

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590723

研究課題名(和文) ラジオ波温熱刺激を用いた変形性関節症の疼痛抑制効果に関する研究

研究課題名(英文) Effect of radiofrequency hyperthermia on pain thresholds in osteoarthritis

研究代表者

高橋 謙治 (Takahashi, Kenji)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30347447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：Hartley guinea pigは膝関節OAが自然発生する。guinea pigの右膝関節を動物用小型ラジオ波発信器でラジオ波照射した。経時的に膝関節を採取し、細胞の老化、細胞死と関連しOAの進展防止に重要であるautophagyのマーカであるULK1 およびBeclin1の免疫組織化学を行った。正常軟骨ではautophagyが見られるのに対し、OA軟骨では軟骨の変性程度と関連して低下していた。照射によりautophagyが活性化し、OA治療効果につながる可能性を見いだした。また1カ月に1回、6カ月間ラジオ波照射を行い、OAの組織学的重症度を評価したところOAの進行が抑制された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the mechanism underlying the therapeutic effects of radiofrequency hyperthermia in naturally occurring OA of Hartley guinea pigs by investigating the level of autophagy. Thermotron-RF300, which can apply a 13.56 MHz radio frequency pulse to the animal knees was used to perform hyperthermia. The quantitative analysis of the distribution of positive cells showed that, in the normal cartilage, ULK1 and Beclin1 were highly expressed. Seven days after the exposure to the radiofrequency, the expression levels of ULK1 and Beclin1 were augmented in animals with moderate OA. The severity of cartilage degradation was significantly reduced in the radiofrequency-treated knees compared with the untreated left knees. These results suggest that radiofrequency hyperthermia can stimulate autophagy, which is reduced in OA cartilage. In addition, radiofrequency reduced the severity of spontaneous osteoarthritis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：変形性関節症 温熱療法 動物モデル ラジオ波

1. 研究開始当初の背景

社会が豊かになり、高齢化が進むとともに生活の質(QOL)が向上し、健康寿命が叫ばれる現代においては、運動器の障害を克服することが強く望まれている。運動器を障害する大きな要因の一つとして、膝を中心に荷重関節に生じる変形性関節症(osteoarthritis; OA)がある。最近の疫学調査によればわが国のOAの有症罹患患者は1000万人以上とされ、進行すると疼痛や可動域制限によってADLが著しく低下する。OA膝関節の疼痛を軽減させる方法としてさまざまな薬物療法や装具療法があるが疼痛を軽減できず、侵襲の大きな手術療法を必要とすることも多い。われわれはこれまでに、関節に対する温熱刺激が関節軟骨の基質代謝を改善させること、温熱によって誘導される熱ショックタンパク質(heat shock protein; HSP)がOAの病態進行に重要である関節軟骨細胞のアポトーシスを抑制し、軟骨保護作用があることを報告してきた。

深部にある関節軟骨に温熱刺激を与えるためには、生体内で熱エネルギーに変換されて深部まで温熱効果が到達される超音波や極超短波、超音波などの変換温熱を利用する必要がある。まず、われわれは臨床で用いられている2.45-GHz極超短波を用いて家兎の膝関節に温熱刺激を与えた。関節内の温度は極超短波による熱刺激は出力が大きくなるに伴い上昇した。40Wの出力で関節内温度が約40となり、その際に関節軟骨のproteoglycanおよびtype II collagenの発現が強く亢進した。この際主要なHSPであるHSP70が軟骨細胞内に蓄積していることを確認した。HSP70の発現を阻害するケルセチンをあらかじめ関節に投与すると極超短波による熱刺激によるproteoglycanの発現亢進効果は消失した

が、type II collagenの発現亢進効果は変化しなかった。つまり、関節に対する極超短波による熱刺激は一部分はHSP70の発現を介して、軟骨基質代謝を上昇させる可能性があった。

