

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：33111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750204

研究課題名(和文)異なったメカニカルストレスが関節軟骨細胞の規律性と代謝機能に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effects of different mechanical stress on discipline and metabolic of articular chondrocytes in rat

研究代表者

高橋 英明(Takahashi, Hideaki)

新潟医療福祉大学・医療技術学部・助教

研究者番号：90636250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：関節軟骨は、変形性関節症や不動などの力学的要因によって変性する。通常、関節に存在する軟骨細胞はカラム状(柱状)に規則的な配列を成しているが、変性を惹起するようなストレス環境化での細胞数の減少が認められる。本研究では、細胞配列に関してラットを用いて定量的に解析をおこなった。その結果、配列の乱れが一部で確認されたことから、関節軟骨の恒常性維持には、細胞数だけでなく、その配列も重要な因子であることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Degeneration of Articular cartilage induced such as osteoarthritis and immobilization. Typically, chondrocytes forms a discipline array as a column shape from joint surface. However, non-physiological mechanical stress (overloading or stress deprivation) is observed not only joint degeneration, but also loss of the number of chondrocyte. In the present study, we conducted a quantitative analysis of the chondrocyte array in Osteoarthritis (OA) model rat and immobilization model rat. As a result, the loss of chondrocyte array was confirmed in part of OA. Hence, it was inferred that chondrocyte discipline is also important factor to maintain homeostasis of articular cartilage.

研究分野：理学療法学

キーワード：メカニカルストレス 不動 関節軟骨

1. 研究開始当初の背景

軟骨の代謝回転に力学的刺激が影響を与えていることは広く知られており、過負荷な状況下では変形性関節症を発症し、長期間の関節不動において軟骨変性が起こる。これらの器質の変化は関節可動域制限・筋力低下のみならず疼痛を伴いながら、日常生活活動を制限する要因である。実際に、関節疾患は高齢者要支援の対象となる原因疾患の第一位であり、変形性膝関節症だけでも本国において推定 2,000 万人以上とされている。一方、一定期間の関節不動が必要である十字靭帯断裂後の再建術では、付着する軟骨面が十分に形成されることが必要であるが、不動期間と運動開始時期や負荷量について一定の見解が得られておらず、付着部における再断裂は臨床的にも散見される。

しかしながら、関節軟骨治療に根本的な治療戦略はなく、軟骨代謝の機序については不明な点が多い。実際に変形性関節症疾患に対しタンパク分解酵素を抑制する薬剤投与をしても十分な薬理効果は得られておらず、関節内注射も一時的に疼痛緩和があるのみである。一方、運動療法では、変形性関節症の完治とはならないまでも疼痛軽減作用がある推奨度の高い治療法であることが示されている。また、運動療法の効果は筋力増加により関節の支持性が向上することによるとされているが、実際には疼痛軽減は筋力が増加する前から認められており、筋力増加によって症状改善のすべてを説明することは困難であるとされている。興味深いことに、OA においては過度な力学的負荷が変性基盤にあるにも関わらず、さらに運動負荷をかけることが有効であるといった、相反する結果や全く正反対の関節不動においても変形性関節症に類似した組織所見が得られ、これも運動により改善されるということである。したがって、力学的負荷は重要なシグナル因子であることは明らかであるが、過負荷と無負荷という力学的強度の両極の位置において、同様の変化をきたすということが着想の原点である。

これらの両条件下の組織画像において特質して認められるのは、細胞配列の乱れである。細胞は集団をなすことで機能を持つ臓器となるという原理原則がある。また、骨芽細胞を例に挙げると活動期には一列に配列するが、休止期には連続性を欠くことなどが骨研究分野ではよく知られている。さらに、細胞培養の分野においても、力学的ストレス方向に細胞は規則的に並び、細胞本来の働きに近づくことから多くの機器開発がおこなわれている。これらのことから、軟骨細胞自身は増殖軟骨層・肥大軟骨層を集団で規則配列をなすことがリモデリングにおいて重要な因子であり、それには至適な力学的ストレスが不可欠なのではないかということが想起された。しかし、「規則的配列をなすことが軟骨細胞自身が働くことに重要な因子か？」

