、関節軟骨には CMP がほとんど存在しないことが報告されている^{15,18)}。しかし、病的関節軟骨での CMP レベルは不明である。そこで、OA と RA の患者より採取した関節軟骨を抗 CMP 抗体で免疫染色した。各軟骨切片はモネンシン処置を行っているので、合成された CMP が軟骨細胞

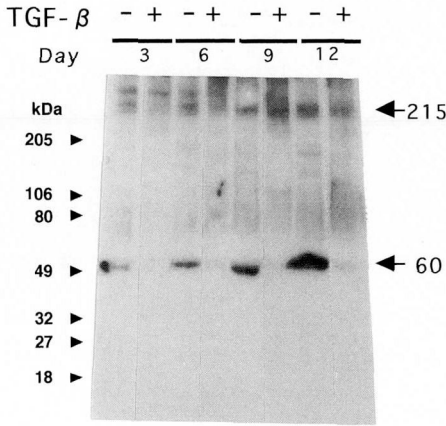
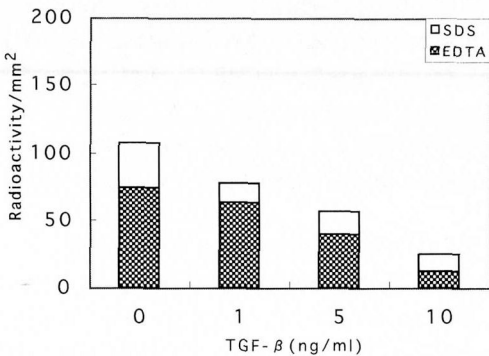


図14 ブタ静止軟骨細胞培養系における CMP レベルに及ぼす TGF-β の影響.

A

ブタの静止軟骨細胞をコンフルエントから 0-12 日間培養液 A を用いて培養し、コンフルエントから 3 日毎に TGF-β (3 ng/ml) を添加した。3 日毎に細胞基質層の CMP を Laemmli (SDS) 溶液にて抽出し、非還元条件でイムノブロットを行った。



B

上記と同様に培養し、0, 1, 5, 10 ng/ml の TGF-β を添加した。12 日目の細胞基質層より CMP を先ず EDTA 溶液で抽出し、引き続き Laemmli (SDS) 溶液にて抽出した。CMP 量は非還元条件でのイムノブロット法により、図12 B と同様に計測した。EDTA 抽出の CMP 量を灰色、Laemmli (SDS) 溶液にて抽出した CMP 量を白色で示す。

内に蓄積され、CMP を合成している軟骨細胞が明確に褐色に染色され、非産生細胞と区別できる。そこで、本研究では CMP 合成細胞の出現の程度を 3 段階に分類し、“CMP レベル 1, 2, 3”として表示した。

正常関節軟骨の代表例を図 18A に示す。この標本の様に抗 CMP 抗体に染色された細胞が全くあるいは

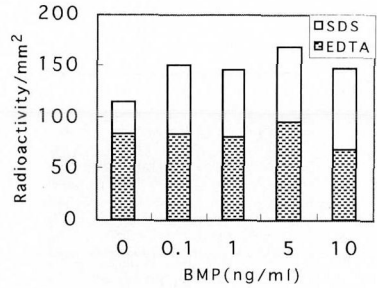


図15 ブタ静止軟骨細胞培養系における CMP に及ぼす BMP-2 の影響.

ブタの静止軟骨細胞をコンフルエントから 0-12 日間培養液 A を用いて培養し、コンフルエントから 3 日毎に BMP-2 を 0, 0.1, 1, 5, 10 ng/ml 添加した。12 日目の細胞基質層より CMP を先ず EDTA 溶液にて抽出し、引き続き Laemmli (SDS) 溶液で抽出した。CMP 量は図 12B と同様に計測した。EDTA 抽出の CMP 量を灰色、Laemmli (SDS) 溶液抽出した CMP 量を白色で示す。

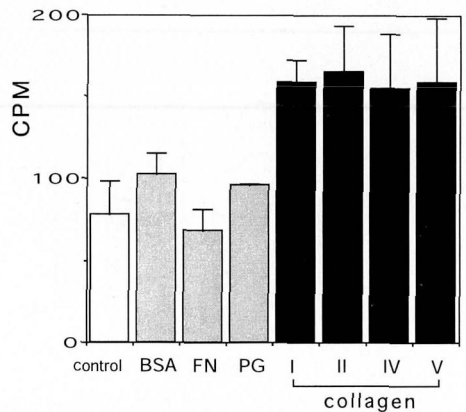


図16 単量体 CMP と軟骨基質高分子との結合.

