

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09120

研究課題名(和文) 力学的負荷誘発性in vitro OA modelの確立と関節破壊様式の解析

研究課題名(英文) Establishment of mechanical load-induced OA model and analysis of articular cartilage destruction mode

研究代表者

二木 康夫 (Niki, Yasuo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：10276298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：in vitro OA modelの確立を目標とし、マウスの大腿骨に対して三次元力学的刺激装置を用いて圧負荷および各種試薬(IL-1 β 、ヒアルロン酸、Kartogeninなど)を加えながら器官培養を行った。real time PCRおよび組織切片の免疫染色を行ったところ、メカニカルストレスが各種炎症性サイトカインシグナルおよび関節軟骨破壊を増強する傾向を認めた一方で、新規治療薬候補として関節軟骨保護作用が期待されるヒアルロン酸やKartogeninを添加しても関節軟骨破壊の明らかな抑制には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で新たに考案した力学的負荷誘発性in vitro OA modelは、過去の報告で散見される軟骨細胞や軟骨シートを使用しておらず、大腿骨そのものに圧負荷や各種試薬を加えながら器官培養を行う新たな系である。このmodelを用いることによって従来に比べより生体組織に近い環境下でメカニカルストレスとOA発症のメカニズムの関連性を検証可能となったことに加え、軟骨再生につながる新規治療薬候補の検討を行うことが容易となったことに学術的・社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of establishing a new in vitro OA model, we performed organ culture on the femur of mice while applying mechanical stress loading and various reagents (IL-1 β , hyaluronic acid, Kartogenin, etc.) using a three-dimensional mechanical stimulator. Real time PCR and immunostaining of tissue sections showed that mechanical stress tended to enhance various inflammatory cytokine signals and articular cartilage destruction. On the other hand, the addition of hyaluronic acid and Kartogenin, which are expected to have a protective effect on articular cartilage as new therapeutic drug candidates, did not clearly suppress the destruction of articular cartilage.

研究分野：人工関節、軟骨再生、スポーツ医学

キーワード：メカニカルストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は、加齢や外傷による軟骨細胞と軟骨基質の変化に加え、メカニカルストレス、軟骨細胞の肥大化、炎症性サイトカインの関与など、種々の原因が複雑に絡み合って進行していく。軟骨組織においてメカニカルストレスが細胞骨格を変化させ OA の病態に関わっていると考えられるが、その詳細な分子メカニズムは依然として不明である。

2. 研究の目的

我々は前基盤研究 C で、軟骨細胞様株においてメカニカルストレスが Interleukin-1 レセプター (IL-1R) の発現を亢進するとともに IL-1 に対する感受性を獲得することを確認した。本研究ではより生体組織に近い環境を再現するため、マウスの大腿骨の関節軟骨に三次元力学的刺激装置で圧負荷を加える新たな *in vitro* OA model を確立するとともに、細胞骨格の変化が化学的なシグナルに変換され OA に至る機序の一端を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

本研究は下記の 3 段階で行った。

(1) 新たな *in vitro* OA model の確立

生後 8 週齢の C57BL/6 を屠殺し大腿骨を外科的に切り出し、周囲の筋肉や靭帯などの軟部組織を除去する。DMEM/F12 に各種試薬 (IL-1、Actinase、Kartogenin、ヒアルロン酸、ERK 阻害剤など) を加えたうえで、三次元力学的刺激装置 (CLS、Technoview 社) を用いて器官培養しながら圧負荷を加えた後、10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて固定し、パラフィンブロックおよび組織切片を作成した。

(2) メカニカルストレスによる組織学的変化および細胞骨格の変化の解析

まず定性的評価として、組織切片に対してトルイジンブルー染色を行い、メカニカルストレスおよび各種試薬が軟骨基質に与える組織学的変化を確認した。また、細胞骨格の一つとして知られるビメンチンについても免疫染色を行い、細胞骨格の変化についても確認した。

また定量的評価として、real time PCR 法を用いて関節軟骨破壊における上流シグナルの TRPV4 や IL-1R および下流シグナルの MMP 3 や ADAMTS4 などの蛋白分解酵素の発現について mRNA レベルで解析した。

