

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19927

研究課題名（和文）無染色イメージング技術を基盤とする軟骨変性疾患の病態解析と臨床応用展開

研究課題名（英文）Pathophysiology analysis and clinical application development of cartilage degenerative diseases based on label-free imaging technology

研究代表者

清松 悠（Kiyomatsu, Hiroshi）

愛媛大学・医学部附属病院・助教（病院教員）

研究者番号：80756362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：変形性関節症は、損傷軟骨を再生・修復する直接的な治療法は確立されておらず、軟骨損傷に始まる病態変化を極早期に同定する技術はない。本研究では人工関節置換術時に摘出された検体のラマン分光分析を行い、軟骨基質の分子組成変化を捉えることに成功した。また手術時の関節鏡に搭載するデバイスの試作機を作成し関節鏡に搭載するため、全体的なサイズの縮小を図り、同時に体内に挿入する先端を実際に計測する関節鏡外套の中を通すことが可能なサイズにした。今後これらのデバイスを用いて、軟骨の質的解析が可能となる情報量を得られるか検証し、臨床応用を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これらの技術が完成することにより、これまで捉えることのできなかった、軟骨変性の質的評価が可能になり、また未だ確立されていない軟骨再生医療の発展と軟骨再生の過程を評価に寄与することができる。

研究成果の概要（英文）：A treatment method for regenerating and repairing degenerative cartilage in osteoarthritis has not been established, and there is no technique for identifying pathological changes of degenerative cartilage at an extremely early phase. In this study, we succeeded in identifying changes in the molecular composition of the extra-cellular matrix of cartilage by performing Raman spectroscopic analysis on the specimens removed in total knee replacement. We also create a prototype of the device to be mounted on an arthroscope for surgery, based on that system. We plan to apply these devices clinically in the future.

研究分野：整形外科分野

キーワード：変形性関節症 軟骨 バイオイメージング ラマン分光法 第2次高調波 軟骨再生 軟骨変性

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、微細な軟骨損傷が一因であり、加齢に伴い増加し、軟骨が変性・消失し関節症を発症する。今後患者数の増加が予想される我が国であるが、すでに4人に1人が罹患していると言われている。診断は、骨の変化によりなされるが、変化が観察されるのは、進行期以降であり、病初期の軟骨の状態を反映したものではない。エビデンスのある予防法は少なく、変形性関節症など軟骨変性が広範囲に及ぶ疾患に対する軟骨再生の方法はない。末期になると治療法は骨切り術や関節置換術という手術療法に限られる。現存の治療は対症的であり、損傷軟骨を再生・修復する直接的な治療法は確立されておらず、軟骨損傷に始まる病態変化を極早期に同定する技術はない。光イメージング技術は、生体への安全性が高く、造影剤を必要としないため早期の臨床応用が現実的である。また、医療現場で用いられているMRIやPETなどの画像診断技術と比較して、高い空間分解能を有するため、関節症極初期の微小変化を可視化でき、早期診断に用いることができる。本研究では、変形性関節症をはじめとする軟骨変性疾患の新規診断法の確立と病態解明を目指し、ラマン分光分析や第二高調波発生 (SHG) など非線形光学効果を利用した無染色イメージング技術を基盤とする軟骨変性疾患の基礎的解析を行い、臨床応用へと展開することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、SHG イメージングおよびラマン分光分析を基盤とした光計測技術を駆使して、変形性関節症における軟骨変性の詳細な解析を行い、治療・診断へ応用することを目的としている。動物実験にて変形性関節症の初期変化をSHG イメージングで同定し、SHGの強度分布や空間パターンとの相関を明らかにする。SHG イメージングにより生体深部組織の分解能の高い画像化が可能であり、既存の診断方法では捉えることができなかった微小な軟骨の変化が捉えられることが期待される。これにより極初期の関節症における分子動態と軟骨基質変化の経時的な相関性を明らかにする。動物実験により得られた知見をもとに、ヒトの軟骨変性の病態解析への応用および軟骨変性疾患の診断治療への応用を目指して、ヒト検体の軟骨組織に対しラマン分光法を用いた質的解析を行う。特に、骨・軟骨組織においては、細胞外マトリックスが重要な機能を担っていることに着目し、軟骨変性における軟骨基質とその下層にある軟骨下骨にまで計測範囲を拡張し、無染色イメージング技術による解析を行う。これにより、コラーゲン基質中のアミノ酸やペプチド結合や、軟骨下骨の石灰化基質中のリン酸基などの変化を同定する。SHG イメージングとラマン分光法を相補的に活用することによって、変形性関節症の本態である軟骨損傷を描出、あるいはごく初期の軟骨変性を捉える、診断や治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

光イメージング技術は、生体への安全性が高く、造影剤を必要としないため、臨床応用のためのポテンシャルが高く、軟骨変性・再生時の質的評価に有用である。はじめに、本研究では動物実験にて変形性関節症の初期変化をSHG イメージングで同定し、SHGの強度分布や空間パターンとの相関を明らかにするために、変形性関節症モデルマウス(OAマウス)を作成した。そして、SHGイメージを測定することができる多光子励起顕微鏡を用いて、軟骨基質のコラーゲンの変化を描出し、健常部位と変性部位を解析し、その特徴的な信号強度と空間分

