

令和元年6月28日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01526

研究課題名（和文）メカニカルストレスによって生じる関節組織と神経組織との相互作用を検証する

研究課題名（英文）Investigation of the interaction between joint and nerve tissue by mechanical stress

研究代表者

浅田 啓嗣 (Asada, Keiji)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・教授

研究者番号：10440851

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：マウスおよびヒト滑膜細胞のメカニカルストレスに対するカルシウムイオン依存性の情報伝達経路について検証した。両細胞ともに滑膜へのMSにより細胞内小胞体からのカルシウムイオン遊離とTRPV4チャンネルの活性化によるカルシウムイオンの流入が生じていることが示唆された。さらに、早期変形性関節症治療の研究に有用なマウスモデルを検討した。内側半月板不安定化モデルは他のモデルよりも遅い進行を示し、そして組織学的に有用であることが示された。しかしながら、関節軟骨損傷の程度にかかわらず、自発運動量の変化は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は予防的見地に立ち、症状・変形の増悪を防いでいく予防的運動療法確立の基盤となる研究であり、高齢社会において再生医療と並ぶ重要な課題である。健康者同様に膝OA患者においても、身体運動が活発であれば軟骨量を維持し欠損が少ないことが示されており、予防に効果的な運動負荷とその生理的メカニズムの基盤を確立することが求められている。

研究成果の概要（英文）：We examined calcium ion-dependent signaling pathways for mechanical stress (MS) in mouse and human fibroblast-like synoviocytes (FLS). In both cells, MS to FLS suggested that calcium ion release from intracellular endoplasmic reticulum and calcium ion influx due to activation of TRPV4 channels. Furthermore, we examined useful mouse model for the treatment study of early osteoarthritis. The model of destabilization of medial meniscus was showed slower progression than other models, and was might be useful histologically. However, changes in locomotor activity were not found regardless of the degree of articular cartilage damage.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：メカニカルストレス 膝関節 滑膜 カルシウムイオン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(osteoarthritis: 以下 OA)は軟骨基質の破壊と疼痛による機能制限をもたらす退行性疾患で、高齢者の増加と長寿化にともない急速に患者数が増加している。我が国では 50 歳以上で膝に何らかの異常をもつものが 2000 万人以上、痛みを伴う変形性膝関節症(膝 OA)患者は 820 万人以上と推定され、介護が必要となり得る重大な疾患のひとつである。関節変形は不可逆性変化であるため、その変化を最小限に留めておくための予防法の確立が急務である。OA に対する運動療法の一つである関節運動は骨関節に対し圧迫・牽引力を伴う一種のメカニカルストレスを与える治療であるが、関節運動制限に対する関節運動の治療的介入は関節の状態次第では軟骨・滑膜組織の変性を進行させる可能性が指摘されており(小島, 渡邊, 他. 理学療法科学. 2009)、効果的な運動療法確立には関節組織のメカニカルストレス応答メカニズムの解明が必要である。OA 発症初期には、滑膜の炎症が疼痛や関節水腫の発生に関与し、その病態に CGRP や SP などの神経ペプチドによる神経原性炎症が関与していると考えられているが、滑膜と神経の相互作用については十分に検証されていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、滑膜細胞のメカニカルストレスに対するカルシウムイオン依存性の情報伝達経路を明らかにし、メカニカルストレスが滑膜細胞を介して神経を含む関節構成組織に及ぼす影響を明らかにすること、関節構成組織と神経細胞との病態生理的な相互作用の解明に必要な、関節症状が軽度で治療効果が期待できる早期 OA に対応するげっ歯類のモデルを作製すること、である。

### 3. 研究の方法

#### 実験 1) 滑膜細胞のメカニカルストレスに対するカルシウムイオン依存性の情報伝達経路細胞培養

マウス線維芽細胞様滑膜細胞は生後 15 週から 20 週のマウスの後肢膝関節滑膜より単離した。神経細胞は生後 15 週から 20 週のマウスの後根神経節(DRG)より単離した。両細胞を同一培養皿に播種し 48 時間共培養した後、蛍光カルシウム指示薬である Fluo-3AM を負荷した。

また、ヒト線維芽細胞様滑膜細胞を用いて(CDD-H-2910-N; Articular Engineering)マウスとの比較を行った。

#### 線維芽細胞様滑膜細胞に対するカルシウムイメージング

申請者が確立した共培養細胞刺激実験システム(Asada K et al. Am J Physiol-Cell Physiol. 2012)を用いて実験を行った。ガラスマイクロピペットを装着したマニプレーターを用いて、滑膜細胞にメカニカルストレスを加えた。そのときの滑膜細胞または神経細胞に起こるカルシウム濃度変化を測定した。カルシウム濃度変化の測定は  $Ca^{2+}$  蛍光検出解析ソフト AQUACOSMOS を使用して行った。

#### 実験 2) 早期 OA モデルの組織学的変化と自発運動量の関係を検証

##### Destabilization of the medial meniscus (DMM) surgical instability models の検討

20 週齢のマウスに膝関節内側半月靭帯のみを切除する DMM を施行した。術後 8 週間の通常飼育を行い、自発運動量を測定した。運動量の測定にはビームセンサー式自発運動量測定システム(PanLab 社製)を用い、1 週間毎に 24 時間の運動量を測定した。8 週後に両膝関節の前額面が観察可能なパラフィンブロックを作成し Safranin-O/Fast Green 染色を行い、光学式顕微鏡(Olympus 社製、BX53)で観察した。大腿骨軟骨、脛骨軟骨の損傷の程度を組織学的スコア(Glasson ら 3)の方法に準拠して評価した。

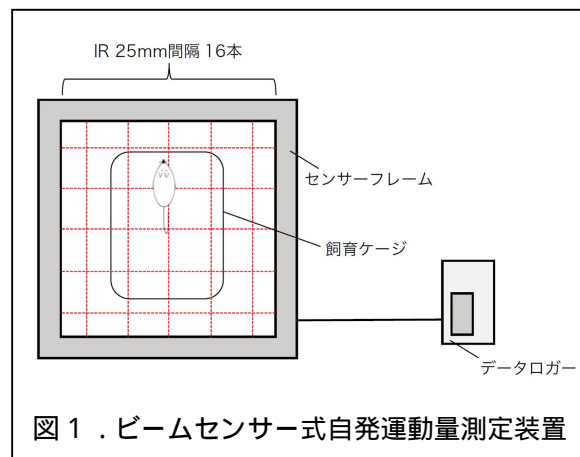


図 1 . ビームセンサー式自発運動量測定装置

### 4. 研究成果

#### 滑膜細胞へのメカニカルストレスに対する情報伝達経路:

これまでに正常マウス滑膜組織へのメカニカルストレスは滑膜組織から神経組織へカルシウム依存性の情報伝達を行うことを明らかにした。また、滑膜細胞の反応には小胞体からカルシウムの遊離、TRPV4 (Transient receptor potential vanilloid 4) チャネルが関わっている可能性があることを示した。さらに滑膜細胞における CRAC (Calcium release-activated channel) の関与について検証した。メカニカルストレスに対する滑膜細胞の反応は CRAC 阻害剤である YM58483 投与しても変化が見られなかった。さらに細胞外カルシウムが無い状態でタプシガルギンを投与した後、灌流液カルシウム濃度を 2 mM に変化させても細胞質へのカルシウム流入は観察されなかった。これらの結果から、正常マウス滑膜細胞では CRAC が発現していない、

もしくは活性化されない可能性が示唆された。

次に、メカニカルストレスに対する滑膜細胞の受容メカニズム解明に向けて、滑膜細胞のメカニカルストレスに対する細胞内カルシウム反応をマウスとヒト間で比較した。細胞外カルシウム存在下では、メカニカルストレスによって、マウスおよびヒト両方の滑膜細胞において細胞内のカルシウム濃度の上昇反応を起こした(図2、3)。これらの反応は外液カルシウムが存在しない条件においても残存した。以上の結果から、マウスおよびヒトにおける滑膜細胞の応答が細胞内ストアからのカルシウム放出に關与している可能性を示唆した。また、ヒト滑膜細胞においても TRPV4 の関与が示された。

