

原 著

## 軟骨特有の抗血管新生細胞外マトリックス タンパク質・コンドロモジュリン-Iの挙動

中村富美男・藤岡 哲・田中 誠一・片倉 友義・佐藤 昌弘・福永 重治  
北海道大学農学研究科畜産資源開発学講座, 札幌市北区 060-8589

### Behavioral properties of chondromodulin-I, which is an antiangiogenic cartilage-specific extracellular matrix protein, in tissue and in vitro

Fumio NAKAMURA, Tetsu FUJIOKA, Masakazu TANAKA, Tomoyosi KATAKURA,  
Masahiro SATO and Shigeharu FUKUNAGA

Research Group of Animal Product Science, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University,  
Kita-ku, Sapporo-shi 060-8589

キーワード : ウシ軟骨, 細胞外マトリックス, 血管新生抑制タンパク質, コンドロモジュリン-I, 挙動特性  
Key words : bovine cartilage, extracellular matrix, antiangiogenic protein, chondromodulin-I, behavioral  
property

#### Abstract

The behavior of chondromodulin-I (ChM-I), which is an antiangiogenic cartilage-specific extracellular matrix protein, was investigated in cartilage tissue and *in vitro*.

The localization of ChM-I in both cartilage tissue and cultured chondrocytes resembled that of type II collagen. ChM-I was not eluted from intact cartilage but was eluted from dissected cartilage into culture medium, inhibiting attachment to the culture dish and growth of endothelial cells. The ChM-I secreted from chondrocytes being after transiently retained on the cell membrane was solubilized in the culture medium and solidified as an extracellular network. These results suggest that ChM-I is trapped by but not fixed on collagen fibrils in cartilage tissue and that it is essential for maintenance of the cartilage as avascular tissue, although it does not play a major structural role as an extracellular matrix of the cartilage framework.

#### 要 約

血管新生抑制作用を有する軟骨特有の細胞外マトリックスタンパク質であるコンドロモジュリン-I (ChM-I) の軟骨組織および軟骨細胞の培養系における挙動を調べ、ChM-I の軟骨における存在様式と役割を検討した。

ChM-I の局在は、軟骨組織および培養軟骨細胞の両方において、II型コラーゲンの局在と類似していた。ChM-I は、無傷の軟骨片からは溶出しなかったが、軟骨基質を切開した軟骨片からは生理的条件下の培養液中に溶出し、血管内皮細胞の培養ディッシュへの接着

と増殖を抑制した。軟骨細胞で合成された ChM-I は、一旦細胞膜上に保持された後に分泌され、細胞外に分泌された ChM-I は、生理的条件下の培養液中で可溶化した状態で存在するとともに、網目状の細胞外基質として固相化された。これらの結果から、ChM-I は、軟骨組織ではコラーゲン細線維に捕縛されて存在しているが固定不動化はされておらず、無血管組織としての軟骨の恒常性維持にとっては必要不可欠な細胞外マトリックス成分であるが、軟骨の骨格構造を維持する機能は小さいと考えられた。

#### 緒 言

哺乳動物の体内には、眼球の角膜、レンズ、硝子体など遅栄養または無血管組織と呼ばれる組織が存在

し、軟骨にも、特に関節軟骨は膨大な圧力を吸収する機能ゆえに、血管と神経が存在しない。軟骨を無血管組織として維持しているシステムの全容は明らかにされていないが、血管新生抑制作用を有する軟骨特有の細胞外マトリックス (ECM) タンパク質であるコンドロモジュリン-I (ChM-I) が最も重要な役割を担っていると考えられている (鈴木, 1996)。ChM-I は当初、軟骨細胞の成長因子として発見されたが (HIRAKI *et al.*, 1991), その後、血管内皮細胞の増殖阻害活性が明らかにされ (HIRAKI *et al.*, 1997A), 現在、癌の抗血管新生療法、いわゆる「兵糧攻め」のための強力な武器として、また、動物体に由来する生体医薬としての開発が進められている (HIRAKI *et al.*, 1999; 鈴木, 1999)。しかし、ChM-I に関する研究は、遺伝子発現、アミノ酸配列、生体内外での血管新生抑制効果に集中しており (HIRAKI *et al.*, 1997B; HAYAMI *et al.*, 1999; NAKAMURA *et al.*, 2000; YANAGIHARA *et al.*, 2000), 軟骨内での ChM-I の存在様式等は明らかにされていない。無血管・神経組織における ECM の特徴や役割を明らかにすることは、畜産資源としての軟骨等の付加価値を高めるためには極めて重要であり、本研究では、ChM-I の軟骨での局在や培養系での挙動を調べ、軟骨における ChM-I の存在様式と役割を検討した。

