

「マトリックス分解酵素としてのカルパインの研究」

岐阜大学医学部整形外科 清水 克 時

関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)などの関節炎では、滑膜・関節液中のプロテアーゼが軟骨基質の主要成分であるプロテオグリカンやコラーゲンを分解し、関節軟骨が破壊される。このプロテアーゼとして近年軟骨代謝の分野では、MMPsやaggrecanaseなどのマトリックス分解酵素が広く知られている。一方で我々はRAやOAの関節で滑膜から関節液中に中性システインプロテアーゼであるカルパインが分泌されていること、またカルパインが強力な軟骨アグリカン分解活性を持つことを報告してきた。

Introduction

アグリカンはコンドロイチン硫酸とケラタン硫酸を側鎖として多く含むコンドロイチン硫酸プロテオグリカンファミリーの一つで、関節軟骨の細胞外マトリックス中でヒアルロン酸、リンクプロテインと会合し存在している主要な分子構造である。

関節炎osteoarthritis (OA) は関節軟骨がすり減り、関節機能の破綻をもたらすもので、高齢者の15-85%がこの疾患にかかっているといわれている。アグリカンの変性はOA進行の中心的な現象でアグリカンのコア蛋白が切断されて引き起こされる。このコア蛋白の切断メカニズムはアグリカナーゼやMMPといったプロテナーゼによって引き起こされることが分かっているが、その他のアグリカン変性に関するメカニズムはよく分かっていない。カルパインはカルシウム依存性のシステインプロテナーゼであり、当初細胞内プロテナーゼとして分類されていたが、その後、関節液や、関節の細胞外マトリックスにも存在することが分かったものである。本研究の目的はヒト関節軟骨での、アグリカン代謝におけるm-カルパインの機能を明らかにすることであり、ヒト関節軟骨中にm-カ

ルパインが産生したグリコサミノグリカン側鎖のついたアグリカンのフラグメントの存在とその局在を調べた。

Materials and methods

ヒト正常関節軟骨、ヒトOA関節軟骨は手術時に切除されたものを使用した。関節軟骨は10倍容量のグアニジン塩酸とプロテナーゼインヒビターを混合した抽出液で48時間攪拌してプロテオグリカンを抽出した。その後塩化セシウムの濃度勾配を利用して、ヒアルロン酸会合条件で遠心し、底から順にA1からA4に分画した。その後ヒアルロン酸非会合条件で再度遠心し、A1の区画をさらに底よりA1D1からA1D4に分画した。側鎖の処理は適宜コンドロイチナーゼABCや、ケラタナーゼを用いて処理した。ヒト関節軟骨アグリカンのコア蛋白のカルパインによる切断部位を認識する抗体は新たに切断断端のアミノ酸配列であるIVTQVVPGVAを抗原としてポリクローナル抗体(anti-VPGVA抗体)を作成した。分析はELISA, western blotting, immunohistochemistry, confocal imagingを用いておこなった。

Results

ヒトOA関節軟骨の抽出サンプルを側鎖処理してwestern blotを行った。Anti-VPGVA抗体とanti-G1抗体(G1 domainに対する抗体)を一次抗体として用いると140kDaのサイズのコア蛋白が検出された。これはヒト関節軟骨中にカルパインに関連したコア蛋白切断部位をC末端にもつアグリカンが存在することを示していた。またこのバンドはanti-G1抗体でも検出されることよりこのaggrecan productがG1ドメインを含んでいることを示していた。

次に遠心密度勾配を用いてA1D1からA1D4まで分画したサンプルをそれぞれwestern blotを行ったところ、A1D1からA1D4のすべての分画でanti-VPGVA陽性のバンドが検出された。これは関節軟骨中に存在するカルパインに切断されたアグリカンのコア蛋白に付着しているグリコサミノグリカンの量が一樣でないためにすべての分画中に検出されたと考えられる。

またOAの5症例から関節軟骨を抽出してwestern blotを行ったところ、すべてのサンプルでanti-VPGVA陽性のバンドが検出された。これはOAの関節軟骨には普遍的にカルパインに関連したコア蛋白切断部位をC末端にもつアグリカンが存在していることを示していた。

次に免疫組織染色を行った。ヒトOA関節軟骨をホルマリンにて固定し、パラフィン包埋したサンプルを用いた。Anti-VPGVA抗体を用いて染色したところ、軟骨のdeep zoneからintermediate zoneに軟骨細胞を中心に軟骨細胞周囲まではっきりと染色された。

またanti-VPGVA抗体とanti-m-calpain抗体を用いてconfocal imagingを行ったところ軟骨細胞中の核の周囲が共焦点した。これらのことは、VPGVAをC末端にもつアグリカンは軟骨細胞中のアグリカン合成過程で細胞内でm-カルパインによってコア蛋白を切断された状態で、細胞外マトリックスへ分泌され、軟骨

中でアグリカンとして細胞外マトリックスの構成分子として役割を果たしていると考えられた。

次にヒト成人正常軟骨を用いて、western blot及び免疫組織染色を行った。OA関節軟骨と同様にwestern blotではanti-VPGVA抗体で140kDaサイズのバンドと免疫組織染色では軟骨細胞周囲にanti-VPGVA抗体で陽性に染色された。ただこれらはOAの関節軟骨と比較すると薄く染まっており、OAと比較すると正常軟骨ではカルパインにより切断されたアグリカンの含有量は少ないと考えられた。

Discussion

本研究は初めてカルパインにより切断されたアグリカンがヒト関節軟骨中に存在することを報告したものである。このアグリカン切片はG1ドメインとG2ドメインを含んでおり、C末端のアミノ酸配列がVPGVA(G1-G2-GVAアグリカン)となるものである。このG1-G2-GVAは側鎖としてケラタン硫酸を含みプロテオグリカンとしての条件を満たしている。またヒアルロン酸との結合能力を保持している。ケラタン硫酸の機能はまだ明らかではないが、コラーゲン繊維がケラタン硫酸と結合してコラーゲンネットワークとして機能しているとの報告があり、G1-G2-GVAアグリカンはコラーゲン繊維と結合する機能を有している可能性がある。

カルパインは細胞内プロテナーゼとして考えられており、細胞内で粗面小胞体からゴルジ装置までに分布している。アグリカンは粗面小胞体からゴルジ装置にかけてコア蛋白が合成され、ケラタン硫酸やコンドロイチン硫酸などの側鎖が合成されていくことが分かっており、加齢変化や、病的状態にてカルパインが特異的にアグリカンの合成時にコア蛋白をあらかじめ切断してコンドロイチン硫酸鎖の少ないアグリカンを効率的に合成する働きをしている可能性があると考えられる。

今後、多症例でG1-G2-GVAアグリカンの発現量を分析し、病的状態や加齢による変化を調べG1-G2-GVAアグリカンの臨床的意義を調査していく必要がある。それと同時に関節軟骨においてm-カルパインがアグリカン代謝に与える役割を解明していく必要がある。

現在カルパインの基礎的データがでてきているので、今後臨床症例を多く分析することにより、臨床への応用が可能になると考えている。

主論文公表誌

Mature bovine articular cartilage contains abundant aggrecan that is C-terminally truncated at Ala719-Ala720, a site which is readily cleaved by m-calpain.

Biochemical Journal 382:253-9,2004