(3) 新規治療薬の検討

OA 進行を予防する可能性のある治療薬候補として、IL-1R シグナルの下流にある ERK 阻害剤や、軟骨保護作用が一般的に知られているヒアルロン酸を *in vitro* OA model に添加することで OA 進行が抑制されるかを確認した。また、OA の進行予防のみならず、治癒に至る可能性のある新規治療薬候補として、Kartogenin の効果についても同様に検討した。

4. 研究成果

(1) 定性的評価 (トルイジンブルー染色)

メカニカルストレスを加える際に各種試薬を添加せずに 7 日間の器官培養を行った大腿骨の関節軟骨では、軟骨基質の染色性は保たれていた。培養期間については 7 日間をこえると細菌感染をきたすことが多くなり、メカニカルストレスのみで OA 変化をきたすまでに必要な培養期間については特定には至らなかった。加齢性変化である OA は年単位で進行する病態であり、

メカニカルストレスを加えずに、1pg/ml (通常は炎症反応を起こさないと考えられる極微量) の IL-1 を添加して器官培養を行っても、やはり軟骨基質の染色性は低下しなかった。しかし、メカニカルストレスを加える際に 1pg/ml の IL-1 を添加して器官培養を行うと、表層の軟骨基質の一部の染色性が低下し、プロテオグリカンが消失することが確認された。即ち、メカニカルストレスは IL-1 の異化作用を増強する効果があると考えられ、これは我々の前基盤研究 C の研究の結果に合致するものとなった。

(2) 定性的評価 (免疫染色)

ビメンチンはトルイジンブルー染色において軟骨基質の染色性が低下した部位の軟骨細胞を中心に発現していた。表層の細胞であっても軟骨基質が豊富な部位ではビメンチンは発色しない傾向にあったことから、ビメンチンの重合はプロテオグリカンによる圧負荷の緩衝がなされない際にメカニカルストレスに対して細胞が初期に起こす反応の一種と考えられた。過去の報告でも軟骨基質が変性消失した OA 軟骨において、ビメンチンはアクチンやチューブリンといった他の細胞骨格に比べ表層の軟骨細胞においてより多く発現することが知られており、他の細胞骨格に比して中心的な役割を担っていることが推察された。

(3) 定量的評価 (real time PCR)

軟骨基質が消失している軟骨細胞において上流シグナルの TRPV4 や IL-1R の発現は上昇するケースも低下するケースも双方認め一定の傾向を認めなかった一方で、下流シグナルの MMP 3 や ADAMTS4 については概ね上昇する傾向にあった。上流シグナルの結果が安定しなかったのは negative feedback による影響が考えられ、軟骨基質消失において IL-1 関連以外のシグナルも同時に影響を受けていることが推測された。

またメカニカルストレスを加える際に、これまで関節軟骨保護作用が報告されてきたヒアルロン酸や新規治療薬候補として期待される Kartogenin を添加したが、これらの関節軟骨破壊の明らかな抑制には至らなかった。

(4)総括

本研究で新たに考案した力学的負荷誘発性 in vitro OA model は、過去の報告で散見される軟骨細胞や軟骨シートを用いた細胞培養ではなく、大腿骨に圧負荷や各種試薬を加えながら器官培養を行う新たな系である。この model を用いることによって従来に比べより生体組織に近い環境下でメカニカルストレスと OA 発症のメカニズムの関連性を検証可能となったことに加え、軟骨再生につながる新規治療薬候補の検討を行うことが容易となったことに学術的・社会的意義があると考えられる。今後は基礎研究の観点からは IL 6、TNF など他の炎症性サイトカインとの関連を検証することで OA 発症の分子メカニズムの一端を明らかにしていくとともに、臨床応用の観点からは drug repositioning などを用いて他に新たな治療薬候補の検討を行うことで OA に対する根治的治療法の確立を目指していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福原悠介、二木康夫、菊地寿幸、宇田川和彦、武田勇樹、松本守雄、中村雅也
2. 発表標題 軟骨基質の消失そのものがOA変化を惹起する可能性についての検討
3. 学会等名 第38回 日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福原悠介、二木康夫、菊地寿幸、宇田川和彦、武田勇樹、松本守雄、中村雅也
2. 発表標題 proteoglycan lossがOA変化の初期のトリガーである可能性についての検討
3. 学会等名 第34回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------