## 材料および方法

### 供試動物

屠殺場より入手した胎齢 5-7 ヶ月のウシ胎子 (4 頭) より、肋軟骨および臍帯動脈を採取し、実験に供試した。

### 軟骨片および組織切片の調製

疎性結合組織だけをを取り除いた無傷 (intact) の軟骨片と軟骨膜も除去し切開した軟骨片 (dissected) を調製した。軟骨の組織切片は、無傷の軟骨片を OCT コンパウンド (Tissue-Tek; SAKURA, Tokyo) に包埋し凍結後、クリオスタット (CM 3000; Leica, Germany) を用いて肋軟骨長軸を横断する厚さ 6  $\mu\text{m}$  に薄切し、凍結横断切片として作成した。スライドグラスに密着させた切片は、ヘマトキシリン・エオシン染色、トルイジンブルー (TB) 染色および免疫染色に供試した。

### 細胞の調製と培養

軟骨細胞は、切開した軟骨片をさらに 1 mm 角程度に細切し、培養ディッシュに付着させ 3 週間器官培養し、軟骨細胞を軟骨組織片から遊出させる組織片遊出培養法により調製した (黒木, 1990)。血管内皮細胞は、HOSHI and MCKEEHAN (1984) の方法により調製した。すなわち、臍帯動脈内腔の血液を生理食塩水 (PBS)

で洗浄した後、0.2% ディスパーゼ (Sigma, USA) を含む PBS による 37°C, 45 分間処理により分離した細胞を、血管内皮細胞として回収した。

上記によって得られた軟骨および血管内皮細胞は、10% ウシ胎子血清 (FBS; JRH biosciences, USA), 100 IU/ml ペニシリン (Nacalai, Kyoto), 100 mg/ml ストレプトマイシン (Nacalai), 18 mM HEPES (Nacalai) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma) を成長培養液として用い、5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 湿度 100%, 37°C に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。継代培養に当たっては、1 継代で細胞数が倍加するように調整し、軟骨細胞では 3-5 継代細胞を、血管内皮細胞では 5-8 継代細胞を実験に用い、各実験は、3 重培養 (n=3) で行った。

### ChM-I の溶出試験

無傷および切開した軟骨片 2 種類を各々 6 穴プレート (Becton Dickinson, USA) 底面に付着させ、成長培養液に懸濁した血管内皮細胞 ( $4 \times 10^4$  個) を播種した。培養 2, 10, 12, 24 および 48 時間後に、軟骨片から生理的条件下の培養液に溶出した ChM-I が血管内皮細胞に及ぼす影響を倒立位相差顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo) 下で観察した。

### ChM-I の培養系における挙動試験

分泌時および細胞外での ChM-I の挙動を、培養軟骨細胞の免疫染色と培地が細胞増殖に及ぼす影響によって調べた。

軟骨細胞 ( $5 \times 10^3$  個) を 8 穴のラプテックチャンバースライド (Nalge Nunc, USA) に播種し、成長培養液を用いて 3 週間培養後に免疫染色に供試した。

軟骨細胞を高密度に群生した状態に保ち、4 日毎に回収した培養液を濾過 (ADVANTEC DISMIC-25CS; Toyo Roshi, Tokyo) し、軟骨細胞馴化培地として用いた。血管内皮および軟骨細胞各  $4 \times 10^4$  個を 6 穴プレート (Becton Dickinson) に播種し、成長培養液 (コントロール) と軟骨細胞馴化培地を用いて培養した。各培養液は 2 日毎に交換し、血管内皮細胞については 2 日毎、軟骨細胞は 4 日毎に細胞数を測定した。

### 免疫染色

軟骨の組織切片および培養細胞の免疫染色は、間接蛍光抗体法によって行った。無処理およびグリコサミノグリカン (GAG) を除去するために精巢由来のヒアルロニダーゼ (Biozyme, UK) 溶液 (10 mg/ml in PBS) で 37°C, 30 分間処理した切片と培養細胞を PBS で洗浄し、10% ホルマリン (Wako, Osaka) を含む PBS で 5 分間固定し再度 PBS で洗浄した。Triton X-100 (Wako) を 1% 含む PBS に 5 分間浸漬した後、0.05% Tween 20 (Nacalai) を含む PBS (T-PBS) で