¹²⁵I-CMP (2000 cpm/well) が、I, II, IV, V 型コラーゲン、フィブロネクチン (FN)、アグリカンコア蛋白 (PG)、牛血清アルブミン (BSA) (各 0.01 mg/well) と結合した量を示す。

ほとんど存在しないレベルを CMP レベル 1 とした。OA の代表例を図 18B に示す。この標本では CMP 合成細胞が中程度存在したので、これをレベル 2 とした。OA では、CMP 産生細胞は表層軟骨の亀裂している部分や、ここには示さないが osteophyte を形成している部分に多く存在した。RA の代表例を図 18C に示す。この軟骨の様に CMP 産生細胞が広範囲かつ著しく多数存在している場合をレベル 3 とした。

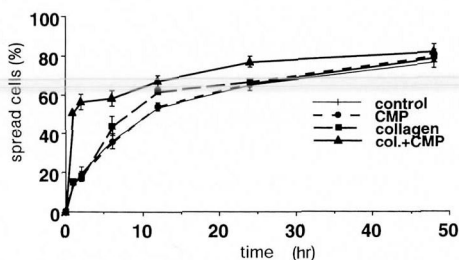


図17 軟骨細胞の伸展に及ぼす CMP の影響.

初代培養から分離したウサギ関節軟骨細胞を無血清の α -MEM 培地に浮遊させて、次の4条件でコーティングした48マルチウェルプレートに 5×10^3 個の細胞/培養系で播種した. 接着伸展した細胞を経時的に位相差顕微鏡で観察して、全細胞数に対する伸展した細胞数の割合(%)を求め、三つの培養系の平均値を伸展率として評価した. コーティングの4条件とは、プラスチックプレート、500 ng/plate の CMP、500 ng/plate のコラーゲン、500 ng/plate の CMP と 500 ng/plate のコラーゲンである.

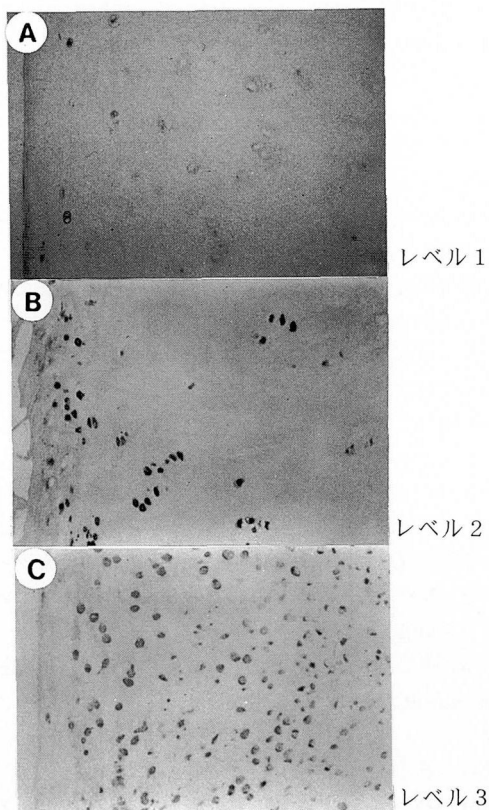


表2 ヒト関節軟骨の免疫染色に用いた全標本の概要と CMP レベル

diagnosis	samples			CMP	
	cartilage	age	sex	levels	
normal	knee	14	M	1	
	knee	16	F	2	
	knee	66	F	1	
	hip	50	M	1	
	hip	50	M	1	
	hip	75	F	2	
OA	knee	69	F	3	
	knee	70	F	2 *1	
	knee	70	F	2	
	knee	70	F	3 *1	
	knee	70	F	3	
	knee	73	F	2 *2	
	knee	73	F	2 *2	
	knee	75	F	2	
	knee	76	F	3	
	knee	76	F	2	
	knee	76	F	2	
	knee	80	F	2 *3	
knee	80	F	2 *3		
RA	knee	49	F	2	
	knee	59	F	3	
	knee	76	F	3	
	hip	28	F	3	
	hip	40	F	3	

* 同一患者の左右の関節

免疫染色に用いた全サンプルの診断名、関節の部位、性別、年齢、CMP レベルを示す. 同一の関節軟骨に対して3回染色して、その CMP レベルを判定した. CMP レベルとは次の様に定義した.

- レベル 1 : CMP 抗体に染色された細胞が全くあるいはほとんど存在しないレベル
- レベル 2 : CMP 合成細胞が中程度存在したレベル
- レベル 3 : CMP 産生細胞が広範にかつ著しく多数存在しているレベル

図18 ヒト関節疾患での CMP レベルの比較

ヒト正常関節 (A: Normal), 及び変形性関節症 (B: OA) 患者とリウマチ性関節炎 (C: RA) 患者より採取した関節軟骨をモネンシン処置し、抗 CMP 抗体で免疫染色した各々の代表例を示す. CMP 合成細胞の出現の程度を“CMP レベル”として表示し、3段階に分類した.

免疫染色に用いた全試料の診断名、関節の部位、性別、年齢、CMP レベルを示す(表2)。同一の関節軟骨に対して3回染色して、そのCMP レベルを判定した。ヒト正常関節軟骨では6標本中2例で少数の軟骨細胞がCMPの合成を示したが、他の標本ではCMP合成はほとんど検出できなかった。つまり、過去の報告と一致して、正常関節軟骨のCMPレベルはほぼレベル1である。これに対して、OAの関節軟骨では13例中9例でレベル2であり、他の4症例はレベル3であった。また、RAでは5標本中4例で多数の軟骨細胞がCMP合成を示し、レベル3であった。なお、コントロール血清では褐色の染色細胞は見られなかった。

また、モノニンシ未処置の通法通りの標本では、RA患者は8標本中1例がレベル3で、他の7例がレベル2であり、またOA患者では12標本中4例がレベル3で、他の8例がレベル2であった(データ示さず)。この実験で用いたモノニンシ未処置のRA軟骨標本には、関節破壊が進行した時期のRA軟骨が多く、壊死した部分を多く含んでいた。これがこれらのRA標本でレベル3が少なかった理由であると推察される。

考 察

従来の研究では、軟骨の4Mグアニジン塩酸抽出物を超遠心してプロテオグリカンと同一の画分にCMPを分離することを利用してCMPが精製された⁶⁾。あるいは、CMPがEDTA溶液により優先的に可溶化されることを利用してCMPが精製された¹²⁾。いずれの方法も精製材料に軟骨全体を用いている。一方、本研究ではウシ静止軟骨のコラーゲン線維に富む画分よりCMPを精製した。この線維画分にはII型コラーゲン以外にCMPが高レベルに存在していた。この所見はCMPがコラーゲンと結合することを実証するものである。

この精製したウシCMPを用いて、抗ウシCMP抗体を作製した。この抗ウシCMP抗体はブタ及びヒトCMPとも特異的に反応した。本抗体を用いてブタ肋軟骨を免疫染色したところ、静止層や成長板増殖層では、CMPは細胞外マトリックスにはあまり存在せず、細胞内部あるいはその外周に高レベルに存在していた。一方、肥大層ではCMPは基質に広く分布していた。Hauserら¹²⁾もCMPが増殖軟骨細胞の周囲に局在することを報告している。これらの結果は、肥大層以外では細胞間マトリックス(intercellular matrix)よりも細胞周囲のterritorial matrixのコラーゲンと結合してCMPが存在することを示唆している。また、本

研究においてCMPがコラーゲン存在下で軟骨細胞の伸展を促進することが明らかになったことから、CMPが細胞-基質間の相互作用に関与することが強く示唆された。

細胞接着実験で初代細胞を用いると、酵素処置による細胞の傷害が強く、接着・伸展には24時間程度を要した。これに対して、継代細胞では傷害が少なく、短時間で接着・伸展することが可能となる。また、継代細胞を用いると内在性の基質の影響を少なくすることが可能で、基質成分であるCMPの影響を検討するのに適している。さらに、血清にはフィブロネクチンなどの因子が存在し、接着・伸展に影響を及ぼす。以上の点を考慮して、本研究では無血清の条件で伸展実験を行った。