関節までの距離、皮下脂肪および筋肉の量など動物と人ではおおきく異なるため、人での至適な熱刺激の条件を検討する必要がある。筋肉等価寒天ファントムにマイクロ波および超音波を照射し温度上昇を観測するシミュレーション実験を行った。極超短波を100Wで10分照射すると表面から3-4cmの深度まで温度上昇がみられた。この際、表面温度は11度上昇した。表面はかなり温度が上昇するが深部には温熱効果が少ないことが判明した。実際に極超短波照射時の関節内の温度を測定したところ、アプリケーションを膝前方10cmから照射すると膝蓋上嚢内の温度は32度前後から約10度上昇した。この際膝前面皮膚の熱感はきわめて強かった。膝後方から照射すると膝蓋上嚢内の温度は変化しなかった。これらの研究結果から極超短波照射は小動物の場合と異なりヒトの膝関節全体の温度を上昇するには適さず、局所的な温熱効果にとどまることが判明した。

一方身体深部の悪性治療に対する温熱療法にラジオ波が用いられている。ラジオ波は電磁波のうち通常300MHz以下のものをいい、極超短波より低い周波数である。ラジオ波照射器(Thermotron RF-8、山本ビニタ)による関節内温度変化を測定したところ8MHz、200W、20分間のラジオ波は膝関節内温度を34.4から39.4°Cに上昇させた。そこで膝OAの12関節にこの条件で1週間隔、3回ラジオ波を照射したところ日本整形外科学会膝OA治療判定基準(JOAスコア)同期間で67.5点から86.25点に有意に改善した。OARSI criteriaによるレスポンスは67%であり、他の保存療法の報告

と比べて高い割合であった。極超短波と比較した研究では有意にラジオ波での症状改善効果が大きかった。人体三次元 FEM モデルを用いたラジオ波膝加温シミュレーションでは膝関節内全体が約 40℃まで加温可能であった。人の膝 OA に対する温熱療法では膝全体の加温が可能な深部温熱療法が必要でありラジオ波はこの点で優れていることが判明した。

2. 研究の目的

研究代表者は関節に対する温熱のメリットについてかねてから着目し永年にわたって詳細に検討している。この分野の研究は安全、簡便で普及が容易な新規の関節疾患治療法に結びつく有望な領域であるにもかかわらず世界でもあまり注目をあびていない。OA や関節リウマチなどの関節疾患では、運動療法などの理学療法とともにホットパックや超短波による物理療法が汎用されている。古典的にそのメカニズムは温熱によるコラーゲン線維の易伸展性の亢進、疼痛閾値の上昇による鎮痛効果、筋紡錘の伸展感受性の低下による筋緊張低下作用、局所血流増加作用、組織代謝増加作用などがあるとされているが詳細に検討した報告はない。また、関節深部に存在する関節軟骨および軟骨下骨の温度を調節できる機器での研究は報告されていない。

われわれは比較的表面を加温するホットパックや極超短波と異なり、ラジオ波照射がヒト関節内部まで加温可能なことを確認している。関節深部まで加温可能なラジオ波が OA の症状を軽減し、病態進行に良好な効果を与えることが客観的に証明できれば、これをもとに非侵襲的で簡便な OA の新規治療法を開発することができる。高齢者の QOL 維持に多大な恩恵があると考えられる。本研究はラジオ波の変形性関節症に対する効果を客観的に明らかにすること、明することを目的とする。

3. 研究の方法

OA 自然発症モデルである Hartley guinea pig を用いた。3 カ月齢、5 カ月齢、9 カ月齢および 18 カ月齢 Hartley guinea pig (500 ~ 8000g) の右膝に対し Thermotron-RF-300 (山本ビニタ社製)(下写真)を用いてラジオ波を照射した。



ネブプタール (50mg/kg) を腹腔内投与し全身麻酔を行ったのちに右膝関節を固定台に安定させ、アプリーケーターを内外側からはさんで加温した。右膝に熱電対を挿入して関節内温度を計測した。ラジオ波は 15.56 MHz を用い関節内温度を約 40℃に上昇するように 30-50W の出力で調整した。照射後通常のケージで飼育を続け経時的に安楽死させ、両膝を採取した。10%EDTA 2NA 液 (PH7.0~7.4) で脱灰しパラフィン包埋した。膝矢状断で 4 μm の薄切切片を作成した。

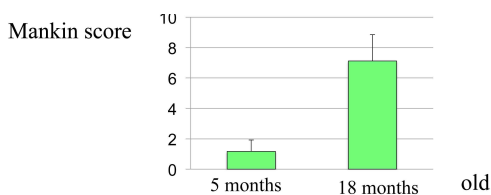
サフラニン O 染色を行い Mankin らの semiquantitative histochemical-histologic scoring で OA の組織学的評価を行った。抗 HSP70 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 Beclin1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 ULK1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて免疫組織化学的染色を行った。対物レンズ倍率 20 倍での 4 視野で陽性細胞の比率を平均した。