洗浄し、非特異的反応を防止するために3%カゼイン(Nacalai)と1%BSA(Sigma)を含むT-PBS(ブロッキング液)で37℃、30分間処理した。ブロッキング液で希釈した一次抗体と37℃で90分間反応させT-PBSで洗浄した後、200倍に希釈した二次抗体(FITC conjugated anti-rabbit IgG; Cappel, USA)と37℃で30分間反応させた。染色標本は、T-PBSで洗浄後、Perma Fluor (Lipshaw, USA)で封入し蛍光顕微鏡(OLYMPUS)で観察した。なお、一次抗体には、20倍

に希釈した anti-bovine chondromodulin-I (NAKAMURA *et al.*, 2000)と300倍に希釈した anti-bovine type II collagen (LB-1297; LSL, Tokyo)を使用した。

## 結 果

### ChM-Iの軟骨組織における局在

ウシ胎子肋軟骨において、軟骨膜はエオシンにより赤染され、軟骨基質はTBの異染色性により全体が紫

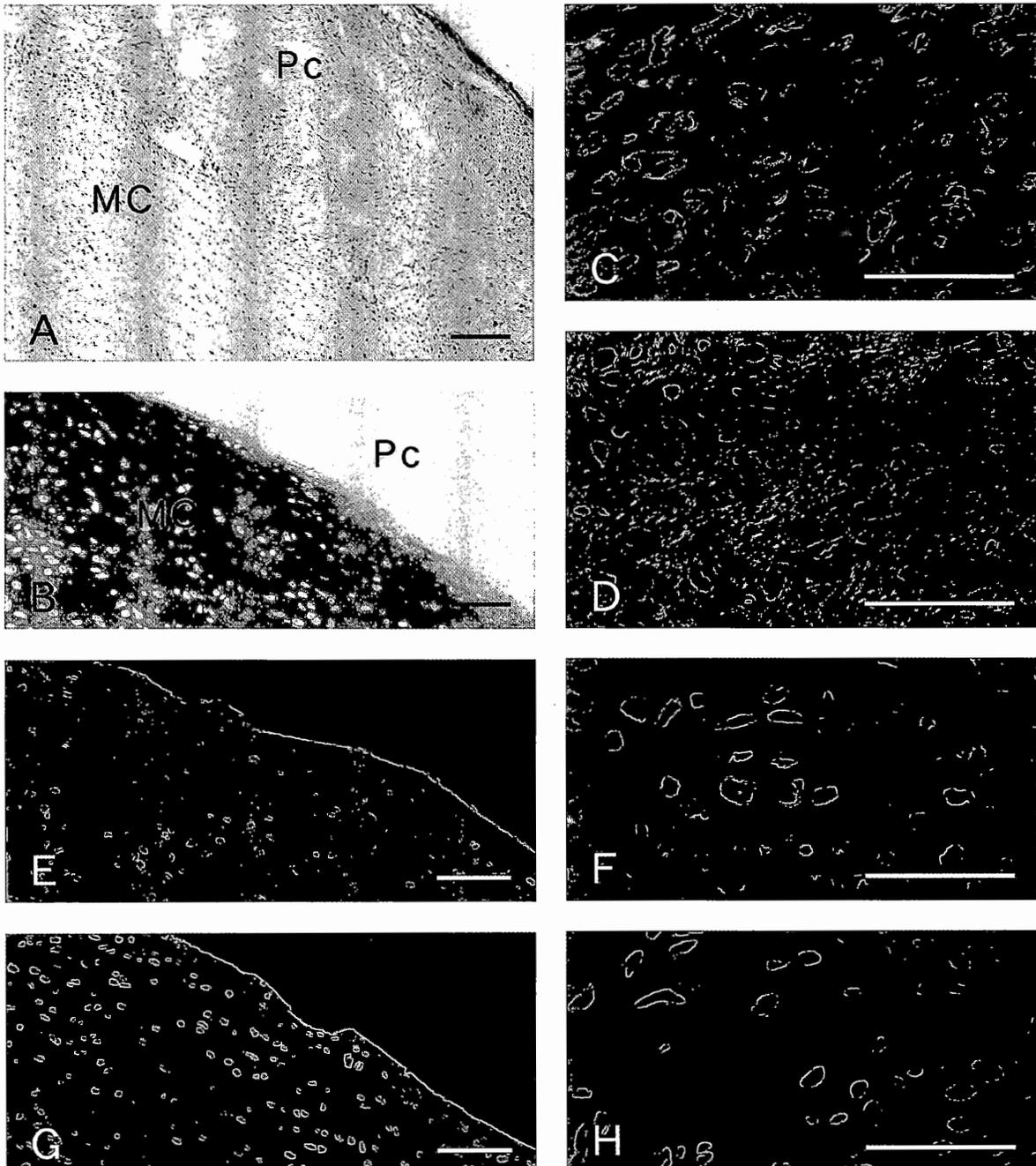


Fig. 1. Immunolocalization of chondromodulin-I and type II collagen in cartilage tissue. Cross sections of fetal bovine costal cartilage were stained with hematoxylin and eosin (A), toluidine blue (TB; B), anti-ChM-I (C, E, F) or anti-type II collagen antiserum (D, G, H) and photographed under a normal optical microscope (A, B) or an epifluorescent microscope (C-H). E-H were treated with hyaluronidase before staining but A-D were not. Matrix cartilaginea (MC) showed positive reaction with TB, anti-ChM-I and anti-type II collagen antisera, but perichondrium (Pc) was not stained with them. Scale bars, 100 $\mu$ m.