という事と「軟骨細胞の基質合成と分解のバランスが破綻する」ことの関係性については不明である(図1)。

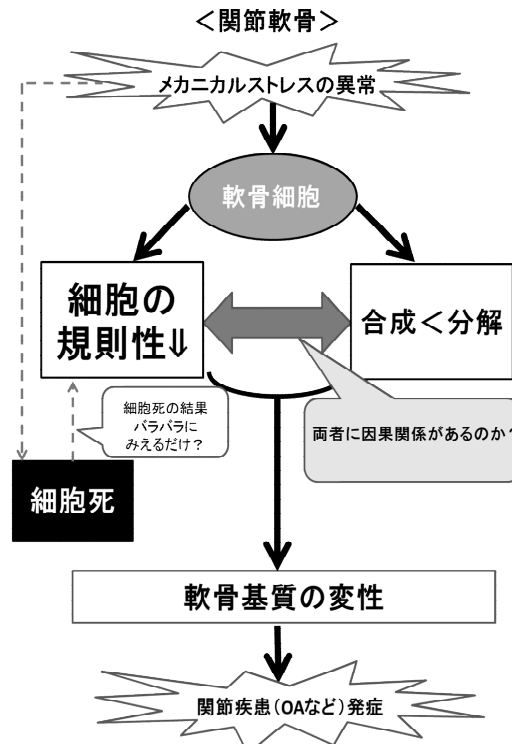


図1. 研究の全体構想

2. 研究の目的

変形性関節症や関節不動化といった両極に位置する力学的ストレス状況下において、関節軟骨変性が惹起される。そして、その両者において軟骨細胞は類似した細胞の振る舞い(細胞のばらつきと軟骨基質分解)を認める。しかし、細胞配列の規則性が失われることと基質の合成・分解のバランスが破綻することの因果関係については不明である。軟骨細胞の規則的配列は、細胞自身の恒常性維持に必要な因子であるかについて明らかにすることである。

3. 研究の方法

全ての実験は、新潟医療福祉大学の動物実験委員会の倫理承認を得て行った。飼育環境は、室温 22.5 ± 1、湿度 50 ± 5%、12 時間の明暗サイクル環境下での飼育とし摂食・飲水については自由とした。

まず、細胞の規則的配列を定量化するためにパイロットスタディとして、坐骨神経切除モデルラットの脛骨関節軟骨を用いて、解析方法の信頼性や妥当性についての検証を実施した。Wistar 系ラットの対照群 (n = 6) 及び坐骨神経切除群 (n = 6) を用い、除神経から 8 週後に麻酔下にて脛骨を採取した。脛骨は前額面で薄切し、ヘマトキシリン・エオシン染色 (H・E 染色) 後、光学顕微鏡にて関節軟骨の前十字靭帯付着部から内側側副靭帯方向にかけて 3 領域 (inner, middle, outer) に分け観察した。組織画像は画像解析ソフト (Image-J および Arc Gis10.2.1) に

