

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591896

研究課題名（和文）

アレンドロネートが関節軟骨及び椎間板細胞の代謝活性に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effect of Alendronate on the metabolism of cartilaginous and disc cells in vitro

研究代表者

小林 茂 (KOBAYASHI SHIGERU)

福井大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80234821

## 研究成果の概要（和文）：

加齢に伴う軟骨変性によって発症する変形性関節症は関節痛、そして椎間板変性は腰痛や背部痛の原因として広く知られており、骨粗鬆症を生ずる年代では軟骨変性或椎間板変性を合併していることが多い。本研究では骨粗鬆症予防薬として現在広く臨床で使用されているビスフォスフォネート製剤が関節軟骨細胞や椎間板細胞の代謝に対してどのような影響を及ぼすかを三次元培養システムを用いて *in vitro* に検討した。その結果、まず健常な関節軟骨および椎間板髄核細胞では、乳酸産生量、グリコサミノグリカン（GAG）産生量、そしてプロテオグリカン合成能が  $10^{-8}$  から  $10^{-10}$  mol/L のアレンドロネート濃度で高値を示し、細胞代謝が活発になることを明らかにした。次に加齢に伴う変形性関節症や椎間板変性下では、軟骨組織内の酸素濃度の低下及びプロテオグリカンの減少により浸透圧が低下することが知られている。そこで我々は、低酸素（ $< 1\% O_2$ ）、低浸透圧（270mOsm）下でのアレンドロネートが関節軟骨細胞や椎間板髄核細胞に及ぼす影響を検討した。その結果、低酸素、低浸透圧の病的条件下ではアレンドロネートによる細胞の乳酸産生量、グリコサミノグリカン（GAG）産生量、そしてプロテオグリカン合成能の明らかな増加は見られなかった。すなわち、病的条件下ではすでに細胞の代謝機能は低下しておりアレンドロネートの作用が影響しないものと考えられたが、健常な細胞に対しては明らかに細胞の代謝活性を高め、プロテオグリカンの新陳代謝を活発にする作用があることを明らかにした。よって、アレンドロネートは、軟骨組織の変性予防に有用な薬剤であると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Bisphosphonates have been widely used for treatment of osteoporosis. Recently, alendronate may have chondroprotective effects that could be of relevance in osteoarthritis. Aggrecan concentration falls markedly during cartilaginous and disc degeneration with unfortunate biomechanical and physiological consequences. However, many questions on the effect of alendronate to disc cells remain unanswered. The goals of this study were to determine the role of extracellular osmolality and oxygen tension in regulating production of GAG by alendronate and its effects on cartilaginous and disc matrix turnover.

Cells were isolated from the cartilaginous tissue of metatarsal joint and the nucleus pulposus of bovine caudal discs, encapsulated in alginate beads, and cultured in DMEM containing 6% foetal calf serum (FCS) at 400 mOsmol at cell densities of 4 million cells/ml. They were then cultured for 5 days under 21% oxygen with  $10^{-1}$ –  $10^{-12}$  mol/l alendronate; cell cultured without alendronate served as control and the effects of osmolality and oxygen

concentration were compared. Lactate production was measured enzymatically and glycosaminoglycan (GAG) accumulation was examined using a DMB assay. Rate of sulfate GAG synthesis was measured using a standard  $^{35}\text{S}$ -sulfate radioactive method. In the result, Alendronate at concentrations of  $10^{-10}$  -  $10^{-8}$  mol/l potentiated the GAG production per million cells by cartilaginous and disc cells in 5 days culture. The potentiated effect was maximal at  $10^{-8}$  mol/l. Alendronate ( $10^{-8}$  mol/l)-induced increases in GAG production per million cells are prevented by inhibition of cell metabolism under pathologic conditions (270 mOsmol, <1% oxygen) as seen the osteoarthritis and degenerated disc; but alendronate increased GAG production, cell metabolism (lactate production) and GAG synthesis in healthy conditions (400 mOsmol, 5% oxygen). In conclusion, this data suggest that alendronate may have chondroprotective effects on healthy cells.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学