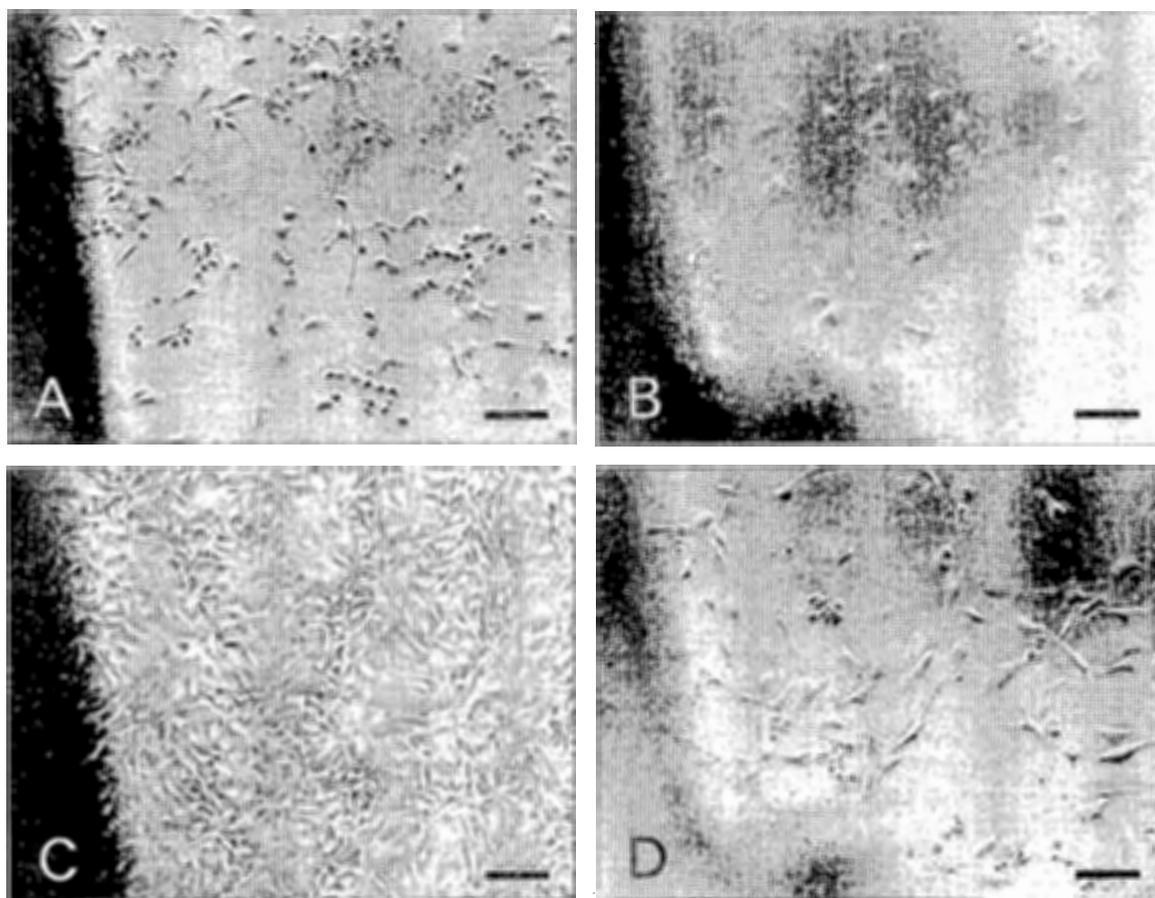


Fig. 2. Inhibitory effect of dissected cartilage on the attachment and growth of endothelial cells. Bovine vascular endothelial cells were plated on culture dishes containing intact (A, C) or dissected cartilage (B, D), and photographed after 2 (A, B) and 48 h (C, D) of culture under a phase-contrast microscope. Endothelial cells were attached to the culture dish around intact cartilage and increased exponentially, but they did not grow around dissected cartilage. Scale bars, 100 $\mu$ m.

染されていた (Fig. 1 A, B). 無処理切片を用いた免疫染色において, ChM-I は軟骨細胞が存在する小腔周囲だけが強い陽性反応を示し (Fig. 1 C), II 型コラーゲンは小腔周囲の細胞領域基質に加え, 領域間基質における散在性の陽性反応が観察された (Fig. 1 D). ヒアルロニダーゼ処理により GAG を除去した切片では, 抗 ChM-I および II 型コラーゲン抗体によって, 軟骨膜は染色されていないが, 軟骨基質は全体的に染色され (Fig. 1 E, G), 拡大像においては, 細胞領域基質, 領域間基質がほぼ均一に両抗体により染色されていた (Fig. 1 F, H).

#### ChM-I の軟骨片からの溶出

軟骨膜を有する無傷の軟骨片の周囲では, 播種 2 時間後でも相当数の血管内皮細胞が培養ディッシュに接着しており (Fig. 2 A), 48 時間後には, 指数関数的に増殖した細胞によりディッシュ底面が覆われていた (Fig. 2 C). 一方, 軟骨膜を除去し基質を切開した軟骨片周囲では, 播種 2 時間後にディッシュに接着している細胞数が無傷の軟骨周囲に比して少なく, 48 時間

後でも血管内皮細胞の顕著な増加は観察されなかった (Fig. 2 B, D). 図示はしなかったが, 播種 10 時間後には接着していた細胞が 12 時間後には剥離する像も観察されたが, 切開した軟骨周辺でのこれらの現象は, 抗 ChM-I 抗体 (IgG 画分) を予め培養液に添加した場合には観察されなかった.

#### ChM-I の培養軟骨細胞層における局在

単層培養したチャンパー中央部の軟骨細胞は, 抗 ChM-I 抗体によって核以外の細胞質が染色されるとともに, その細胞層上部では線維状の陽性反応による比較的大きな網目構造が観察された (Fig. 3 A). 一方, 中央部より細胞密度が高い辺縁部では, 抗 ChM-I 抗体によって軟骨細胞外周部が網目様に強染されていた (Fig. 3 B). 異なるチャンパーを抗 II 型コラーゲン抗体によって染色した場合も, 細胞密度が比較的低い中央部の細胞層上部では ChM-I と類似した大きな網目構造が観察され (Fig. 3 C), 辺縁部の軟骨細胞は核以外の細胞質が点状に染色されていたが, 細胞膜外周部の染色像は観察されなかった (Fig. 3 D).

軟骨細胞馴化培地が細胞の増殖に及ぼす影響

軟骨細胞馴化培地により、血管内皮細胞の増殖は抑制され、軟骨細胞の増殖は促進された (Fig. 4). コントロールの成長培養液による8日間の培養によって血管内皮細胞は、 $4 \times 10^4$  個から  $6 \times 10^5$  個に増加したのに対し、軟骨細胞馴化培地中では半分以下の  $2.8 \times 10^5$  個に達しただけであった。一方、軟骨細胞は、成長培養液によっては12日間で  $2.8 \times 10^5$  個に増加しただけだが、軟骨細胞馴化培地中では倍近い  $5 \times 10^5$  個に達していた。なお、これら軟骨細胞馴化培地の細胞増殖抑制および促進効果は、抗 ChM-I 抗体 (IgG 画分) の添加により中和された (図示せず)。