より軟骨層幅、細胞密度、空間自己相関分析に供した。

続いて、変形性関節症の細胞規則配列変化について検討するため、変形性膝関節症モデルラット (destabilization of the medial meniscus: DMM モデル) を作成した。実験動物には、13週齢 Wister 系雄性ラット (n=30 体重 362.8±5.2g, 日本クレア) を用いた。全身麻酔下にて右膝関節に DMM 処置を施し、左膝関節は偽対照群として偽手術を施した。さらに、経時的变化を追うため DMM 処置後 0 日、1、2、4、8 週目 (各 n=6) の各時期においてサンプリングを実施した。サンプリングは全身麻酔下とし、組織固定は 4% 混合固定液 (2% パラフォルムアルデヒド/2% グルタルアルデヒド) を用いた。採取したサンプルは、エチレンジアミン四酢酸 (pH=7.35, 4) での脱灰を 6 週間おこなった。十分に脱灰を確認した後、エタノールによる段階的な脱水 (70%、80%、90%、100%) とキシレン代替品であるレモゾール (和光) を用いた透徹介してパラフィン包埋とした。パラフィンブロックは回転式マイクロトーム (RX-860, 大和光機) により 5µm 厚で連続薄切切片を前額面上にて作成した。染色には、サフラニン-0 染色と H・E 染色を施した。染色を施した組織切片は、光学顕微鏡にて関節軟骨の前十字靭帯付着部から内側側副靭帯方向にかけて 4 領域に分け観察した。関心領域に関しては、4 領域の内、負荷が最も加わる外側から 2 番目の領域とし、CCD カメラにて撮影をおこなった。組織画像は画像解析ソフト (Image-J および Arc Gis10.2.1) によりおこなった。サフラニン-0 染色画像は、変形性関節症の国際学会である Osteoarthritis Research Society International によって提唱されている OARSI スコアを用いて、変形性膝関節症の重症度を半定量的な評価した。定量的な評価としては、免疫化学染色を用いて型コラーゲンの定量化を図った。また、細胞配列の空間的解析には、H・E 染色画像を用い、空間自己相関分析を行った。

不動モデルには、ギプス固定を用いておこなった。実験動物には、13 週齢 Wister 系雄性ラット (n=30 体重 357.3±7.8g, 日本クレア) を用いた。固定方法は、全身麻酔下にて右股関節・膝関節を伸展位、足関節を最大底屈位にて固定した。足趾部分を露出させ浮腫やギプスの緩みが生じた際には適宜巻き替えを行った。変形性膝関節症モデルと同様に経時的变化を追うために、ギプス固定期間は 0 日、1、2、4、8 週目 (各 n=6) の各時期において全身麻酔下にてサンプリングを実施した。採取した試料は、脱灰、脱水、透徹作業を経てパラフィン包埋とした。薄切切片は、5µm 厚で前額面上の連続薄切切片を作成した。染色には、サフラニン-0 染色とヘマトキシリン・エオシン染色 (H・E 染色) を施した。染色を施した組織切片は、光学顕微鏡にて関節軟骨の前十字靭帯付着部から内側側

副靭帯方向にかけて 4 領域に分け観察した。

#### 4. 研究成果

まず、除神経後の組織学的所見として、中央部で同サイズ軟骨細胞のクラスター化が観察された。軟骨層幅は対象群に比べ内側部で有意に低下し、中央部および外側部では有意に増加した。細胞密度はコントロール群に比べ内側部でのみ有意な増加を認めた。空間自己相関における Z スコアの平均値は対照群に比べ除神経群において中央部で有意に高値を示した (図 2-4)。空間自己相関における Z スコアは高値であるほど細胞がクラスター化している指標であり、本実験における組織学的所見とも同様の傾向を示したことから、その定量性が示唆された。

