305 トランスジェニックラットモデルにおける皮質骨の生体力学的特性評価

Measurements of the Biomechanical Properties of Cortical Bone in Transgenic Rats.

○正 山本 衛 (近畿大) 松本 和也 (近畿大)
佐伯 和弘 (近畿大) 細井 美彦 (近畿大)
入谷 明 (近畿大)

Ei YAMAMOTO, Kinki University, Naga, Wakayama, 649-6493.

Kazuya MATSUMOTO, Kinki University.

Kazuhiro Saeki, Kinki University.

Yoshihiko HOSOI, Kinki University.

Akira IRITANI, Kinki University.

Key Words: Transgenic rat, Femur, Cortical bone, Biomechanical property.

1. 緒言

生体組織が形作られていくメカニズムの解明や、それぞれの組織が健全な機能を果たさなくなる要因を明らかにすることは、現代科学の重要な未解決課題の1つであり、生命科学の最前線として社会的な注目度も非常に高いものとなっている。このような背景から、個々の遺伝子が果たす生理機能を解析する研究が、近年極めて盛んに行われている。しかしながら、生体組織の形成や変化には遺伝的要因だけではなく、力学的な条件を含む環境的要因が関与していることが広く認識されており、2つの要因のバランスや相互作用を明らかにすることが、今後の重要な課題となる可能性が十分に考えられる。特に骨、筋肉、腱・靭帯のような筋骨格系組織は、生体内で身体支持や運動伝達などの力学的な役割を有していることから、力学的環境要因による支配が顕著であり、これらの組織の成長、適応、疾患などの各現象の原因を明らかにするためには、遺伝的要因と環境的要因の双方を統合的に解析することが不可欠である。しかし、現在行われている研究は、遺伝的または環境的要因のどちらか一方に着目し、生体組織に及ぼす影響を調べているものしか存在しないのが現状である。

一方、最近では個体レベルで遺伝子の機能を探ることの可能なトランスジェニック（遺伝子導入）動物やノックアウト（遺伝子破壊）動物の作製技術がマウスを中心に確立され、これらの技術を使った研究が、免疫系や癌関連遺伝子に関する分野から脳神経系や発生・生殖に関する領域まで広く展開されている。しかしながら、骨や腱・靭帯などの筋骨格系組織の生体力学的特性と、それらに影響を及ぼす遺伝子情報との関連に関する知見はほとんど得られていない。

そこで本研究では、生体内で力学的な機能を有する筋骨格系組織の形状や特性が、どの程度の割合で遺伝的要因もしくは力学的環境要因に支配されるのかを定量的に明らかにすることを最終目標に、その初期段階として、成長ホルモンのアンチセンス遺伝子を導入し、成長ホルモンの分泌を抑制させたトランスジェニックラットの皮質骨の力学的特性を測定し、遺伝子改変が骨の生体力学的特性に及ぼす影響について検討した。

2. 実験方法

2. 1 実験動物

Matsumoto ら[1, 2]によって既に確立されている手法を用いて作製した、小型化を呈する表現型を示すトランスジェニックラットを実験動物とした。このトランスジェニックラットでは、成長ホルモン遺伝子の発現を抑制することによって、通常の個体よりも体形を小さくさせることが可能になっている。ここで遺伝子を機能不全にさせるための手法として、アンチセンスRNAを使った特定遺伝子発現の抑制方法を用いている。この方法は、標的とする内在性遺伝子の mRNA に対して相補的な配列をもつアンチセンス RNA を利用するものであり、アンチセン

ス RNA が標的遺伝子の発現過程、すなわち転写、RNA のプロセッシング、核から細胞質への移動、そして翻訳のいずれかの段階を特異的に阻害することを基本原理としている。本研究では、成長ホルモンに対するアンチセンス RNA を脳下垂体前葉細胞で特異的に発現させるような導入遺伝子を構築し、これらを Wistar ラット受精卵に顕微注射した後、仮親に移植して得られた産仔の中で遺伝子導入が確認された系統の子孫をトランスジェニックラットとして実験に使用した（Transgenic 群）。一方、通常の Wistar ラットを Control 群とした。