考 察

軟骨基質は、II 型、IX 型および XI 型コラーゲンからなるヘテロなコラーゲン細線維のネットワーク構造を基本骨格として、ヒアルロン酸がこの骨格を縦横に結び付け、アグリカン等のプロテオグリカンがその間隙を充填することにより形成されている (BLASCHKE *et al.*, 2000). ChM-I は、ヒアルロン酸およびプロテオグリカンの GAG 鎖を除去する事により、II 型コラーゲンと同様、基質全体での存在が観察された。従って、ChM-I は、軟骨基質において、コラーゲン細線維に直接結合していると考えられ、このことは、単離し

た ChM-I がコラーゲンゲルに吸着されること (NAKAMURA *et al.*, 2000) および培養軟骨細胞層の免疫染色において、ChM-I と II 型コラーゲンは類似した細胞外の大きな網目状に局在していたことによっても示唆された。

しかし、ChM-I は、コラーゲン細線維上に固定不動化されてはいなかった。なぜなら、ChM-I は、軟骨膜を有し基質が損傷を受けていない無傷の軟骨片からは溶出しなかったが、基質を切開した軟骨片からは、生理的条件下の培養液に溶出し、血管内皮細胞の接着と増殖を抑制したからである。さらに、軟骨細胞馴化培地が血管内皮細胞の増殖を半減させ、軟骨細胞の増殖を倍加させたことは、軟骨細胞で合成され培養液中に分泌された ChM-I は、細胞外の網目構造に固相化される以上の割合で可溶化した状態で培養液中に存在していることを示唆しており、ChM-I 自体では固体化し難いと考えられるからである。

一方、ChM-I が生理的条件下で容易に組織から溶出し、培養細胞から分泌された後も生理的条件下で可溶化していることは、ChM-I は軟骨特有の ECM タンパク質ではあるが、軟骨の骨格構造形成に対する寄与が小さいことを意味している。この ChM-I の軟骨における存在様式は、ChM-I の軟骨細胞増殖促進活性と血管新生抑制活性がいずれも液性因子として見いだされた