CMPの単独コーティングでは、軟骨細胞の接着と伸展に影響を及ぼさなかった。したがって、CMPはコラーゲンと複合体を形成することにより、伸展を促進すると考えられた。また、コラーゲンとCMPの重量比が30:1でその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た結果であった。さらに、軟骨細胞と基質との結合を仲介しているフィブロネクチンとCMPが結合しないことから、CMPの接着・伸展促進作用はフィブロネクチンを介さず、コラーゲンとの直接的な結合により発揮されていることが示唆された。

CMPとコラーゲンの結合のメカニズムは不明であるが、Winterbottomら⁷⁾は単量体CMPにもコラーゲンとの結合性があり、その結合能はnativeCMPのほぼ半分であることを報告している。しかし、彼らが用いたコラーゲンはII型のみである。本研究では、単量体CMPは、骨基質の代表的コラーゲンであるI型及び軟骨基質の代表的コラーゲンであるII型に加えてIV型およびV型コラーゲンとも結合した。しかし、他のコラーゲン結合蛋白質であるフィブロネクチン、基質中の主要成分であるアグリカンコア蛋白、あるいはウシ血清アルブミンとは結合しなかった。

フィブロネクチンはコラーゲン結合蛋白質であり、インテグリンを介して軟骨細胞と結合することはよく知られている^{26,27)}。一方、CMPもコラーゲン結合蛋白質であるが、RGD配列を有さず、フィブロネクチンとは別の機構で軟骨細胞の接着・伸展を促進すると考えられる。

本研究で軟骨細胞培養系の細胞-基質層からLaemmli緩衝液でCMPを抽出したところ、非還元条件にもかかわらず、単量体CMPが出現した。この原因は不明であるが、高濃度のSDSが長期間存在すると、CMPのカルボキシル末端部分のS-S結合domainま

たは coiled-coil α -helical assembly domain が変形する可能性があると考えられた。

EDTA 溶液は軟骨細胞培養系の細胞—基質層から、三量体の CMP を抽出した。この結果は、CMP が Ca^{2+} を介して基質や軟骨細胞に結合していることを示唆している。ただし、EDTA では50%しか CMP が抽出できなかったため、CMP の一部は Ca^{2+} 非依存性に基質あるいは細胞に結合しているものと考えられる。

ウシの気管軟骨では加齢と共に CMP レベルが上昇するが、この蓄積した CMP の一部は 4M グアニジン塩酸でさえ抽出できなかった¹⁷⁾。CMP の不溶性が年齢依存性に増大することは、CMP のマトリックスへの結合状態が加齢と共に変化することを示唆している¹²⁾。本研究では抽出溶媒の違いによって、CMP の三量体構造が変化することが判明した。このように、CMP の分子構造は *in vitro* でも *in vivo* でも変化し易いと考えられる。

ブタ静止軟骨細胞培養系で、プロテオグリカン合成を促進する因子の多くは CMP 合成も促進した (表 3)。しかし、TGF- β は基質合成を促進するが、CMP 合成に対しては抑制的に作用した。OA 及び RA では関節液中に 4–10 ng/ml の活性型 TGF- β が存在するので、関節疾患でも TGF- β は CMP 合成に抑制的に作用すると考えられる。一方、BMP-2 は TGF- β と異なり、CMP 合成を促進した。また、軟骨細胞を脱分化させるレチノイン酸は CMP 合成を抑制し、炎症性サイトカインの IL-1 β は CMP 合成にほとんど影響を及ぼさなかった。

幼若な骨芽細胞様細胞 (C26 細胞) において BMP-2 はアルカリホスファターゼ活性を促進し、オステオカルシン産生を誘導するが、TGF- β はアルカリホス

ファターゼ活性とオステオカルシン産生に影響しない^{28,29)}。また開ら³⁰⁾も、軟骨細胞において TGF- β と BMP-2 との作用が異なることを報告している。したがって、CMP 合成についても TGF- β と BMP-2 との作用が一致していないことは特に異例ではない。

