

2 科学の箱馬車

骨軟骨代謝と馬の臨床

鹿児島大学農学部 獣医外科学教室 教授 三角 一浩

1 . はじめに

競走馬の骨軟骨に対するトレーニング効果を判定する、あるいは骨折や関節症を予測するために骨軟骨代謝に関する理解が深まりつつあるが、骨軟骨代謝の変化を踏まえて、馬の運動・調教を行なうまでには至っていない。古典的な経験的手法に基づくトレーニングが主流であり、学界はそれを正当化あるいは批判すべき科学的な根拠を明確に示すことができていない。我々はこれまで馬の骨関節疾患の分子病態に関心を持ちながら研究を進めてきた。本稿では骨軟骨基質の産生と代謝における基本的な知識や馬における研究成果について概説し、臨床現場で考察するための一資料としてお目通しいただきたい。

2 . 骨基質と代謝

骨組織の形成とその基質代謝には、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞が関わる。骨芽細胞は、骨代謝の活発な司令塔であり、軟骨細胞と同じ間葉系幹細胞を起源としている。活性型骨芽細胞は、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を有し、Ⅰ型コラーゲン、オステオカルシン、デコリンなどの細胞外基質 (ECM) や FGF、TGF- β 、BMP などの増殖因子などを産生し、骨石灰化部との間に類骨を形成する。休止期骨芽細胞の一部は細胞表面にとどまり、bone lining cell として類骨を介さずに石灰化部に直接、接して存在し、骨表面でのイベントを破骨細胞に知らせる。一部の休止期骨芽細胞は表面から骨基質内に埋没し、骨細胞となって骨小腔にとどまり、骨細管を通じて細胞間ネットワークを形成して、骨内部におけるメカニカルセンサーとして機能する。骨吸収に関わる破骨細胞は、血液幹細胞に由来する細胞であり、一般的には骨芽細胞による制御の下に分化誘導が促される。活性型破骨細胞は、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (tartrate resistant acid phosphatase; TRAP) 陽性、カルシトニン受容体陽性であり、カテプシン K やマトリックスメタロプロテアーゼの作用により骨基質の分解吸収を担う。

骨化のプロセスには、膜性骨化と軟骨内骨化の2つがある。膜性骨化は、骨膜に存在する間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化し、類骨形成と石灰化によって骨を形成する過程であり、長管骨では、成長期における骨の太さ (径) を決める。軟骨内骨化では、軟骨細胞が作る石灰化軟骨基質を中心に、同じ細胞起源である骨芽細胞や血管内皮細胞等が骨髄側より出現し、骨芽細胞性骨組織へ転換していく。発育期の骨端部における軟骨内骨化 (一次骨化中心) が長管骨の関節の大きさと形状は、二次骨化中心における軟骨内骨化で決められる。

骨のリモデリングは、活性 吸収 反転 形成 休止のプロセスからなる。破骨細胞前駆細胞が活性化されて破骨細胞に分化し (活性)、骨表面に接着して吸収窩を作る (吸収: 破骨細胞の生存は短いがこのプロセスは数週間持続する)。破骨細胞の消失とともに、骨芽細胞の動員が増し、骨形成のスイッチが入る (反転)。骨芽細胞は増殖分化

し、新たな骨基質を産生し石灰化を促して骨を形成する。破骨細胞による吸収窩を骨芽細胞が埋め尽くしてプロセスは休止する。

骨は70%の無機質（ミネラル）と20%の蛋白質から構成される。ミネラルが骨組織の硬度や剛性に寄与するコンクリート成分である一方で、鉄筋の役割を担う蛋白質は、組織に伸張性や弾性を付与している。型コラーゲンとそのミネラル沈着に関わる基質小胞に加え、様々な非コラーゲン蛋白質がすべて骨芽細胞から分泌される。リン酸カルシウム結晶ミネラルの中でもカルシウム（Ca）/リン（P）比の最も高いヒドロキシアパタイト（HAP）は、内部に強いALP活性をもつ基質小胞内に蓄積し、蛋白質である型コラーゲンの周囲やその内部に沈着する。非コラーゲン蛋白質であるオステオカルシンなどのγ-カルボキシグルタミン酸（Gla）含有蛋白質（骨グラ蛋白質）はCa結合部位を有し、石灰化の抑制に関わっている。オステオカルシンにはGlaを含有しないタイプ（グル型）もあり、これらはCaと結合できないことから、骨へのCa沈着に干渉しない。骨芽細胞は、オステオカルシンのGla含有をコントロールしながら、骨の石灰化プロセスの進み具合をコントロールしているのかもしれない。これに加えて破骨細胞分化ならびに活性も骨芽細胞の管理下にあることから、骨芽細胞は骨の形成とリモデリング過程の総指揮役を担っていることになる。

骨の基質代謝は、副甲状腺（上皮小体）ホルモン（PTH）、カルシトニン、あるいはビタミンDなどによって制御されている。PTHは、骨からのCa吸収促進因子と捉えられているが、腎でのリンの再吸収を促進するために、骨からのCa脱出はさほど進まない。最近では、PTHの骨形成作用が注目されるようになり、骨芽細胞への作用について研究が進んでいる。カルシトニンは、破骨細胞に作用し、その活性を抑制して骨吸収を妨げる作用がある。ビタミンDはオステオカルシンの産生を促進することが知られている。その他、エストロゲンや作動薬も骨代謝に対してアナボリックな作用を有している。

3. 臨床現場における馬の骨代謝評価の現状と課題

馬の骨基質評価法のために画像診断が適用できる。X線撮影による骨密度（BMD：bone mineral density）の測定は一般的である。BMDはその名のとおり、骨ミネラルであるHAPの半定量的解析法である。研究室レベルでは、軟X線を用いた骨梁解析やCTを用いたジオメトリ解析が可能となっている。精密な骨梁構造の消失が骨硬化を招くこと、それは強度を優先させる結果しなやかさを失った骨区画であること、例えば馬では手根関節構成骨の特定部位に硬化をきたし、関節内骨折の発生と関連する可能性があることが示唆されている。HAP分布の解析に基づく画像診断は、益々その性能を高めることによって、骨強度の有用な臨床診断法の1つの柱となることが期待される。骨強度への影響要因として近年、骨質すなわち骨の鉄筋構造に注目が向けられている。馬の臨床では未だ概念が普及していないけれども、ヒトでは型コラーゲンの架橋結合タイプの差異が骨強度に大きく影響することが知られている。老化架橋といわれる結合が増すことにより、コラーゲン線維間の結合性が高まる結果、コラーゲンのもつ伸張性や弾性が損なわれ、結果的に骨強度の低下をきたす。

馬の骨代謝を評価するための生化学マーカーの臨床応用も広く検討されている。臨床的に骨形成マーカーと骨吸収マーカーに大別されることが多いが、複雑な代謝機構を理解するのは容易ではない。骨性ALP（bone ALP：BAP）やオステオカルシン（OC）は、馬の研究

でもよく用いられる代表的な骨形成マーカーである。BAP は骨芽細胞の基質小胞を介した骨コラーゲンの石灰化に關与する酵素であり、形成マーカーとしては適している。しかし馬における BAP の測定と値の判読には注意が必要である。臨床検査で使用する ALP の酵素活性評価と異なり、BAP は種特異性のある ELISA を使用する。したがって、馬の検体で正確に測定できているか検討の余地がある。我々はこれまでに、いくつかの動物種について ALP や BAP の骨折治癒との關係を検討してみたが、実験用の小動物（マウス、ラット）以外の動物では BAP よりも ALP の方が骨折治癒過程における骨性化骨の成熟をうまく反映していた。他種を対象とした特異抗体を用いた ELISA による BAP 定量系を適用する場合には、自然発生性の骨折後の修復経過と関連付けて BAP 値の変動を評価し、骨形成マーカーとしての信頼性を再チェックする必要があると思われる。馬の BAP に特異的な測定系の創出が待たれる。

OC は、骨芽細胞に特異的な蛋白であることから、単に骨形成マーカーとして捉えられるが、骨への石灰沈着の調節因子として機能している側面を持ち合わせている。骨芽細胞は OC 量や OC の Gla 含有量すなわち Ca 結合能を見事に調整しながら、HAP がコラーゲンに取り込まれる量を制御しているといった見方もできる。我々のデータでは、骨折治癒過程において ALP は仮骨形成期にピークを迎えるが、OC は骨リモデリング期にピークがある。増生仮骨を再構築していく過程で、破骨細胞による過剰な石灰化部位の除去機能と同程度に高まった骨形成能を微妙に制御するモデュレーター機能としての OC の役割を考慮する必要がある。

骨吸収マーカーとして、Ⅰ型コラーゲン分解産物や TRAP などが馬の臨床でも適用できるようになると思われる。Ⅰ型コラーゲンの分解マーカーである NTx は、ヒトにおける骨粗鬆症マーカーとして信頼性が高い。ヒトでは尿を用いて測定するが、馬では血液でも測定が可能である。骨折治癒過程と関連付けた研究はないが、同じⅠ型コラーゲンからなる腱の断裂症例では、受傷後急速に高まり次第に低下するが、受傷後 100 日まで高値であることが報告されている。Ⅰ型コラーゲンは骨に特異的な蛋白でないことから、組織特異性の問題は残るが、馬の骨破壊を反映するマーカーとなると考えている。TRAP の定量には、現在、酵素活性を評価することにより、種特異性のない測定系が牛で開発されている。馬のサンプルに適用した論文はないが、馬のサンプルを用いた測定へ応用するのは比較的容易と思われる。BAP 定量のための ELISA と異なり、破骨細胞に特異的な分画を活性に基づいて定量するので、臨床的な有用性は高いと期待される。

これまでのところ、これらマーカーの診断能力については、骨折治癒などの疾患を対象に評価しなければならない段階である。さらに調教現場で求められるトレーニングと骨の成長や骨疾患予防にこれら骨代謝マーカーの概念を持ち込むまでにはもう少し時間がかかるかもしれない。

4 . 軟骨基質と代謝

骨に伝わる荷重力は、連結組織である関節構造を介して他の骨へと伝達される。ここでいう関節組織は、関節軟骨、滑膜、関節包、あるいは内外の靭帯によって構成される滑膜性関節である。関節軟骨は関節運動にかかる荷重に常に曝され、軟骨下骨にかかる衝撃の吸収・緩和を担うために力学的に高度に分化した組織である。骨の基本骨格がコラーゲン

で、それを基質 HAP が支持して骨に硬度を与えているのと同様に、硝子軟骨である関節軟骨もコラーゲン（重量比 10%）による基本骨格を有し、その周辺をプロテオグリカン（PG：重量比 20%）分子が埋めてクッション性を与えている。組織重量の大部分が水であり、細胞成分に乏しい（重量比 2%）のも関節軟骨の特徴である。

軟骨特有の衝撃吸収機能は、PG 中でも主要な成分であるアグリカンの性状に起因する。アグリカンは、コア蛋白といわれる軸蛋白に糖側鎖であるグリコサミノグリカン（GAG：コンドロイチン硫酸やケラタン硫酸を含む）が幾重にも繋がった構造体で、ヒアルロン酸に連結し、巨大な分子重合体を形成している。関節軟骨の衝撃吸収性は、GAG がもつ高い抱水力と併せて、含まれる多数の陰電荷に由来する電気的な反発力によるものである。衝撃吸収材である PG 重合体は、Ⅱ型コラーゲンを主成分とする保護網によって取り囲まれている。

関節軟骨の最表層は、PG 量が極めて少なく、コラーゲン線維はフィブロネクチンなどの糖蛋白と横方向に走行している。浅層（tangential zone）も、PG 量は少なく、コラーゲンは横方向に走行して外圧に抵抗性を示す構造となっている。中間層（transitional zone）は、PG が豊富で、コラーゲンは縦横に不規則に走行し、衝撃吸収帯として機能する。深層（radial zone）は厚く、コラーゲンは縦方向に柱状に配列し、層が剥がれないようにねじれに対して抵抗性を示す。石灰化層（calcified zone）では、コラーゲン線維の内部や線維間に HAP を認めるようになり、軟骨から骨への移行部となる。

これら細胞外基質成分の産生・分泌を軟骨細胞が単独で担う。骨基質の代謝が、骨芽細胞を司令塔にして破骨細胞との連携で進行するのと対照的に、組織内重量比でも数パーセントしかない細胞がこの豊富な細胞外基質の恒常性を保っている。軟骨細胞は分裂増殖能や再生能が低いことから、加齢や疾患に伴う細胞数の減少は、基質の産生や恒常性維持に大きく影響してくる。すなわち、軟骨にかかる荷重は変化しないにもかかわらず、軟骨細胞の機能異常や減数があると、基質再生が間に合わず、結果的に硝子軟骨を維持できない。最表層の線維芽細胞や骨髄幹細胞由来の細胞による軟骨の修復・再生が線維軟骨に終止することも、高度に分化した軟骨細胞の機能を再現できないことが大きな障壁となっている。

5 . 臨床現場における馬の軟骨代謝評価の現状と課題

骨代謝と比較して、軟骨代謝の評価法は容易な一方で、実際の臨床応用には大きな壁がある。関節という限られた領域で進行していることから、関節軟骨の基質代謝を知るための情報源として関節液は好都合である。関節液中の基質代謝産物や分解酵素活性、サイトカインの変動を知ることによって、関節内における軟骨変性をはじめとする軟骨代謝の変化を診断できる。具体的には、関節液中の GAG、PG、コラーゲン、その他の非コラーゲン蛋白の小断片、またはマトリックスメタロプロテアーゼ（ゼラチナーゼ、ストロムライシン）の酵素活性は、馬の軟骨破壊の早期診断または予後診断マーカーとして臨床応用できる。軟骨の破壊は、PG の損失による襲撃吸収性の低下に始まり、進行すると PG を包囲するコラーゲン網に断裂をきたす。早期には PG の断片化が、進行期になるとコラーゲンの破片が、それぞれ特異的な酵素群であるアグリカナーゼやコラゲナーゼ活性の高まりと一致して認められる。しかし一方で、馬、特に競走馬の臨床では関節液の採取や検査が臨床現場でルーチンに行なわれていないのが、軟骨代謝に関する臨床検査の進歩を大きく妨げて

いる。血液や尿を用いた軟骨基質分子の定量検査法の開発が試みられているが、なかなか臨床応用が実現しない。正常検体では検出されず、かつ疾患および軟骨に高い特異性をもつ分子マーカーが発見されない限り、関節液を採取することなく軟骨の変性を診断できる方法は確立されないかもしれない。

骨へのトレーニング効果と同様に、軟骨へのメカニカルストレスはその基質代謝を大きく変化させる。トレーニング効果により軟骨基質構成分子の産生が軟骨内で高まること、それら分子は運動荷重によって関節外に駆出されることが予想されている。骨と同様に、運動負荷が軟骨の質を高め、軟骨周囲の環境（恒常性）を整える重要な要因となっていると考えている。その一方で、関節軟骨の特定部位にかかる運動時の過剰な繰り返し荷重や過度な負荷は、発育期の骨関節疾患の誘因でもある。軟骨内骨化が活発な時期における反復荷重あるいは強い衝撃力は、骨軟骨境界部の損傷から骨軟骨症の形成につながる可能性がある。