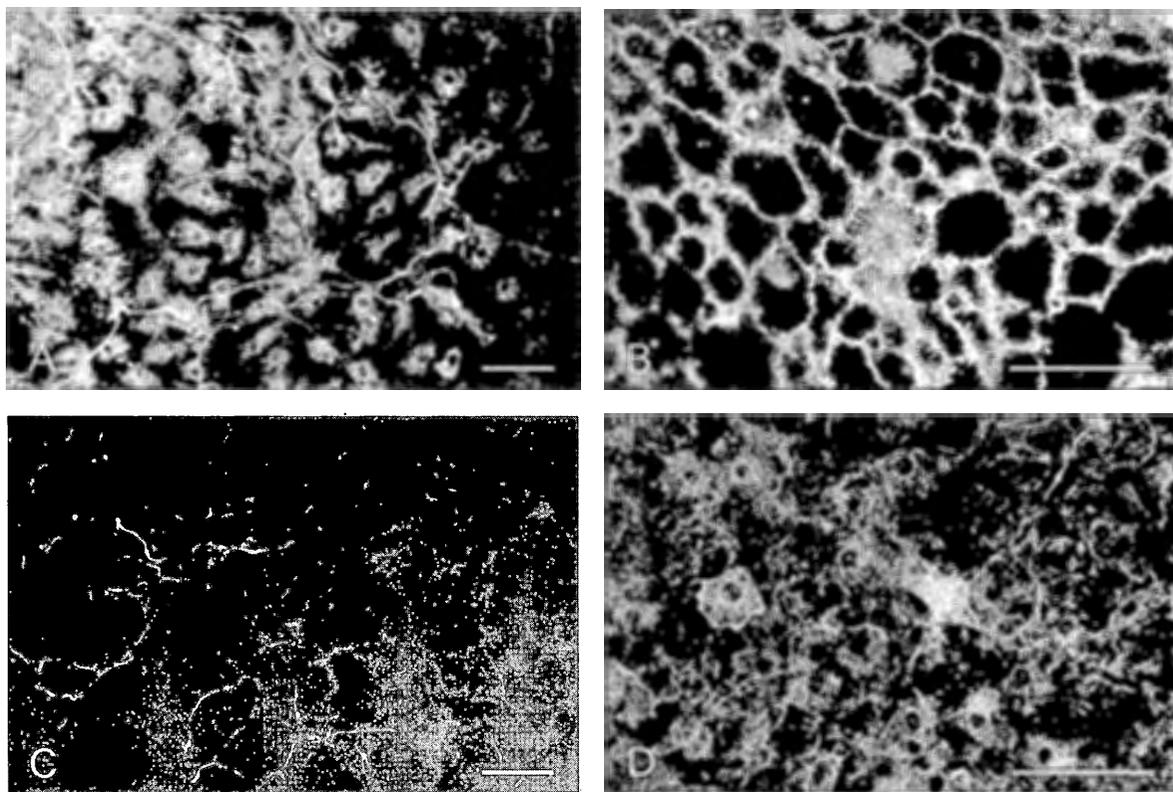


Fig. 3. Immunolocalization of chondromodurin-I and type II collagen in cultured chondrocytes. Chondrocytes cultured for 3 weeks in growth medium were stained with anti-ChM-I (A, B) or anti-type II collagen antiserum (C, D). The central regions (A, C) and the peripheral regions of culture chambers (B, D) are shown. Fibrous extracellular networks were observed in A and C. Scale bars,  $100 \mu\text{m}$ .

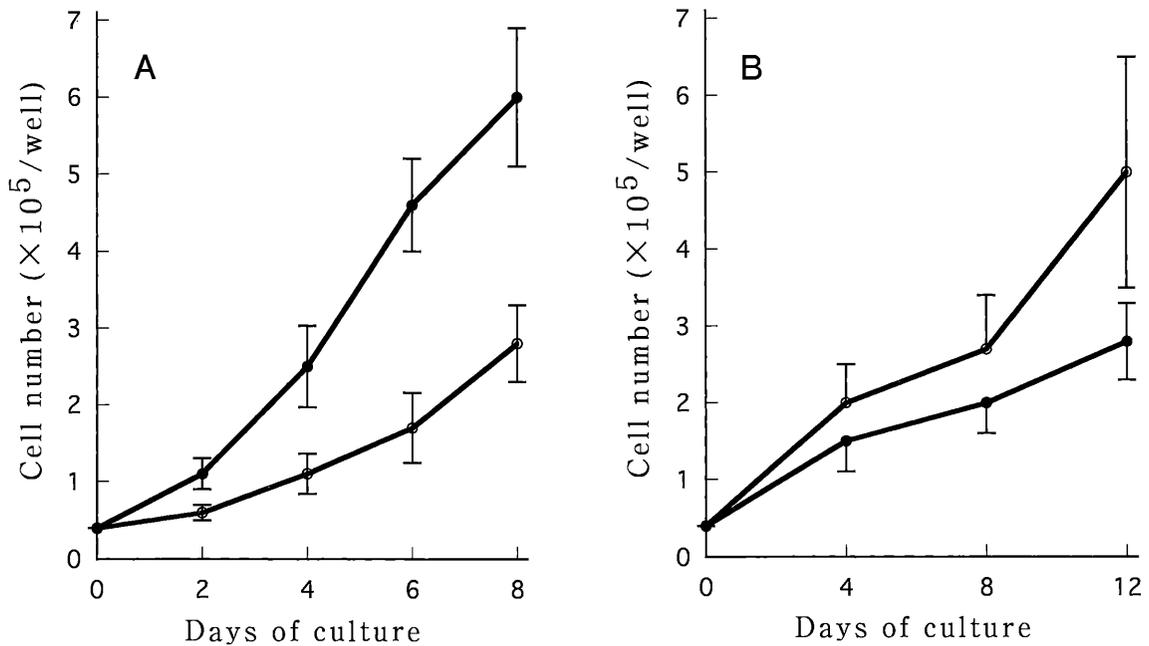


Fig. 4. Effects of chondrocyte conditioned medium on the proliferation of endothelial cells and chondrocytes. Bovine vascular endothelial cells (A) and chondrocytes (B) were cultured in control growth medium (●) or chondrocyte conditioned medium (○). The chondrocyte conditioned medium inhibited the growth of endothelial cells but stimulated that of chondrocytes. Vertical lines indicate SD.

