633 トランスジェニックラットより摘出した膝蓋腱の生体力学的特性

Biomechanical Properties of Patellar Tendons Obtained from Transgenic Rats.

○正 山本 衛 (近畿大)
佐伯 和弘 (近畿大)
入谷 明 (近畿大)

松本 和也 (近畿大)
細井 美彦 (近畿大)

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

Kazuya MATSUMOTO, Kinki University.

Kazuhiro SAEKI, Kinki University.

Yoshihiko HOSOI, Kinki University.

Akira IRITANI, Kinki University.

Key Words: Biomechanics, Transgenic rat, Patellar tendon, Mechanical properties.

1. 緒言

生命体の形状や特性がどのように決定されていくのかという課題を解決することや、種々の生体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、基礎生物学における重要な未解決問題であり、ライフサイエンスの最前線として大変注目されている。このような背景から、個々の遺伝子が果たす生理的機能を調査する研究が、近年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幅広く認識されており、2つの要因の相互作用やバランスを解明していくことが、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・靱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果たしていることから、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のほとんどは、遺伝的または環境的要因のどちらか一方に着目し、生体組織の構造や機能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、腱・靱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ついての知見はほとんど得られていない。

本研究の最終的な目的は、生体内で力学的な機能を有する筋骨格系組織である腱・靱帯の形状や特性が、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である。ここでは、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膝蓋腱の力学的特性を測定し、遺伝子改変が腱組織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

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

を実験に使用した。なお、その作製手法は Matsumoto ら[1, 2]によってすでに確立されている。このラットでは、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。ここでは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。まず、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 Wister ラット受精卵に顕微注入した後、仮親に移植して産仔を得る。この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本実験に使用した (Transgenic 群)。一方、通常の Wister 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（雄、約 15 ヶ月齢）より摘出した膝蓋腱を用いた。各ラットの左膝関節から膝蓋腱以外の軟組織を全て取り除き、膝蓋骨-膝蓋腱-脛骨複合体の状態にした。また、膝蓋腱実質部での破断を力学試験の際に生じさせるために、腱の両側部分を切離して中央の幅を約 1/3 にした。その後、ポリメチルメタクリレート (PMMA) を用いて脛骨及び膝蓋骨をアルミニウム製カップに固定した。このように作製した試験片の断面積は、ロングレンジフォーカスレーザー変位計を用いて測定した。

2.3 引張試験方法

膝蓋腱の両端に取り付けたアルミニウムカップを利用して、万能材料試験機 (AGS-H, 島津製作所) に試験片を把持した。最大荷重容量 5kN のロードセルを用いて荷重を測定し、あらかじめ試料に印したマーカ間の距離をビデオディメンジョンアナライザー (VDA) で検出することでひずみを測定した。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 0.2N のプリロードを試料に作用させてゼロを設定した後、引張速度 10mm/min で変位量 0.2mm の伸びを 10 回繰り返すプリコンディショニングを実施した。その後、引張速度 10mm/min で試料が破断するまで引張試験を行った。

3. 実験結果

実験に用いた Transgenic 群のラットの体重 (264 ± 56 g) は, Control 群 (453 ± 82 g) の約 60% であった. 引張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% 以下で下に凸の Toe-region がみられるが, その後のひずみ約 2~5% の部分ではほぼ線形であった (Fig. 1). この応力-ひずみ線図のひずみ 2~5% 部分の傾きを表す接線係数, 並びに引張強度, 破断ひずみの結果をそれぞれ Fig. 2~4 に示す. Transgenic 群の接線係数は, Control 群の約 35% であり, 遺伝子改変によって減少する傾向が認められた. 引張強度でも, 接線係数と同様の傾向がみられ, Control 群よりも Transgenic 群の方が低値であった. これに対して, Transgenic 群の破断ひずみは Control 群よりも大きくなる傾向がみられた.

Fig. 1 Stress-strain relations (Control and Transgenic groups).

Fig. 2 Tangent modulus in the Control and Transgenic groups.

Fig. 3 Tensile strength in the Control and Transgenic groups.

Fig. 4 Strain at failure in the Control and Transgenic groups.

4. 考察

本実験の結果より, Transgenic 群の接線係数と引張強度は Control 群よりも低くなる傾向がみられた. 成長段階にある腱組織の生体力学的特性に関する過去の研究では, 個体の体重が腱の力学的強度と密接に関連しており, 体重の増加にともなう組織に作用する張力が増加することで, 腱の強度が向上するものと推察されている[3]. Transgenic 群の個体は, 体重が Control 群より低値となっており, この体重の減少が腱の強度低下の一因となった可能性が考えられる. しかし, 本研究で使用し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を抑制しているため, 体重の低下に伴う腱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腱の特性に影響を及ぼしている可能性も十分に考えられ, 今後この点を解明していく必要があるものと考えられる.

腱を構成するコラーゲンの生成を遺伝的に操作したノックアウトマウスより摘出した組織の性状を調べた研究が, これまでに報告されている[4, 5]. これらの研究では, コラーゲン線維の形状などを詳細に調べており, 遺伝子改変動物を用いた実験が, 腱・靱帯の構造-機能関係を解明するために非常に有効であることを示している. 従って, 本研究で使用したトランスジェニックラットの腱組織のコラーゲン線維のサイズなどの微細構成要素に関するデータを得ることが重要であると考えられる. さらに, 現時点では実験に使用した動物の個体数が少ないので, 今後試料数を増やして, 遺伝的な成長ホルモンの抑制が腱の力学的特性に及ぼす影響についてより詳細に検討していく予定である.

謝辞

本研究の一部は, カシオ科学振興財団研究助成の補助によって行われた. トランスジェニックラットを供与して頂いた財団法人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., Mol. Reprod. Dev., Vol. 36, pp. 53-58, 1993.
- [2] Matsumoto, K., et al., Dev. Genet., Vol. 16, pp. 273-277, 1995.
- [3] Yamamoto, E., et al., Biorheology, Vol. 41, pp. 1-11, 2004.
- [4] Derwin, K. A., and Soslow, L. J., J. Biomech. Eng., Vol. 121, pp. 598-604, 1999.
- [5] Robinson, P. S., et al., J. Biomech. Eng., Vol. 126, pp. 252-257, 2004.