

S22004

## 放射光赤外分光を用いた生体アパタイトおよび細胞外マトリックスの分析

**Analysis of biological apatite and extracellular matrix using synchrotron infrared spectroscopy**

足立 哲也<sup>a</sup>, 宮本 奈生<sup>a</sup>, 今村 隼大<sup>a,b</sup>, Giuseppe Pezzotti<sup>a,b</sup>  
Tetsuya Adachi<sup>a</sup>, Nao Miyamoto<sup>a</sup>, Hayata Imamura<sup>a</sup>, Giuseppe Pezzotti<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>京都府立医科大学医学研究科歯科口腔科学, <sup>b</sup>京都工芸繊維大学工芸科学研究科セラミック物理学研究室

<sup>a</sup>Department of Dental Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, <sup>b</sup>Ceramic Physics Laboratory, Kyoto Institute of Technology

e-mail: t-adachi@koto.kpu-m.ac.jp

ハダカデバネズミは顕著な老化耐性を持つげっ歯類であり、その老化因子を特定できれば、加齢による骨の脆弱化の予防や健康寿命の延伸につながると考えられる。ハダカデバネズミの骨軟骨組織（下顎頭、上肢）の分子構造を解析し、通常マウスと比較することで、老化因子の特定を試みた。デバネズミの軟骨には通常マウスと比べてグリコサミノグリカンやII型コラーゲンが多く含まれることが判明した。

The naked mole rat is a rodent with remarkable aging tolerance, and if its aging factors could be identified, it would lead to prevention of age-related bone fragility and extension of healthy life span. We attempted to identify aging factors by analyzing the molecular structure of the bone and cartilage tissues (mandibular head and upper limbs) of the naked mole rat and comparing them with those of normal mice.

**Keywords:** Spectroscopy, Hydroxyapatite, Orientation, Proteoglycan, Type II collagen

**背景と研究目的**

超高齢社会において骨軟骨疾患は増加すると予想されるため、その対策が喫緊の課題となっている。ハダカデバネズミは最長寿のげっ歯類であり、顕著な老化耐性と発がん耐性を示す。ハダカデバネズミは高分子ヒアルロン酸を産生することで老化耐性を発揮するとされているが、その詳しいメカニズムはあまり知られていない。ハダカデバネズミの高分子ヒアルロン酸については、培養細胞系を用いての機能解析の報告はあるものの、生体内で高分子ヒアルロン酸がどのように分布し、どのような影響を与えているかは、ほとんど報告されていなかった。ハダカデバネズミが産生する特徴的な高分子ヒアルロン酸と抗老化の関係を解明するためには、生体内で分子量の違いを分別し可視化する方法が必須となるが、そのような解析方法はこれまで存在していない。そこで、非破壊的に物質の構造を分子レベルで解析できる赤外分光法に注目した。赤外分光法はヒアルロン酸の分子量の識別が可能であり、非侵襲的に骨と軟骨を同時に解析、さらにハイドロキシアパタイト (HAp) の結晶性やコラーゲンの架橋度を解析することが可能である[1-3]。

本研究では、ハダカデバネズミおよび比較対象となる通常マウスの骨軟骨組織の軟骨基質 (II型コラーゲン、プロテオグリカン、ヒアルロン酸(グリコサミノグリカン)) の質や局在を評価する。

本法により、ハダカデバネズミの抗老化メカニズムを明らかにできれば、加齢疾患である骨粗鬆症や変形性関節症の予防および健康寿命の延伸につながると考えられる。

**実験**

54週齢のハダカデバネズミおよびマウスの下顎頭、上肢の組織を樹脂包埋し、切片を作成した。10 μmに薄切した切片はフッ化バリウム (BF) 基板にマウントした。BL-15の赤外顕微鏡により HAp (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (1200-900 cm<sup>-1</sup>)、I型コラーゲン (Amide I) (1720-1590 cm<sup>-1</sup>)、II型コラーゲン (1338 cm<sup>-1</sup>)、

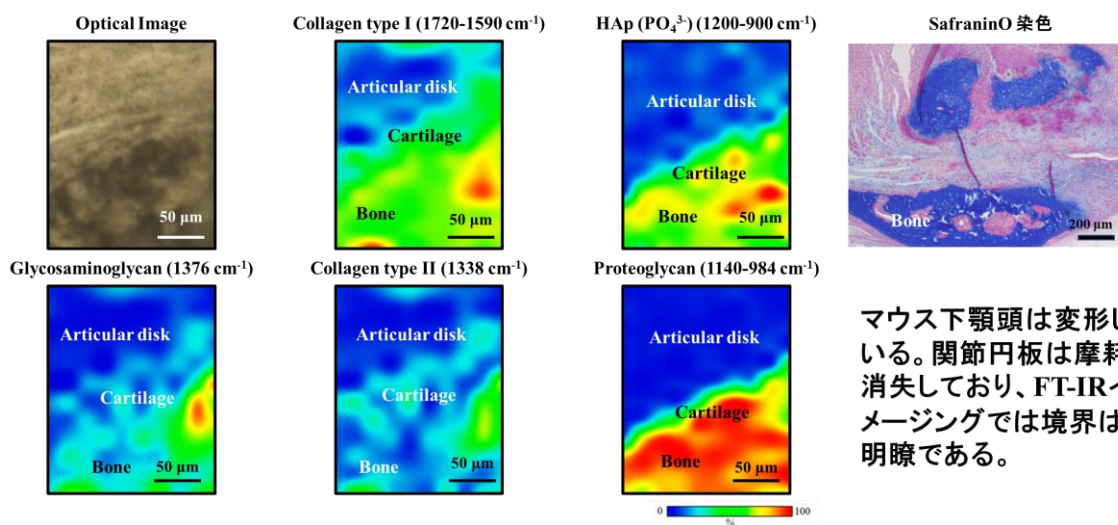
プロテオグリカン ( $1140-984\text{ cm}^{-1}$ )、グリコサミノグリカン ( $1376\text{ cm}^{-1}$ ) の局在を解析し、ハダカデバネズミとマウスの違いを比較した。

### 結果、および、考察

HE 染色ではハダカデバネズミはマウスと比較し、上肢関節におけるタイドマーク（軟骨層と石灰化軟骨層の境界）が明瞭であることが明らかとなった。一方、マウスのタイドマークは不明瞭であり軟骨の摩耗を認めた。また、サフランin O 染色ではハダカデバネズミの上肢軟骨は濃染されており、グリコサミノグリカン（ヒアルロン酸含む）が多量に存在することが明らかとなった。FT-IR イメージングでは、ハダカデバネズミのグリコサミノグリカンと II 型コラーゲンは共局在しており、同様の所見を得ることができた。プロテオグリカンは HAp と同様に分布していたが、これは波数領域が重なっているためだと考えられる。

Adachi 等は今までに BL-15 ビームラインを用いた FT-IR 分析により、 $\alpha$ -ヘリックスを有するコラーゲンが軟骨の剛直性に影響を及ぼすことを報告した[4]。また、変形性関節症では、軟骨基質のヒアルロン酸の減少によって剛直性の  $\alpha$ -ヘリックスを有するコラーゲンが減少し、相対的に屈曲性のランダムコイルを有するコラーゲンが増加し、タンパク質の 2 次構造が変化することが知られている[5]。一方、ハダカデバネズミは高分子ヒアルロン酸を分泌して軟骨面の摩擦抵抗を軽減・保護することで、変形性関節症に抵抗性を示すことが報告されており、今回の結果では軟骨基質のグリコサミノグリカンによって、軟骨中のコラーゲンの  $\alpha$ -ヘリックス構造が維持されたと考えられる。今後は免疫染色等でコラーゲンの変性を検出し、統合的な分析を行うことでグリコサミノグリカンの組織保護効果を検証する。

### マウス顎関節のFT-IRイメージング



マウス下顎頭は変形している。関節円板は摩耗し、消失しており、FT-IR イメージングでは境界は不明瞭である。

### 参考文献

- [1] Boskey A. et al., *Biomaterials*, 28(15), 2465 (2007).
- [2] Yin J., et al., *Biomedical Optics Express*, 2(4), 937 (2011).
- [3] Adachi T. et al., *Materials*, 13(19), 4275 (2020).
- [4] Adachi T. et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 23(15), 8099 (2022).
- [5] Pezzotti G. et al., *Mater. Today Bio*, 13, 100210 (2022).

### 研究成果公開方法／産業への応用・展開について

- ・本研究成果は国際科学雑誌にて成果発表予定である。また、今後は科研費や JST 等の競争的研究費に申請する。