こと (HIRAKI *et al.*, 1991; HIRAKI *et al.*, 1997A) からも支持される。

本研究で得られた実験結果と上記の考察を統合すると、ChM-Iの軟骨組織における存在様式および役割は以下の様に総括される。軟骨細胞で合成されたChM-Iは、Fig. 3 Bで観察された様に一旦細胞膜上に保持され、細胞膜外のChM-Iが酵素により切断され、成熟型ChM-Iとして分泌される (HIRAKI *et al.*, 1997A)。分泌された成熟ChM-Iは、培養系においてはFig. 3 Cで観察された大きな網目状に、軟骨組織では細胞領域および領域間基質に大量に存在するコラーゲン細線維 (Fig. 1 G) に捕縛され、Fig. 3 AおよびFig. 1 Eの様にII型コラーゲンと共存している。そして通常は、マトリクリン、すなわち、コラーゲン細線維を介したマトリックス—自己分泌機構により軟骨細胞の増殖調節に関与しているが、軟骨基質が損傷を受けた場合には、基質外にも溶出して、軟骨膜からの血管の侵入を防ぐ。従って、ChM-Iは、無血管組織としての軟骨の恒常性維持にとっては必要不可欠なECM成分であるが、軟骨の骨格構造を維持する機能は小さいと考えられた。

## 文 献

BLASCHKE, U. K., E. F. EIKENBERRY, D. J. S. HULMES, H. J. GALLA and P. BRUCKNER (2000) Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J. Biol. Chem.*, **275**: 10370-10378.

HAYAMI, T., C. SHUKUNAMI, K. MITSUI, N. ENDO, K. TOKUNAGA, J. KONDO, H. E. TAKAHASHI and Y. HIRAKI (1999) Specific loss of chondromodulin-I gene expression in chondrosarcoma and the suppression of tumor angiogenesis and growth by its recombinant protein *in vivo*. *FEBS Letters*, **458**: 436-440.

HIRAKI, Y., H. TANAKA, H. INOUE, J. KONDO, A. KAMIZONO and F. SUZUKI (1991) Molecular cloning of a new class of cartilage-specific matrix, chondromodulin-I, which stimulates growth of cultured chondrocytes. *Biochem. Biophys. Commun.*, **175**: 971-977.

HIRAKI, Y., H. INOUE, K. IYAMA, A. KAMIZONO, M. OCHIAI, C. SHUKUNAMI, S. IJIMA, F. SUZUKI and J. KONDO (1997A) Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. Purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.*, **272**: 32419-32426.

HIRAKI, Y., T. KONDO, M. SATO, C. SHUKUNAMI and J. KONDO (1997B) Inhibition of DNA synthesis and tube morphogenesis of cultured vascular endothelial cells by chondromodulin-I. *FEBS Letters*, **415**: 321-324.

HIRAKI, Y., K. MITSUI, N. ENDO, K. TAKAHASHI, T. HAYAMI, H. INOUE, C. SHUKUNAMI, K. TO-

- KUNAGA, T. KONO, M. YAMADA, H. E. TAKAHASHI and J. KONDO (1999) Molecular cloning of human chondromodulin-I, a cartilage-derived growth modulating factor, and its expression in chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Biochem.*, **260**: 869-878.
- HOSHI, H. and W. L. MCKEEHAN (1984) Brain- and liver cell-derived factors are required for growth of human endothelial cells in serum-free culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**: 6413-6417.
- 黒木登志夫(1990) 新化学実験講座 18 細胞培養技術. 分離培養の項執筆. 日本生化学会編. 115-223. 東京化学同人. 東京.
- NAKAMURA, F., T. FUJIOKA, Y. HIRAOKA, Y. KUBO and S. FUKUNAGA (2000) Inhibitory effects of bovine cartilage chondromodulin-I on angiogenesis in vitro. *Anim. Sci. J.*, **71**: 486-493.
- 鈴木不二男(1996) コンドロモジュリン-I. *組織培養*, **22**: 264-268.
- 鈴木日出夫(1999) 血管新生阻害剤と癌の抑制. *実験医学*, **17**: 747-752.
- YANAGIHARA, I., M. YAMAGATA, N. SAKAI, C. SHUKUNAMI, H. KURAHASHI, M. YAMAZAKI, T. MICHIGAMI, Y. HIRAKI and K. OZONO (2000) Genomic organization of the human chondromodulin-I gene containing a promoter region that confers the expression of reporter gene in chondrogenic ATDC5 cells. *J. Bone & Mineral Res.*, **15**: 421-429.