ニワトリ、ラット及びウサギの軟骨細胞培養系で細胞膜透過性 cAMP 誘導体であるジブチリル cAMP は DNA 合成を抑制し (0.1 mM 以上で)、プロテオグリカン合成を促進し、アルカリホスファターゼ活性・肥大化・石灰化を抑制することが知られている³¹⁾。ヒト胎児の成長板軟骨細胞培養系においても、ジブチリル cAMP は基質合成を促進し、細胞形態を球形へと変化させると共に、CMP 合成をも促進した。cAMP は多くの組織で細胞分化、代謝、増殖の調節に関与している。軟骨細胞培養系で cAMP の合成を誘導するものとしては、PTH、TGF- β 、プロスタグランジン E₁、E₂、D₂、I₂ が報告されている^{32–38)}。一方、インスリン様因子 (IGF-1) は cAMP レベルを低下させるが³⁹⁾、この他にも多くのホルモンが軟骨細胞の cAMP レベルに影響すると予想される。これらの知見は、軟骨細胞内における cAMP レベルを増加させる因子が CMP 合成の制御に関与していることを示唆している。

本研究で検討したサイトカイン、ホルモン、ビタミンの中で、Con A は最も強力に CMP 合成を促進した。この植物レクチンは生体内には存在しないものの、プロテオグリカン合成促進作用とアルカリホスファターゼ誘導作用は非常に強力である⁴⁰⁾。したがって、この Con A の作用を模倣する未知の成長因子が、CMP の発現を制御している可能性がある。

OA は局所性疾患で、関節に加わる機械的負荷の異常を主因として関節軟骨や軟骨下骨層の変性と基質の破壊を主徴候とする^{41,42)}。一方、RA は多発性の非化膿性の炎症を主症状とする原因不明の全身性慢性疾患であり、免疫異常、遺伝子要因、内分泌異常、環境要因などが複雑に関与していると考えられている⁴³⁾。RA 患者の血液中には CMP が存在するものの、RA 患者の滑液中の CMP 濃度は同人の血清中の CMP 濃度より低いいため、血中 CMP は関節軟骨由来ではなく、関節軟骨以外の軟骨由来と考えられていた⁴⁴⁾。しかし、本研究において、RA 及び OA のいずれの関節軟骨においても、CMP 合成が著しく亢進していることが明らかになった。

発生初期には大部分の肢芽細胞が CMP を合成する^{18,21)}。また、骨格形成後も大部分の軟骨 (鼻軟骨、耳介軟骨、肋軟骨、成長板軟骨、静止軟骨) に CMP が存在する¹⁵⁾。しかし、マウス胎仔、ヒト胎児及びウシ関節軟骨には CMP mRNA あるいは蛋白が存在しな

表 3 軟骨プロテオグリカン、II 型コラーゲンおよび CMP 合成に及ぼす成長因子とビタミンの作用

	PG collage (type II)	CMP
Con A	↑↑	↑↑
DBcAMP	↑↑	↑↑
Vitamin C	↑	↑
BMP-2	↑	↑
PTH (1-84)	↑	→
TGF- β	↑	↓
bFGF	↑→↓	→
IL-1 β	↓	→
Retinoic acid	↓	↓

いと報告されている^{15,18,21)}。本研究でもブタの下顎頭関節軟骨及び関節円板には CMP は検出できなかった(データ示さず)。また、椎間板にも CMP は存在しない¹⁵⁾。しかし、剣状突起には CMP が存在するので¹⁵⁾、CMP 合成の欠如は遊離端軟骨の特徴ではない。関節軟骨、関節円板と椎間板は、各種軟骨の中でも最も高レベルの圧縮力を緩衝し、かつ弾力性を保持する組織である。この機械的性状が CMP 合成の抑制と関連している可能性を否定できない。実際、軟骨の弾力性及び機械的強度に寄与しているコラーゲンとアグリカンに CMP が結合し^{6,7)}、しかも CMP はコラーゲン線維形成にも影響することが報告されている¹⁴⁾。一方、胎児の関節軟骨でも CMP 合成は既に停止していることから¹⁸⁾、機械的負荷が CMP 合成を必ずしも直接的に抑制しているのではないと考えられる。CMP 遺伝子の発現の調節機構は不明であるが、第一イントロンにエンハンサー領域が、転写開始点より上流にサイレンサー領域が存在すると報告されている⁹⁻¹¹⁾。ただし、関節での CMP 合成の抑制に CMP 遺伝子のどの領域が関与するかは未だ不明である。