#### 1. 研究開始当初の背景

近年、超高齢化社会をむかえ腰背部痛の原因である椎間板変性、関節痛の原因となる変形性関節症、そして骨粗鬆症患者の増加は、医療経済の面から見ても大きな社会問題であり、その予防と治療に対する斯界の関心が高まっている。椎間板変性や関節軟骨変性は、骨粗鬆症を生ずる年代で合併していることが多い。現在、骨粗鬆症治療薬として新規薬剤が盛んに開発され、なかでもアレンドロネートなどの第3世代のビスフォスフォネート製剤は臨床使用が可能となり、EBM (evidence based medicine) に基づいた中心的な治療薬になりつつある。これまでビスフォスフォネート製剤は破骨細胞の機能を抑制し、骨芽細胞の代謝機能を活性化すること

により骨量を増加させ、その結果骨密度を増加させることが基礎的・臨床的研究で明らかにされ、日常臨床でも広く使用されている。しかし、これまでビスフォスフォネート製剤が関節や椎間板などの軟骨組織に及ぼす影響については全く検討されていない。椎間板変性や変形性関節症の主因は椎間板や軟骨細胞より産生されるプロテオグリカン (PG) の低下である。そこで、本研究ではビスフォスフォネート製剤が関節軟骨や椎間板細胞の PG 代謝に対してどのような影響を及ぼすかを検討した。

#### 2. 研究の目的

これまで骨粗鬆症の治療研究領域で、アレンドロネートが関節軟骨や椎間板細胞に及

ぼす影響を調査した研究は国内外で行なわれていない。しかし、アレンドロネートは骨芽細胞でその代謝機能が活性化することが報告されており、同様の線維芽細胞系での椎間板や関節軟骨細胞での PG 代謝活性化が証明できれば、骨粗鬆症の治療だけでなく椎間板変性や変形性関節症の予防につながる薬剤であるかどうかを検索することができる。

### 3. 研究の方法

成牛の中手手根関節より採取した軟骨組織、そして尾椎椎間板より採取した髓核組織を細胞に分離後、正常の関節軟骨そして椎間板内で見られる細胞密度 ( $4 \times 10^6$  cells/ml) になるよう 1.2%-Alginate gel を混入してビーズを作成した。まず、アレンドロネートの dose-response study を行った。アレンドロネートを投与しないコントロール、そして  $10^{-12}$  から  $10^{-1}$  mol/L の濃度のアレンドロネートを培養液内に添加し、6% FCS, 21% 酸素下、pH7.4、400mOsmol の培養液内で5日間の3次元培養を行った。次に、健全な軟骨組織で見られる細胞外環境 (400 mOsmol, 5% oxygen) と変形性関節症や椎間板変性下で見られる病的な細胞外環境 (270 mOsmol, <1% oxygen) 下での培養を行い以下の項目を計測し、比較・検討した。細胞の生存率は、培養2日目と5日目に LIVE/DEAD assay を用いて走査型レーザー顕微鏡下に、グリコサミノグリカン産生量の計測は DMB assay を、細胞代謝能の指標となるラクテート産生量は Lactate reagent を使用して分光光度計で計測した。また、プロテオグリカンの合成能は sulfate を使用してシンチレーションカウンターで計測した。

### 4. 研究成果

Dose-response study では、投与後2日目そして5日目とも  $10^{-4}$  mol 以下では細胞の生存率は80%以上であったが、 $10^{-3}$  mol/L 以上では明らかに生存率が低下していた。Dose-response study の per ml 当たりの GAG 産生量は時間経過とともに増加し、培養5日目ではコントロール群で約 180  $\mu$ g であったのに比し、 $10^{-9}$  と  $10^{-8}$  mol/L の投与群では約 250 - 260  $\mu$ g と明らかに増加していた。同様の実験系で、単位細胞数あたりの乳酸産生量は、時間経過と共に細胞の代謝能は低下していたが、培養5日目では  $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/L の投与群でコントロールに比し明らかに上昇していた。また、軟骨細胞のプロテオグリカン合成能も時間経過とともに低下していましたが、培養5日目で  $10^{-9}$  と  $10^{-8}$  mol/L のアレンドロネート添加した群で control に比し明らかに上昇していた。以上の研究結果より、アレンドロネートが  $10^{-8}$  mol/L で軟骨細胞や髓核細胞のプロテオグリカン代謝を最も増大させたことより、この濃度のアレンドロネートを健全な軟骨組織で見られる細胞外環境 (400 mOsmol, 5% oxygen) と変形性関節症や椎間板変性下で見られる病的な細胞外環境 (270 mOsmol, <1% oxygen) 下で添加し比較検討した。その結果、健全な細胞外環境下では軟骨や髓核細胞の乳酸産生量、GAG 産生量、PG 合成能は明らかに上昇したが、病的条件下ではプロテオグリカン代謝の増加は見られなかった。よって、ビスフォスフォネート製剤であるアレンドロネートは健全な細胞外環境下で椎間板や軟骨細胞の PG 代謝を亢進させ、軟骨組織の変性予防に有用な薬剤であると考えられた。