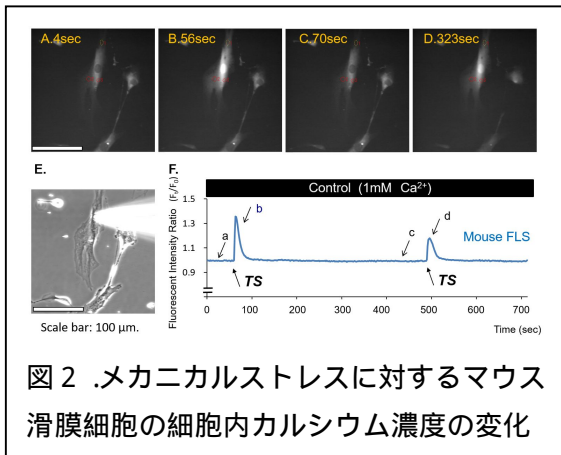


図2 .メカニカルストレスに対するマウス滑膜細胞の細胞内カルシウム濃度の変化

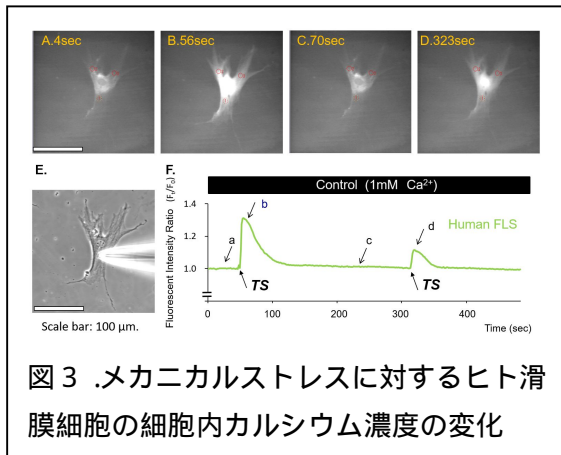


図3 .メカニカルストレスに対するヒト滑膜細胞の細胞内カルシウム濃度の変化

運動検証：

14 週齢および 10 ヶ月齢の正常マウスを対象に、自発運動量を比較検討した結果、14 週齢における 24 時間当たりの総自発運動量は  $34,188 \pm 1,172$  回、10 ヶ月齢の総自発運動量は  $19,410 \pm 448$  回となり、加齢により自発運動量の低下が認められた。次に 10 ヶ月齢のマウスに DMM 手術を施行し自発運動量を計測した、外科的操作翌日の総自発運動量は  $7,860 \pm 245$  回、1 週後で  $13,733 \pm 861$  回、8 週後で  $18,815 \pm 889$  回であった。外科的操作直後は自発運動量の低下が認められたが、時間経過とともに活動量は増加した。

変形性関節症(OA)のモデル検証のため化学的に OA を誘発するモデルと外科的に OA を誘発する 4 つのモデルを検証した。膝関節内側半月靭帯のみを切除する侵襲の少ない DMM モデルは他のモデルに比べ進行が緩徐であり、予防的運動療法の効果を検証するために組織学的には有用であることを示した。しかしピームセンサー式自発運動量測定装置による自発運動量は手術の有無で差が見られなかった。今後運動量をコントロールして観察していく必要がある。

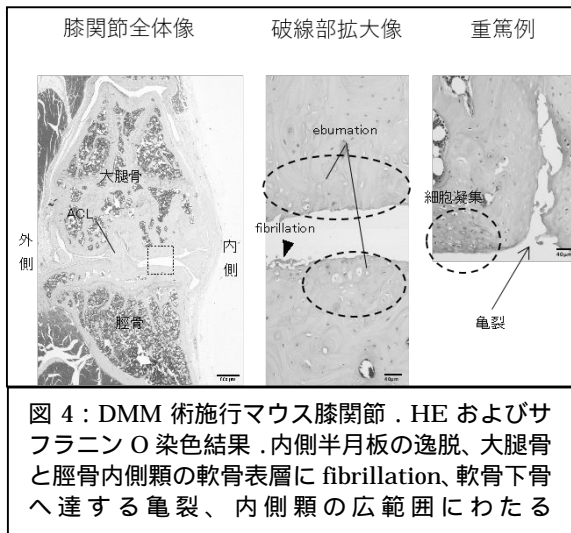


図4：DMM 術施行マウス膝関節・HE およびサフラニンO染色結果。内側半月板の逸脱、大腿骨と脛骨内側側の軟骨表層に fibrillation、軟骨下骨へ達する亀裂、内側側の広範囲にわたる

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

小島聖、渡邊晶規、浅田啓嗣、佐々木賢太郎: 重度のマウス変形性膝関節症モデルに対する振動刺激が関節軟骨に及ぼす病理組織学的影響. 金城大学紀要, 19(2019), 15-20.

Masanori Watanabe, Satoshi Kojima, Keiji Asada, Itaru Hibino, Masahiro Hosono: Effect of Aging on the Progression of Articular Cartilage Damage in a Rat Osteoarthritis Model. Int J Clin Exp Med Sci, 4(2019), 21-25.

小島聖、渡邊晶規、浅田啓嗣、佐々木賢太: マウス変形性膝関節症モデルに対する振動が関節軟骨に及ぼす影響. 金城大学紀要, 査読有, 18 (2018), 123-129.

渡邊晶規、小島聖、浅田啓嗣、細正博: 理学療法効果の検証に向けたラット変形性膝関節症モデルの検討. 名古屋学院大学論集 医学・健康科学・スポーツ科学篇, 査読有, 6 (2018), 1-9.