2. 2 実験試料

力学試験には、Transgenic 群と Control 群の成熟ラット（雌）より摘出した大腿骨を用いた。大腿骨の全長をノギスで計測した後、大腿顆から骨の全長の 1/3 だけ離れた骨幹部より、断面形状がほぼ一様である長さ約 3mm の円筒試料を、ダイヤモンド回転鋸刃を用いて切り出した。この試料の両端断面の画像を CCD カメラで撮影し、ビデオディメンジョンアナライザー（VDA）に取り込み、試料の断面積を測定した。測定は円筒試料の近位部と遠位部の 2 カ所で行い、それらの平均値を最終的な試料の断面積とした。また、試料の長さをマイクロメータを用いて計測した。

2. 3 圧縮試験方法

万能材料試験機（AGS-H，島津製作所）を使用して、円筒試料の骨軸方向に圧縮破壊試験を行った。最大荷重容量 5kN のロードセルを用いて荷重を測定し、試験機のクロスヘッド移動量を変位として、検出された荷重及び変位をコンピュータに記録した。試料を生理食塩水（37℃）に浸漬させた状態で試験を行い、まず 5N のプリロードを試料に作用させて、変位のゼロを設定した後、圧縮速度 1 mm/min で破断まで試料を圧縮した。

3. 実験結果

3. 1 実験動物の体重と大腿骨形状

実験に使用した個体の体重及び大腿骨の長さ断面積を Table 1 に示す。Transgenic 群の体重は Control 群の約 70%であり、Transgenic 群の個体は有意に体形が小さく、成長ホルモンの抑制による小型化の表現型を示した。さらに、Transgenic 群の大腿骨の長さ断面積は Control 群よりも有意に小さく、それぞれ Control 群の約 90%、75%であった。

3. 2 圧縮破壊特性

圧縮破壊試験から得られた応力-ひずみ線図の形状は、Transgenic 群、Control 群ともにひずみ約 2%以下で僅かに下の凸の Toe-region がみられるが、その後は破断まではほぼ線形的であった（Fig. 1）。応力-ひずみ線図のひずみ 3~5%間の線形部分の傾きを表す接線係数、及び破断荷重、圧縮強度、破断ひずみを Table 2 に示す。Transgenic 群の破断荷重は、Control 群の約 70%であり、有意な減少が認められた。一方、接線係数、圧縮強度、破断ひずみには、両群間に有意差はみられなかった。

3. 3 形状または力学的特性と体重との関係

破断荷重、圧縮強度、及び断面積と各個体の体重との関係を Fig. 2 に示す。Transgenic 群と Control 群を併せたデータに関して、破断荷重と体重、断面積と体重の間には、有意な正の相関がみられたのに対して、圧縮強度と体重の間には有意な相関はみられなかった。

Table 1 Animal body weight and the dimension of rat femur.

	Groups	
	Control (n = 4)	Transgenic (n = 4)
Body weight W (g)	324.0 ± 17.7	225.1 ± 31.4 *
Length of femur L ₀ (mm)	36.4 ± 0.9	32.2 ± 0.1 *
Cross-sectional area of femur A ₀ (mm ²)	5.8 ± 0.4	4.3 ± 0.3 *

Mean ± S.D.

* Significant difference vs. Control (p < 0.05)

Fig. 1 Stress-strain curves of rat femur.

Table 2 Mechanical properties of rat femur.

	Groups	
	Control (n = 4)	Transgenic (n = 4)
Load at break F _B (N)	942.8 ± 73.7	646.5 ± 112.0 *
Tangent modulus E _T (GPa)	2.3 ± 1.3	2.8 ± 0.8
Compressive strength σ _B (MPa)	164.0 ± 20.3	149.3 ± 19.2
Strain at break ε _B (%)	9.2 ± 1.7	7.4 ± 1.7

Mean ± S.D.