本研究での免疫組織学的検討は、正常ヒト関節軟骨で CMP 合成が検出できないか非常に低いことを示した。これに対して、関節疾患を有する患者では CMP 合成が著明に亢進していた。OA において、骨棘のように滑膜由来細胞が軟骨・骨形成に参加している部位や軟骨表層の亀裂部位で CMP 合成が亢進していた。さらに、RA 軟骨では細胞周囲のマトリックス含量が低下した細胞を含めて、関節軟骨の全層で CMP 合成の亢進が観察された。コラーゲン結合蛋白でありかつ軟骨の未成熟な段階で高レベルに合成されるオステオネクチン (SPARC) とフィブロネクチンも、OA および RA の関節軟骨で著明に誘導されることが報告されている⁴⁵⁻⁴⁸⁾。したがって、関節疾患での CMP 合成の亢進は軟骨細胞が未成熟な分化段階へと退行変化を呈していることと関係しているのかもしれない。

一般的に、軟骨細胞外マトリックスにおいて、マトリックス分解を促進するのは、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF α 、定常的な圧力負荷などであり、分解を阻害するのは、IL-6 (TIMP の増加)、TGF- β (TIMP の増加)、周期的な圧力負荷などである⁴⁹⁾。一方、マトリックス合成を促進するのは、TGF- β 、IGF-1、bFGF、PDGF、周期的な圧力負荷などであり、合成を阻害するのは、IL-1 α 、IL-1 β 、TNF α 、INF γ 、レチノイン酸、定常的な圧力負荷などと報告されている⁴⁹⁾。今回のヒト関節疾患の免疫染色の結果からのみでは、CMP が関節軟骨の破壊に関係しているのか、修復に関係しているのかは確定できない。しかし、軟骨細胞培養系で基質合成を促進

する成長因子の Con A、ジブチリル cAMP が CMP 合成を促進し、炎症性サイトカインは CMP 合成に影響を及ぼさなかった。これらの結果は、関節軟骨基質の再生反応と連動して CMP 合成が亢進することを強く示唆するものである。また、正常肋軟骨で軟骨細胞の周囲の基質に CMP が分布していたことや、コラーゲンと CMP とをコーティングすると軟骨細胞の接着・伸展が亢進したことは、CMP が軟骨細胞とコラーゲンとの相互作用を仲介して増殖・分化の足場を提供していることを示唆している。さらに、正常な関節軟骨では CMP が存在しないが、OA や RA の関節疾患では軟骨細胞の形質が変化して CMP 合成が誘導され、細胞周囲に蓄積した CMP が組織改造を促すものと推察される。

結 論

1. ブタ肋軟骨の静止層と成長板増殖層では CMP は軟骨細胞内部または周囲に存在し、成長板肥大層では基質に広く分布していた。

2. CMP は I 型及び II 型コラーゲンと結合するが、フィブロネクチン、アグリカンコア蛋白、ウシ血清アルブミンとは結合しなかった。

3. 軟骨細胞培養系で、Con A、ビタミン C、ジブチリル cAMP、BMP-2 は CMP 量を増加させ、レチノイン酸、TGF- β は CMP 量を減少させた。

4. 軟骨細胞培養系で CMP とコラーゲンを結合させてコーティングすると、軟骨細胞の接着・伸展が著しく亢進した。

5. ヒト正常関節軟骨では CMP はほとんど存在しなかった。しかし、RA 及び OA の病変関節軟骨では CMP 合成が著しく亢進した。

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矯正学講座丹根一夫教授ならびに前本学歯科矯正学講座教授山内和夫名誉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細菌学講座杉中秀壽教授に深謝致します。

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、大宅芳枝博士、笛吹恵美子博士、石田広子先

生, 本学口腔細菌学講座菅井基行助教授, 本学歯科補綴学第一講座石田秀幸博士, 理学部遺伝子化学講座大山義彦助教授, 大阪大学歯学部生化学講座中島和久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矯正学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。