4. 研究成果

1. Hartley guinea pig の OA 自然発症

Hartley guinea pig は 4 カ月齢頃より OA 変化が膝関節軟骨に出現することが報告されている。本研究では 5 カ月齢ではほとんど OA 変化は認めなかったが、9 カ月齢では軟

骨表層のサフラニン染色性の低下、fibrillation、細胞のクラスター形成や減少、軟骨下骨への血管進入などヒトのOA軟骨類似の変化を認め、月齢の増加とともに顕著になった。5カ月齢および18カ月齢の関節軟骨を評価したところ(各 n=6) Mankin の histologic score でそれぞれ 1.17 ± 0.75 、 7.12 ± 1.72 であり有意に18カ月齢でOAが重症化していた。Hartley guinea pig は加齢に伴いOAが自然発症、進行することを確認した。



5. 主な発表論文等
(研究代表者、

2. 関節軟骨の加齢に伴う autophagy の発現変化

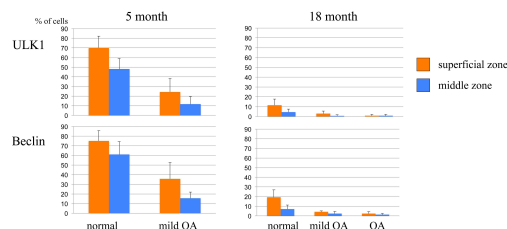
細胞にはストレスで損傷した細胞内小器官、変性たんぱく質をまとめてつつんでライソソーム酵素で分解してしまう autophagy というシステムがある。健康や長寿に関係し、autophagy が十分機能しないと老化、変性疾患、癌などが発生することが報告されている。OAの進行や軟骨の加齢に伴い、関節軟骨細胞の autophagy が減少することが明らかにされている。Hartley guinea pig の関節軟骨の autophagy の発現が加齢によって変化するか確認した。Autophagy のマーカーである ULK1 および Beclin1 を免疫組織化学で染色し、加齢による発現変化を検討した。

ULK1 はまだOA変化の少ない5カ月齢では表層軟骨細胞で75%、中間層で61%が陽性であった。これに対しMankin score が4点までの軽度OA部位では表層、中間層でそれ

ぞれ36%、16%と減少していた。18カ月齢では非荷重部の変性がない軟骨表層で陽性細胞は19%、軽度OA部位で4%、5点以上の重度OA部位で2%であった。中間層では健常軟骨でも7%であった。

Beclin1 はまだ5カ月齢の健常軟骨では表層で70%、中間層で48%が陽性であった。これに対しMankin score が4点までの軽度OA部位では表層、中間層でそれぞれ24%、12%と減少していた。18カ月齢では健常軟骨表層で陽性細胞は12%、軽度OA部位で3%、5点以上のOA部位で1%であった。中間層ではほとんど陽性細胞を認めなかった。

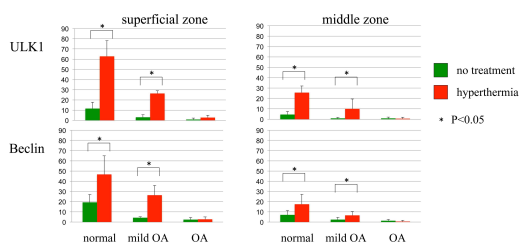
以上の結果から Hartley guinea pig の関節軟骨で autophagy は健常部では主に表層で発現しているが加齢およびOAの進行とともに減少することがわかった。過去の別の動物モデル関節軟骨およびヒト関節軟骨での報告と一致した所見であった。



3. ラジオ波加温による加齢関節軟骨の autophagy 発現変化

18カ月齢のHartley guinea pig 膝に20分間、関節内温度が約40℃となるように照射し、6、24、96時間および7日後に膝を採取し、ULK1 および Beclin1 の発現を調べた。健常軟骨および軽度OA部分で96時間および7日後に照射していない対照と比較してどちらの発現も有意に亢進していた。健常部表層ではULK1陽性細胞は47%、軽度OA部では26%に増加していた。Beclin1陽性細胞も健常部で67%、軽度OA部で26%と有意に増加した。中間層でも健常部、軽度OA部では両マーカーともラジオ波照射で有意に亢進した。一方重度OA部では、ラジオ波照射後も陽性