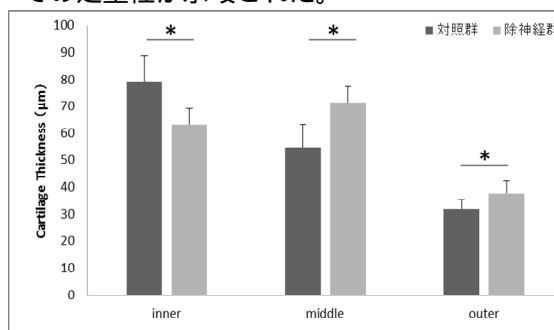


図 2. 除神経による軟骨幅の変化

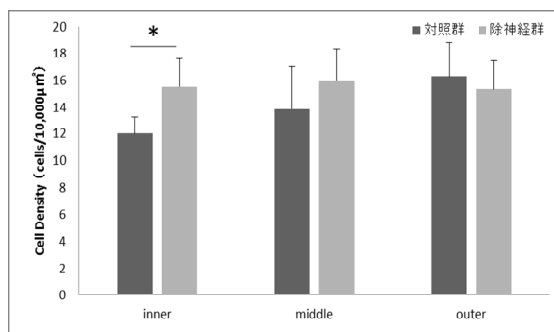


図 3 除神経による細胞密度の変化

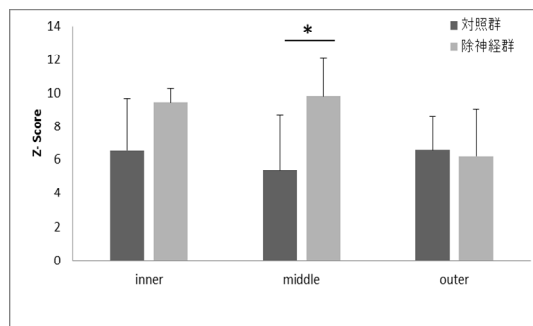


図 4. 除神経による空間自己相関分析

続いて、変形性膝関節症モデルラットの組織学的所見として、術後 2 週目より染色性の低下と細胞数が減少する傾向が認められ、術後 4 週目以降では、術後 0 種目および偽手術側と比較して有意に低値を示した。また、骨棘の形成は術後 4 週目より認められ、術後 8 週目においては著大な染色性の低下と細胞減少のみならず、関節軟骨面の大幅な破壊を

認めた。OARS1 スコアは、術後 0 日および偽対照群と比較して、術後 1 週目より増加する傾向がみられ、術後 2 週目より有意に上昇し、8 週目にいたるまでスコアが有意に漸増した (図 5)。

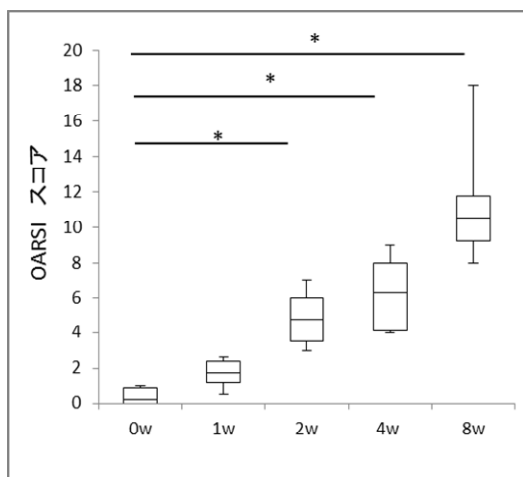


図 5 . OA 側 OARS1 スコアの経時的変化

空間自己相関における Z スコアは 4 週および 8 週目では、0 週目および偽手術群と比較して有意に低値を示したが、その他の時期に関しては、現在解析途中である。軟骨基質合成のパラメータとして使用する予定の型コラーゲンの定量化については、その染色画像が不十分であった。染色過程における再検討をおこなっても解決不可能であった。原因としては、パラフィン包埋では固定液等でマスクされた抗原を熱処理等により再度賦活させる必要があり、固定条件が強すぎると抗原の賦活が十分に行われなかった可能性があった。そのため、再度飼育から開始し、固定条件を 4 % 混合条件から 4 % パラフォルムアルデヒドによる固定に変更をしてサンプリングを実施した。現在は、サンプリング後の処理過程を終了し、薄切および染色を実施している。サンプル個体が異なることから、その他のデータについても再度取り直す必要がある。

ギプス固定による不動モデルラットにおいても同様に軟骨基質合成パラメータである型コラーゲンについての十分な染色結果が得られておらず、再度サンプルを取り直した。

これらの実験遂行の遅れに対しては、今後も継続して軟骨細胞の規則的配列と軟骨基質の代謝関係について解析をおこなっていく予定である。公表に関しては、論文または学会、ホームページ等を通じて積極的なデータ開示に努める。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

高橋英明, 田巻弘之, 大西秀明 . ラット坐骨神経切除後の脛骨関節軟骨における細胞配列規則性の変化 . 第 4 回日本基礎理学療法学会大会, 2014.11.16, 名古屋  
〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋英明 (TAKAHASHI, Hideaki)  
新潟医療福祉大学・医療技術学部・助教  
研究者番号 : 90636250

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :