骨折治癒過程における TGF- β とデコリンの 発現と局在について

鹿児島大学整形外科

松 元 光 生・酒 匂 崇

松 永 俊 二・稲 葉 浩 二

今 村 健 志・石 堂 康 弘

Expression and Distribution of Transforming Growth Factor- β and Decorin during Fracture Healing

by

Kosei Matsumoto, Takashi Sakou, Shunji Matsunaga,
Koji Inaba, Takeshi Imamura and Yasuhiro Ishidou

Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine,
Kagoshima University, Kagoshima, Japan

To study the interactions between TGF- β and decorin, we experimentally induced femoral fractures in rats and immunohistologically examined changes in the distribution of TGF- β and Decorin in the femur 3, 7, 14 days after fracture. In areas where endochondral ossification occurred, Decorin was detected during differentiation of mesenchymal cells into proliferating chondrocytes, but no TGF- β was observed during the same period. After the chondrocytes had hypertrophied, Decorin was no longer observed, while the matrix around the hypertrophic chondrocytes was positively stained for TGF- β . The disappearance of Decorin, almost simultaneously accompanied by the appearance of the active type TGF- β , suggests that Decorin regulates the action of TGF- β .

Key words : Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Decorin, 骨折治癒

緒 言

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) は、生体内では血小板に次いで骨に多く認められ、骨折仮骨や remodeling において重要な役割を果たしている。この TGF- β の調節因子としてプロテオグリカンの一種であるデコリンがあり、組織内で TGF- β と拮抗的に働くことが知られているが、生体組織での分布や機能についてはほとんど解明されていない。

今回我々は、TGF- β とその調節因子であるデコリンの骨形成における役割を知る目的でラット大腿骨の骨折治癒過程における TGF- β とデコリンの発現と局在を免疫組織生学的手法を用いて検討した。

対象および方法

実験動物として、生後 36~48 週の Wister rat を使用した。Bonnarens ら¹⁾の方法に準じ、大腿骨の中央部に骨折を作成し、それぞれ骨折作成後、3, 7, 14 日めに 3 匹ずつ屠殺し、大腿骨を en block に摘出した。10% 中性緩衝ホルマリンによる固定、水洗、EDTA による脱灰を行ない、パラフィン包埋し、組織切片を作成した。これらの対し、H/E 染色及び TGF- β 、デコリンの免疫染色をおこなった。免疫染色は、Avidin-Biotin Complex 法²⁾に準じて行ない、前処置としてデコリン染色では Chondroitinase ABC, TGF- β 染色では Hyaluronidase による酵素処理を加えた。核染はヘマトキシリン液を用いた。使

用した抗体は、King 醸造社の Polyclonal Rabbit anti-Human TGF- β IgG, TELIOS 社の Polyclonal Rabbit anti-Human PG40 であり、酵素処理以外は全て室温で行った。これらの抗体の対照として、同濃度の非感作ウサギ IgG を用いた。

結 果

1. 骨折後 3 日目

HE 染色：骨膜下の細胞が増殖し、好酸性の強い細胞間基質を形成しはじめていた。膜性骨化の所見が認められた。

抗 TGF- β 抗体染色：抗 TGF- β 抗体に陽性の組織は認められなかった。

抗デコリン抗体染色：増殖している骨膜下の細胞、その周囲の紡錘形の細胞が、抗デコリン抗体に弱く染色された。

2. 骨折後 7, 14 日目

HE 染色：7 日目になると、膜性骨化による骨基質の沈着は、さらに厚みを増し、その先端部には、硝子様軟骨の形成を認め、骨膜に近い部位においては、骨芽細胞が出現し、一部骨髄を形成し、内軟骨性骨化の所見が認められた。14 日目になると内軟骨性骨化による骨基質の沈着がさらに進行し、硝子様軟骨の周囲では、間葉系と思われる細胞から軟骨細胞が増殖・成熟・肥大していくのが順序よく観察された。

抗 TGF- β 抗体染色：肥大軟骨細胞の周囲の基質が抗 TGF- β 抗体陽性であった（図 1-a）。

抗デコリン抗体染色：硝子様軟骨組織の周囲の未分化間葉系細胞、増殖・成熟軟骨細胞、新しく沈着した骨基質、骨芽細胞が抗デコリン抗体に陽性であった。一方肥大軟骨細胞は、抗デコリン抗体に陰性であった（図 1-b）。

これらの免疫染色の対照として行った非感作 rabbit IgG に染まる組織は全経過を通じて認められなかった。

考 察

プロテオグリカンをはじめとして多くの細胞外基質蛋白が TGF- β と結合する性質をもっているが、最近、プロテオグリカンの一つであるデコリンが、TGF- β の拮抗物質であることが報告されている³⁾。

今回我々は、肥大軟骨細胞周囲の基質において

a. 抗 TGF- β 抗体染色

b. デコリン抗体染色

図 1 骨折 14 日目の組織像。a：抗 TGF- β 抗体染色及び b：デコリン抗体染色。図の上から下にむかって軟骨細胞の分化が進んでいる。未分化間葉系細胞 (u)，増殖軟骨細胞 (p) の細胞質と、肥大軟骨細胞 (h) 周囲の基質では、TGF- β とデコリンの染色性の解離が認められる（各々の細胞核は、ヘマトキシリン液により染色がなされている）

TGF- β の局在を示したが、肥大軟骨細胞周囲以外の軟骨組織では TGF- β は染色されなかった。我々の用いた抗体は TGF- β の中和活性を有しており⁴⁾、この肥大軟骨細胞周囲の TGF- β は活性型である可能性が高いと筆者らは推測している。Joyce ら⁵⁾ は、内軟骨性骨化の過程において肥大軟骨細胞から石灰化の始まる時期には、type I collagen や ALP の遺伝子発現のピークと、TGF- β の遺伝子の発現ピークが一致していると報告しており、また Carrington ら⁶⁾ も、脱灰骨基質による異所性骨化の実験例において、軟骨の石灰化に相当する時期に TGF- β は高値を維持すると報告している。肥大軟骨細胞周囲での活性型 TGF- β の局在は妥当であると考えられる。

このような内軟骨性骨化の過程において増殖・成熟軟骨細胞と肥大軟骨細胞とで TGF- β とデコリンの組織内解離は、軟骨細胞の増殖・分化における TGF- β の作用をデコリンが調節していることを証明しているひとつの所見である。

TGF- β の発現・産生調節はいまだ不明な点も多く、骨折治癒の進行を TGF- β とデコリンの相互作用だけで述べることは不可能である。しかし、内軟骨性骨化の過程において、免疫組織科学的にデコリンが証明される時期に TGF- β が証明されず、逆にデコリンの消退とほぼ時を同じくして TGF- β が証明されたことは TGF- β の調節因子としてのデコリンの役割を示唆す

るものである。

ま と め

①ラット大腿骨の骨折治癒過程における TGF- β とデコリンの発現と局在を免疫組織科学的手法を用いて検討した。

②内軟骨性骨化の過程において、TGF- β とデコリンの局在は鏡面像を呈しており、デコリンは TGF- β の作用を調節していることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Bonnarens, F. et al.: Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orth Res*, 2 : 97-101, 1988.
- 2) Hsu, S.M. et al.: Use of avidin-biotinperoxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 29 : 577-580, 1981.
- 3) Yamaguchi, Y. et al.: Negative regulation of TGF- β by the proteoglycan decorin. *Nature*, 346 : 281-284, 1990.
- 4) 稲葉浩二ら : OPLL 患者の脊柱靱帯由来細胞に対する TGF- β の影響. *日整会誌*, 67 : S1598, 1993.
- 5) Joyce, M.E. et al.: TGF- β in the regulation of fracture repair. *The Orth Clin of North America*, 21 : 199-209, 1990.
- 6) Carrington, J.L. et al.: Accumulation, localization and compartmentation of TGF- β during endochondral bone development. *J Cell Biology*, 107 : 1969-1975, 1986.