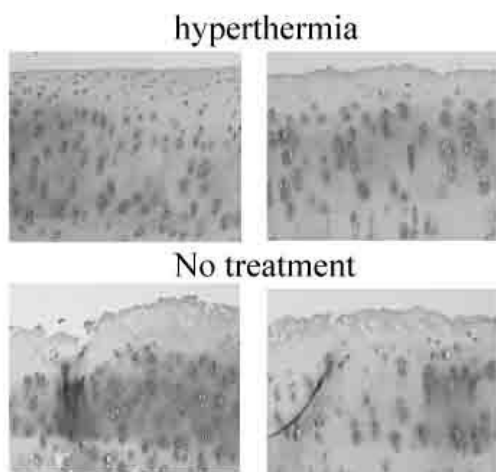
細胞はほとんど認めなかった。



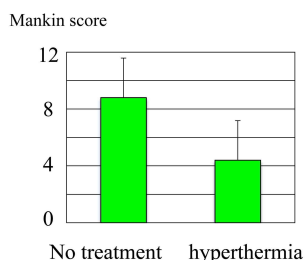
以上の結果から加齢軟骨で減少している autophagy は OA が重度でなければラジオ波加温によって賦活される可能性が判明した。

3. ラジオ波加温による OA 進行抑制効果

3 カ月齢 Hartley guinea pig 右膝に 1 カ月 1 回、合計 6 回ラジオ波を照射し、最終照射から 1 カ月後に安楽死させ両膝を採取した。評価時は 9 カ月齢であった。下写真のごとく温熱療法 (hyperthermia) を行った右膝は表層のサフラニン染色性は低下しているものの、対照 (左膝) と比較し表層は平滑で細胞数の減少が少なかった。

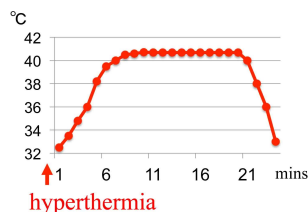


Mankin score で比較すると右膝 4.4 ± 2.8 、左膝 8.8 ± 4.0 で有意にラジオ波加温を 6 カ月行った右膝の OA 重要度が低かった。この結果からラジオ波温熱療法は自然発症 OA の進行抑制効果があることが判明した。

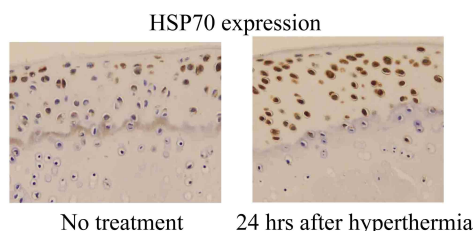


4. ラジオ波照射による関節軟骨細胞の HSP70 発現

Hartley guinea pig の膝関節内に熱電対を挿入しラジオ波 (15.56 MHz) を照射した際の関節内温度は約 20 分間、 40°C に上昇する出力に調整した。



ラジオ波照射後 24 時間で膝を採取し軟骨細胞の HSP70 の発現を免疫組織化学で調べると HSP70 陽性細胞は対照と比較して全層にわたって増加していた。HSP70 は autophagy 発現に関与していることが報告されており、ラジオ波による autophagy 誘導の機序の可能性がある。



本研究ではラジオ波による膝加温は自然発症 OA の進行を抑制すること、その機序のひとつに autophagy の賦活化がある可能性が判明した。今後の臨床応用に有用な結果である。

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Kenji Takahashi Hiroshi WatanabeYusuke Mochizuki, Sanshiro Hashimoto, Yoshihiko Satake, Hiroshi Nakamura, Shinro Takai, Efficacy of radiofrequency hyperthermia on the cartilage in guinea pigs with primary osteoarthritis. 8th Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies, Venice, Italy, 2013.10.13-16

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

掲載予定

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋謙治 日本医科大学 医学部准教授

研究者番号：30347447

(2)研究分担者

小澤一史 日本医科大学 医学部教授

研究者番号：60169290