布つまりコラーゲンの微細構造の破綻とそれによる変性部位の同定を試みた。さらに SHG イメージングに加えて、生体分子を無染色で可視化できるラマン分光分析を用い、変性部位のプロテオグリカンやグルコサミノグリカンといった軟骨基質の機能維持に重要なその他の成分の描出を行い、軟骨変性疾患における軟骨基質の分子組成ダイナミクスについて多面的に解析を行った。さらに、臨床応用を見据えて手術の際に採取されたヒト検体にて検証を行った。動物モデルの解析と同様に、SHG イメージングによる軟骨基質の形態解析と合わせ、ラマン分光分析による解析を行った。

4. 研究成果

OA マウスを用いて、変形性関節症の初期変化を SHG イメージングにより無染色で関節軟骨の質的な評価をおこなった(図1)。第二次高調波発生 (Second Harmonic Generation: SHG) とよばれる非線形光学効果によって、軟骨基質を無染色で描出し、軟骨変性の定量解析が可能であることを実証した。また、OA マウスの膝関節軟骨のラ

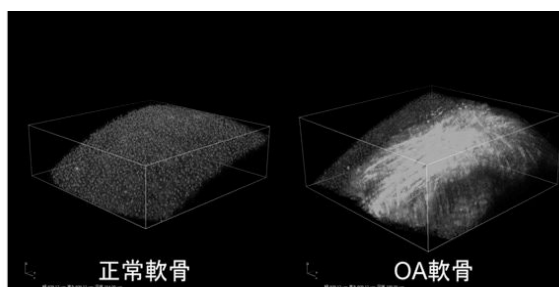


図1 変形性関節症モデルマウスのSHGイメージ

マン分光分析を行った結果、コラーゲンに由来するアミノ酸やペプチド結合の振動モードのほか、軟骨下骨の石灰化基質に由来するリン酸基のピークも観測され、軟骨基質の分子組成変化だけでなく、軟骨下骨の変化も同時に測定することができ、大腿骨遠位端の関節軟骨の菲薄化を鋭敏に捉えることができた。動物実験によって得られたこれらの研究成果や解析技術を手術用内視鏡などのデバイスに搭載し、新しい診断技術の開発や、治療診断戦略の創出につなげていくために、ヒトの軟骨組織を用いた解析を実施した。御献体から得られた膝関節軟骨の SHG イメージングによる基礎的な評価を行い、ヒトの脛骨近位端軟骨の SHG 画像を取

得した(図2)。OAモデルとは異なる SHG イメージを得たが、軟骨基質の形態的特徴を無染色で観察することに成功した。また、基質の維持に重要な分子レベルの変化を観察し、軟骨変性の病

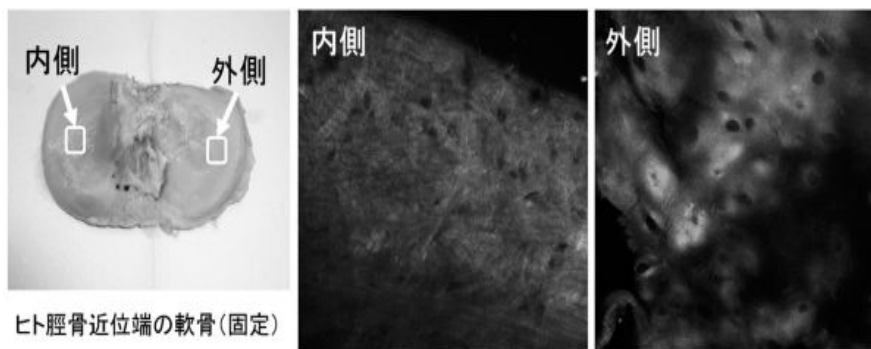


図2 ヒト検体を用いた関節軟骨のSHGイメージングによる軟骨基質の描出

態を明らかにしていくために、ラマン分光分析による詳細な検討が必要である。現在では、ヒトの軟骨組織の解析を進めており、人工関節置換術で得られた関節軟骨の変性軟骨においてコラーゲンおよびプロテオグリカンのシグナルに明らかな変化を捉えることに成功しており、関節鏡視下でのラマン分光計測を可能にするデバイス開発に着手している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oshima Yusuke, Kiyomatsu Hiroshi, Miura Hiromasa, Ishimaru Yasumitsu, Hino Kazunori	4. 巻 10497
2. 論文標題 Evaluation of degenerative changes in articular cartilage of osteoarthritis by Raman spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. SPIE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/12.2291383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 清松 悠, 日野 和典, 三浦 裕正, 大嶋 佑介	4. 巻 39
2. 論文標題 ラマン分光法による軟骨評価と診断治療への応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本関節病学会誌（日本関節病学会）	6. 最初と最後の頁 91-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11551/jsjd.39.91	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大嶋佑介
2. 発表標題 ラマン分光・非線形光学イメージングによる軟骨評価と治療診断への応用
3. 学会等名 第47回日本関節病学会シンポジウム（招待）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大嶋佑介、清松悠、明比麻由、石丸泰光、日野和典、三浦裕正
2. 発表標題 ラマン分光・非線形光学イメージングによる骨軟骨疾患の診断応用
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第39回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 朝岡 竜士、清松 悠、三浦 裕正、片桐 崇史、大嶋 佑介
2. 発表標題 変形性肩関節症の軟骨組織のラマンスペクトル測定によるメカニズムの解明
3. 学会等名 一般社団法人レーザー学会学術講演会第41回年次大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大嶋 佑介 (Oshima Yusuke) (10586639)	富山大学・工学部・准教授 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------