文 献

- 1) Kato, Y.: Effects of exogenous extracellular matrices on chondrocyte proliferation and phenotypic expression.; in Cell proliferation and glomerulonephritis-cell proliferation in the renal glomerulus and its mechanism. (Shimizu, F., Kihara, I. and Oite T., editors). Nisimura, Niigata, 41-55, 1986.
- 2) Owens, R.J. and Baralle, F.E.: Mapping the collagen-binding site of human fibronectin by expression in *E. coli*. *EMBO J.* 5, 2825-2830, 1986.
- 3) Fujisawa, R. and Kuboki, Y.: Affinity of bone sialoprotein and several other and dentin acidic proteins to collagen fibrils. *Calcif. Tissue Int.* 51, 438-442, 1992.
- 4) Sage, H., Vernon, R.B., Funk, S.E., Everitt, E.A. and Angello, J.: SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca⁺²-dependent binding to the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 109, 341-356, 1989.
- 5) Kelm, Jr. R.J. 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.
- 6) Paulsson, M. and Heinegård, D.: Matrix proteins bound to associatively prepared proteoglycans from bovine cartilage. *Biochem. J.* 183, 539-545, 1979.
- 7) 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.
- 8) Paulsson, M. and Heinegård, D.: Purification and structural characterization of a cartilage matrix protein. *Biochem. J.* 197, 367-375, 1981.
- 9) Argraves, W.S., Deák, 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.
- 10) Kiss, I., Deák, F., Holloway, Jr. R.G., 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.
- 11) Jenkins, R.N., Osborne-Lawrence, S.L., Sinclair, A.K., Eddy, Jr. R.L., Byers, M.G., Shows, T.B. and Duby, A.D.: Structure and chromosomal location of the human gene encoding cartilage matrix protein. *J. Biol. Chem.* 265: 19624-19631, 1990.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) Tondravi, M.M., Winterbottom, N., Haudenschild, D.R. and Goetinck, P.F.: Cartilage matrix protein binds to collagen and plays a role in collagen fibrillogenesis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 383b, 515-522, 1993.
- 15) Paulsson, M. and Heinegård, D.: Radioimmunoassay of the 148-kilodalton cartilage protein. Distribution of the protein among bovine tissues. *Biochem. J.* 207, 207-213, 1982.
- 16) Paulsson, M. and Heinegård, D.: Noncollagenous cartilage proteins current status of an emerging research field. *Coll. Relat. Res.* 4, 219-229, 1984.
- 17) Paulsson, M., Inerot, S. and Heinegård, D.: Variation in quantity and extractability of the 148-kilodalton cartilage protein with age. *Biochem. J.* 221, 623-630, 1984.
- 18) Mundlos, S. and Zabel, B.: Developmental expression of human cartilage matrix protein. *Dev. Dyn.* 199, 241-252, 1994.
- 19) 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.
- 20) Aszódi, A., Módos, L., Páldi, A., Rencendorj, A., Kiss, I. and Bösze, Z.: The zonal expression of chicken cartilage matrix protein gene in the developing skeleton of transgenic mice. *Matrix Biol.* 14, 181-190, 1994.
- 21) Franzen, A., Heinegard, D. and Sotursh, 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.
- 22) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Elec-

- trophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354, 1979.
- 23) Shimomura, Y., Yoneda, T. and Suzuki, F.: Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif. Tissue Int.* **19**, 179-187, 1975.
 - 24) 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.
 - 25) Marchalonis, J.J.: An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochem. J.* **113**, 299-305, 1969.
 - 26) Pierschbacher, M.D. and Rouslahti, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30-33, 1984.
 - 27) Hynes, R.O.: Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25, 1992.
 - 28) Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Kahn, A.J., Suda, T. and Yoshiki, S.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J. Cell Biol.* **113**, 681-687, 1991.
 - 29) Katagiri, T., Yamaguchi, A., Ikeda, T., Yosiki, S., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Tanaka, H., Omura, S. and Suda, T.: The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 295-299, 1990.
 - 30) Hiraki, Y., Inoue, H., Shigeno, C., Sanma, Y., Bentz, H., Rosen, D.M., Asada, A. and Suzuki, F.: Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **6**, 1373-1385, 1991.
 - 31) Jikko, A., Murakami, H., Yan, W., Nakashima, K., Ohya, Y., Satakeda, H., Noshiro, M., Kawamoto, T., Nakamura, S., Okada, Y., Suzuki, F. and Kato, Y.: Effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on chondrocyte terminal differentiation and cartilage-matrix calcification. *Endocrinology* **137**, 122-128, 1996.
 - 32) Takigawa, M., Takano, T. and Suzuki, F.: Effects of parathyroid hormone and cyclic AMP analogues on the activity of ornithine decarboxylase and expression of the differentiated phenotype of chondrocytes in culture. *J. Cell Physiol.* **106**, 259-268, 1981.
 - 33) Kato, Y., Koike, T., Iwamoto, M., Kinoshita, M., Sato, K., Hiraki, Y. and Suzuki, F.: Effects of limited exposure of rabbit chondrocyte cultures to parathyroid hormone and dibutyl adenosine 3',5'-monophosphate on chondrocyte on cartilage-characteristic proteoglycan synthesis. *Endocrinology* **122**, 1991-1997, 1988.
 - 34) Tsuji, M., Kato, Y., Nomura, Y., Kinoshita, M., Kumahara, Y. and Suzuki, F.: Effects of multiplication-stimulating activity (MSA) on the cyclic AMP level and proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes. *Acta Endocrinol (Copenh)*. **104**, 117-122, 1983.
 - 35) Kinoshita, M., Kato, Y., Tsuji, M., Kono, T., Hiraki, Y. and Suzuki, F.: Prostaglandin stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cultured chondrocytes in the presence or absence of parathyroid hormone. *Biochem. Biophys. Acta* **757**, 324-331, 1983.
 - 36) Smith, D.M., Roth, L.M. and Johnston, C.C.: Hormonal responsiveness of adenylate cyclase activity in cartilage. *Endocrinology* **98**, 242-246, 1976.
 - 37) Takano, T., Takigawa, M., Shirai, E., Suzuki, F. and Rosenblatt, M.: Effect of synthetic analogs and fragments of bovine parathyroid hormone on the sizes of proteoglycan monomers and their synthesis in cultured chondrocytes isolated from growth cartilage. *Endocrinology* **116**, 2536-2541, 1985.
 - 38) Vivien, D., Galera, P., Lebrun, E., Daireaux, M., Loyau, G. and Pujol, J.-P.: IPG (Inositol-phosphate glycan) as a cellular signal for TGF-beta1 modulation of chondrocyte cell cycle. *J. Cell Physiol.* **150**, 291-298, 1992.
 - 39) Tell, G.P.E., Cuatrecasas, P., Van Wyk, J.J. and Hintz, R.L.: Somatomedin: inhibition of adenylate cyclase activity in subcellular membranes of various tissues. *Science* **180**, 312-315, 1973.
 - 40) Yan, W., Nakasima, K., Iwamoto, M. and Kato, Y.: Stimulation by concanavalin A of cartilage-matrix proteoglycan synthesis in chondrocyte cultures. *J. Biol. Chem.* **265**, 10125-10131, 1990.
 - 41) 寺山和雄: 慢性関節疾患 (退行性, 代謝性); 標準整形外科学 (寺山和雄, 辻陽雄編). 第5版, 医学書院, 東京, 218-222, 1993.
 - 42) 沖村昭信, 小澤 奏, 末井良和, 和田卓郎, 丹根一夫: 変形性関節症を伴う若年患者の歯科矯正治療の1治療例—下顎骨の長期変化—, 日顎誌 **7**, 107-115, 1995.
 - 43) 鳥巢岳彦: リウマチとその類縁疾患; 標準整形外科学 (寺山和雄, 辻陽雄編). 第5版, 医学書院, 東京, 203-211, 1993.
 - 44) Saxne, T. and Heinegård, D.: Involvement of

- nonarticular cartilage, as demonstrated by release of a cartilage-specific protein, in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 32, 1080-1086, 1989.
- 45) Nakamura, S., Kamihagi, K., Satakeda, H., Katayama, M., Pan, H., Okamoto, H., Nosiro, M., Takahasi, K., Yoshihara, Y., Shimmei, M., Okada, Y. and Kato, Y.: Enhancement of SPARC/osteonectin synthesis in arthritic cartilage: Its increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures. *Arthritis Rheum.* (in press), 1996.
- 46) Carsons, S., Mosesson, M.W. and Diamond H.S.: Detection and quantitation of fibronectin in synovial fluid from patients with rheumatic disease. *Arthritis Rheum.* 24, 1261-1267, 1981.
- 47) Clemmensen, I., Holund, B. and Andersen, R.B.: Fibrin and fibronectin in rheumatoid synovial membrane and rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 26, 479-485, 1983.
- 48) Burton-Wurster, N., Butler, M., Harter, S., Colombo, C., Quintavalla, J., Swartzendurber, D., Arsenis, C. and Lust, G.: Presence of fibronectin in articular cartilage in two animal models of osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 13, 175-182, 1986.
- 49) Poole, A.R.: Arthritis and Allied Conditions; A textbook of rheumatology, (McCarthy, D.J. and Koopman, W.J., editors), 12th ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 279-333, 1993.