* Significant difference vs. Control (p < 0.05)

Fig. 2 Body weight vs. load at break (F_B), compressive strength (σ_B), and cross-sectional area (A₀).

4. 考察

Transgenic 群、Control 群の大腿骨の破断荷重と各個体の体重との間に線形的な正の相関がみられ、これより Transgenic 群の破断荷重が、Control 群と同様にそれぞれの個体が有する体重と密接に関連したものであることが示唆された。骨に作用する負荷は体重に関連していることが十分に考えられる。従って、Transgenic 群では成長ホルモンの抑制による体重の低下に伴い、骨に作用する負荷も減少し、この減少した負荷に見合った破断荷重を有する骨の形成が行われたものと推察される。さらに、断面積と体重の間に正の相関がみられたのに対して、圧縮強度と体重の間に相関はみられなかったことから、Transgenic 群の骨の破断荷重の減少には、材料特性の変化よりも形状の変化の方がより大きな影響を及ぼしていることが考えられる。しかし、本研究で使ったトランスジェニックラットでは、脳下垂体で発現したアンチセンスRNA の作用によって、全身の成長ホルモンの抑制しているため、体重の低下に伴う骨に作用する負荷の減少といった二次的な要因ではなく、成長ホルモンの抑制が一次的に骨の形状や特性に影響を及ぼしている可能性も十分に考えられ、今後はこの点を解明していく必要がある。

本研究と同様なトランスジェニック動物を用いた生体力学的な研究として、Jepsen ら[3]はⅠ型コラーゲンの形成を遺伝的に抑制したマウスの大腿骨の力学的特性を調べており、このトランスジェニックマウスの骨は通常のマウスよりも脆性的な性質を示したと報告している。本研究では、Transgenic 群の破断ひずみが Control 群よりもやや小さな値となっており、延性の低下を示す傾向がみられるものの、有意な相違は認められていない。Jepsen ら[3]の研究では、骨を構成する要素の1つであるコラーゲンの量を抑制したトランスジェニックマウスを使用しているのに対して、本研究では個体内の全ての成分あるいは組織の形成に影響を与える成長ホルモンの分泌を抑制したトランスジェニックラットを実験に用いており、コラーゲンのみを特異的に抑制した場合ほど、脆性的な性質が顕著にみられなかったものと推察される。今後は、成長ホルモンの抑制が骨の微細組織構造や構成成分に及ぼす影響を明らかにするために、本研究で用いたトランスジェニックラットモデルの骨に関する詳細な生化学的または組織学的検討を行う予定である。

5. 結言

成長を遺伝的に抑制したトランスジェニックラットの大腿骨の生体力学的特性を調べた結果、体重の減少に起因する骨の破断荷重の低下がみられ、この破断荷重の低下は骨の材料特性の変化よりも、骨形状の変化に大きく影響されることが示唆された。

謝辞

本研究は平成 14 年度近畿大学生物理工学部新領域・創設理念推進研究助成金の補助によって行われた。また、トランスジェニックラットを供与して頂いた(財)日本生物科学研究所に深謝致します。

参考文献

- [1] Matsumoto, K., et al., "Growth Retardation in Rats Whose Growth Hormone Gene Expression Was Suppressed by Antisense RNA Transgene," Mol. Reprod. Dev., Vol. 36, pp. 53-58, 1993.
- [2] Matsumoto, K., et al., "Evaluation of an Antisense RNA Transgene for Inhibiting Growth Hormone Gene Expression in Transgenic Rats," Dev. Genet., Vol. 16, pp. 273-277, 1995.
- [3] Jepsen, K. J., et al., "Type I Collagen Mutation Compromises the Post-Yield Behavior of Mov 13 Long Bone," J. Orthop. Res., Vol. 14, pp. 493-499, 1996.