## 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4件)

- ① Experimental syringo-hydromyelia induced by adhesive arachnoiditis in rabbit: Changes of blood-spinal cord barrier, neuroinflammatory foci and syrinx formation. Kobayashi S, Kato K, Guerrero AR, Yoshizawa H, Baba H. J Neurotrauma. 2012 Mar 22. [Epub ahead of print] PMID: 22439613 [PubMed - as supplied by publisher] (査読有)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439613>
- ② Lidocaine cytotoxicity to the bovine articular chondrocytes in vitro: Changes in cell viability and proteoglycan metabolism. Miyazaki T, Kobayashi S, Takeo K, Yayama T, Meir A, Baba H. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 19:1198-1205, 2011. (査読有)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21229231>
- ③ Development of a chronic cervical cord compression model in rat: changes in the neurological behaviors and radiological and pathological findings. Kubota M, Kobayashi S, Nonoyama T, Shimada S, Takeo K, Miyazaki T, Guerrero AR, Iwamoto H, Baba H. J Neurotraum 28:459-467, 2011. (査読有)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21294701>
- ④ 椎間板造影で使用される造影剤が髄核細胞活性に及ぼす影響: 宮崎 剛, 小林 茂, 竹野建一, 内田研造, 馬場久敏. 中部日整災外会誌 54: 549-550, 2011. (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① The effect of bone morphogenetic protein-7 under low osmotic conditions as seen in degenerated discs. The rate of glycosaminoglycan accumulation by disc cells in vitro: Kobayashi S, Takeo K, Miyazaki T, Meir A, Baba H. The 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco (US), Feb 6, 2012

- ② Changes in blood flow, oxygen tension, action potentials and vascular permeability induced by arterial ischemia or venous congestion on the lumbar spinal cord in dogs: Kobayashi S, Kubota M, Miyazaki T, Baba H. The 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco (US), Feb 6, 2012
- ③ Experimental syringo-hydromyelia induced by adhesive arachnoiditis in rabbit. Ultra-structural changes by cerebro-spinal fluid (CSF) flow disturbance and syrinx formation. Kobayashi S. The 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco (US), Feb 6, 2012
- ④ Effect of alendronate on proteoglycan production and cell metabolism in bovine articular chondrocytes in alginate culture: Kobayashi S, Miyazaki T, Meir A, Baba H. The 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco (US), Feb 4, 2012
- ⑤ アレンドロネートが関節軟骨細胞外基質の新陳代謝に及ぼす影響. 三次元培養下での軟骨細胞のプロテオグリカン代謝について: 小林 茂, 宮崎 剛, 竹野建一, 根来航平, 馬場久敏. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 前橋, 2011. 10. 21
- ⑥ 椎間板造影で使用される X 線造影剤が椎間板軟骨細胞に及ぼす影響: 宮崎 剛, 小林 茂, 竹野建一, 渡邊修司, 内田研造, 馬場久敏. 第84回日本整形外科学会学術総会, Web 開催, 2011. 5. 12

[図書] (計1件)

- ① Unilateral minimally invasive posterior lumbar interbody fusion (Unilateral Micro-PLIF) for degenerative spondylolisthesis: Surgical technique: Kobayashi S. Microsurgery (Borovikov AM, ed.). In-Tech, 2011: In press. (ISBN 978-953-307-783-3)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者

小林 茂 (KOBAYASHI SHIGERU)  
福井大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：80234821

(2) 研究分担者

竹野 建一 (TAKENO KENICHI)  
福井大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90432145

宮崎 剛 (MIYAZAKI TSUYOSHI)  
福井大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80324169

馬場 久敏 (BABA HISATOSHI)  
福井大学・医学部・教授  
研究者番号：00165060