Watanabe M, Kojima S, Hosono M: Effect of low-intensity pulsed ultrasound therapy on a rat knee joint contracture model. Journal of Physical Therapy Science, 査読有, 29 (2017), 1567-1572.

小島聖、渡邊晶規、佐々木賢太: 変形性膝関節症モデルラットに対する寒冷浴の効果, 金

〔学会発表〕(計 19 件)

Keiji Asada, Yasuhiko Morimoto, Yu Okumura, Miyako Takaki: Intracellular calcium responses to mechanical stimulation in mouse and human synoviocytes. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress ( 国際学会 ), 2019.

Yu Okumura, Keiji Asada, Miyako Takaki: Calcium response in human synovial cells induced by shear stress in normal and rheumatoid arthritis. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress ( 国際学会 ), 2019.

Satoshi Kojima, Masanori Watanabe, Keiji Asada, Masahiro Hosono: Histopathological changes in articular cartilage and locomotor activity of experimental osteoarthritis model in mice. WCPT Congress 2019 ( 国際学会 ), 2019.

渡邊晶規、小島聖、浅田啓嗣、細正博: 大腿神経損傷はラット変形性関節症モデルにおける軟骨破壊に影響しない。第 6 回日本運動器理学療法学会学術大会, 2018.

Keiji Asada, Yasuhiko Morimoto, Yu Okumura, Miyako Takaki: Auto-regulation of osteoblast mechanosensitivity via P2Y2 receptor. 第 95 回日本生理学会大会, 2018.

Keiji Asada, Yu Okumura, Yasuhiko Morimoto, Miyako Takaki: Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel does not contribute to intracellular signal transduction of normal mouse fibroblast-like synoviocytes induced by mechanical stimulation. 第 94 回日本生理学会大会, 2017.

浅田啓嗣: 運動器疼痛に対するリハビリテーションの効果と限界-徒手理学療法の立場から。第 22 回ペインリハビリテーション学会学術大会 ( 招待講演 ), 2017.

小島聖、渡邊晶規、竹田圭佑、浅田啓嗣、細正博: マウス変形性膝関節症モデルに対する振動刺激が関節軟骨に及ぼす影響。第 52 回日本理学療法学会学術大会, 2017.

渡邊晶規、小島聖、浅田啓嗣、細正博: 外傷後の膝関節軟骨損傷の進行に年齢は影響するか? 半月板不安定モデルを用いた検証。第 33 回東海北陸理学療法学会学術大会, 2017.

小島聖、渡邊晶規、竹田圭佑、浅田啓嗣、細正博: マウス変形性膝関節症モデルにおける自発運動量と組織学的変化の関係。第 33 回東海北陸理学療法学会学術大会, 2017.

Keiji Asada, Yasuhiko Morimoto, Yu Okumura, Miyako Takaki: Signal transmission via purinergic receptors to sensory nerves from mechanical stimulation of bone or joints. The International Society for Autonomic Neuroscience 2017 ( 国際学会シンポジウム ), 2017.

浅田啓嗣: 徒手理学療法の運動機能・生活機能に対する効果。第 52 回日本理学療法学会学術大会 ( 招待講演 ), 2017.

Satoshi Kojima, Masanori Watanabe, Keiji Asada, Masahiro Hosono: Influence of Vibration on Articular Cartilage on Experimental Osteoarthritis Model in Mice. The Asian Confederation for Physical Therapy Congress 2016 ( 国際学会 ), 2016.

Masanori Watanabe, Satoshi Kojima, Keiji Asada, Masahiro Hosono: Histopathological Effect of Joint Mobilization on Knee Joint Articular Capsules in RAT Immobilized For 8 weeks. The Asian Confederation for Physical Therapy Congress 2016 ( 国際学会 ), 2016.

渡邊晶規、小島聖、浅田啓嗣、細正博: 理学療法介入効果検証に向けたラット変形性膝関節症モデルの検討。第 51 回日本理学療法学会学術大会, 2016.

浅田啓嗣、奥村 裕、森本 安彦、高木 都: マウス滑膜細胞のメカニカルストレスに対する細胞内カルシウムを介するシグナル伝達の解析。第 26 回日本病態生理学会大会, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 高木 都

ローマ字氏名: (TAKAKI, Miyako)

所属研究機関名: 奈良県立医科大学

部局名: 医学部

職名：研究員

研究者番号（8桁）：00033358

研究分担者氏名：渡邊 晶規

ローマ字氏名：( WATANABE, Masanori )

所属研究機関名：名古屋学院大学

部局名：リハビリテーション学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60460549

研究分担者氏名：小島 聖

ローマ字氏名：( KOJIMA, Satoshi )

所属研究機関名：金城大学

部局名：医療健康学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30454242

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。