

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：平成 23 年度 ～ 平成 24 年度

課題番号：23650333

研究課題名（和文） 変形性関節症に対する薬剤併用温熱療法の開拓

研究課題名（英文） The analysis of thermotherapy combined with drugs for osteoarthritis

研究代表者 久保 俊一

(KUBO TOSHIKAZU)

京都府立医科大学・医学系研・教授

研究者番号：20178031

研究成果の概要（和文）：微弱電流刺激(mild electrical stimulation: MES)と温熱刺激(heat shock: HS)の併用は、軟骨細胞および関節軟骨における heat shock protein 70 (HSP70)を誘導し、軟骨基質代謝を亢進させることを明らかにした。そのメカニズムとしてはMESがユビキチン-プロテアソーム系を抑制し、HSP70の分解を抑制することを通じてHSP70が蓄積したと考えた。MESとHSの併用は変形性関節症の新規理学療法として臨床応用につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated mild electrical stimulation (MES) in combination with heat shock (HS) treatment induce heat shock protein 70 (HSP70) in chondrocytes and articular cartilage and enhances cartilage matrix metabolism. The increase of HSP70 protein in chondrocytes is also thought to be due to inhibition of the ubiquitin-proteasome system by MES, resulting in inhibition of HSP70 protein degradation and accumulation of HSP70 protein. MES in combination with HS can be a novel physical therapy for osteoarthritis by inducing HSP70 in articular cartilage. □

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：変形性関節症、heat shock protein 70、温熱療法、微弱電流刺激、ユビキチン化タンパク

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は関節軟骨変性を主たる特徴とした進行性の疾患である。進行したOAにおいては、疼痛および関節可動域の制限により患者の日常生活は制限される。OAの治療法は保存療法と手術療法があり、病期および症状に基づいて選択される。人工関節置換術のような手術療法は進行したOAに対して行われる。しかし、侵襲や合併症といった安全性や費用の面で問題が残っている。それゆえ、早期に効果的な保存療法を行うことが望ま

しい。OAの保存療法としては、薬物や理学療法が用いられている。近年、コンドロイチンやグルコサミンの効果が報告されてきているが、これらのサプリメントを使用することで、OAの進行を完全に抑制することはできない。高価でなく、侵襲の少ない保存療法の開発が必要である。

OAに対する温熱療法は、理学療法の一つとして、臨床で幅広く用いられている。膝関節に対する局所的な温熱が疼痛と理学所見を改善する。過去の研究において、

hyperthermia すなわち温熱刺激が軟骨細胞および関節軟骨で Heat Shock Protein 70 (HSP70) を誘導することが報告されている。

HSP70 は、ストレス負荷の後に細胞内で産生される、高度に保存されたタンパクファミリーのひとつであり、さまざまなタイプのストレスから細胞を保護する働きがある。ヒト OA 関節軟骨において重症度に相関して HSP70 の発現が亢進していた。HSP70 は軟骨基質代謝を亢進させ、細胞傷害性ストレスから細胞を保護し、アポトーシスを著しく抑制した。さらにラット OA モデルに対して関節軟骨に HSP70 遺伝子を導入することで OA の重症度を抑制できた報告がある。それゆえ、関節軟骨で十分な量の HSP70 を誘導することができれば、OA の治療につながる可能性がある。一方、温熱刺激は確かに HSP70 を増加させるが、OA の病態を改善するという報告はない。これは温熱刺激による HSP70 の誘導が十分でないからかもしれない。

Low-intensity direct electrical current すなわち mild electrical stimulation (MES) はさまざまな医学的な問題に有効な手段である代替医療として用いられており、すでに安全性が確立されている。MES の臨床における良い効果は、炎症の抑制や創の治癒や疼痛の抑制や血流の増加がある。近年、微弱電流刺激 (MES) がユビキチン-プロテアソーム経路による蛋白分解を阻害することにより A549 細胞で HSP70 を増加させることが明らかになった。しかし微弱電流刺激が関節軟骨に及ぼす影響はいまだ不明である。

2. 研究の目的

MES と HS が関節軟骨に及ぼす影響を調べる

3. 研究の方法

日本白色家兎の関節軟骨を単離培養し、control 群、MES 群、HS 群、MES+HS 群の 4 群を作製した。MES には直流矩形波 (5V、0.1ms、55 回/秒) を用いた。培養皿を恒温槽 (42 度) に浸し HS とした。LDH アッセイで細胞生存を、real time RT-PCR で HSP70 の遺伝子発現を、さらに Western blotting で HSP70 と Ub を検討した。

ラット膝関節に温熱を発生する電極を用いて MES および HS を負荷し、in vitro と同様に 4 群に分けた (図 1 A、B、C)。

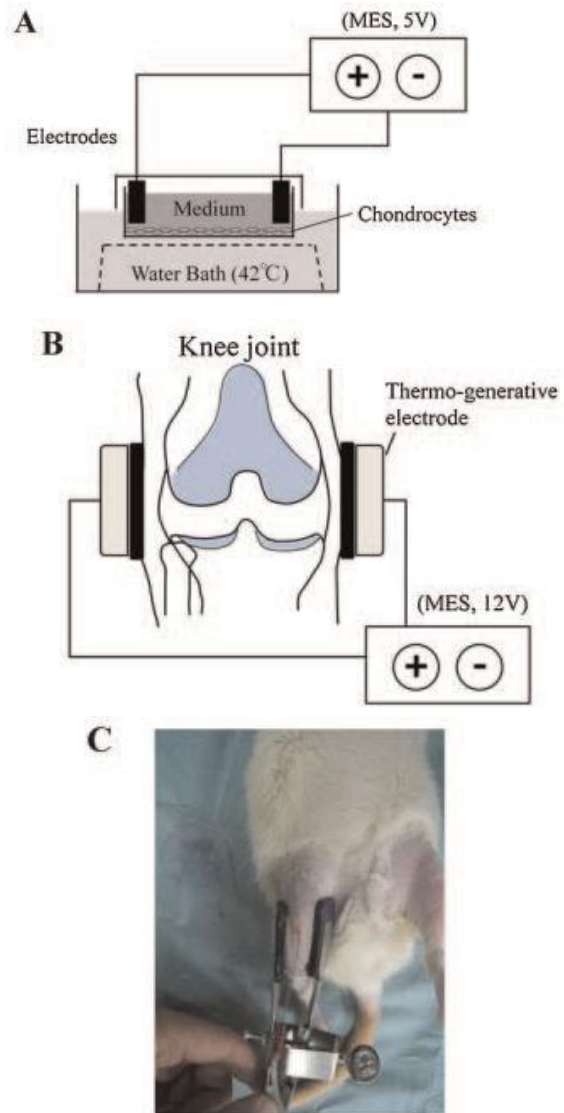


図 1 微弱電流刺激+温熱刺激

関節軟骨における HSP70 およびプロテオグリカン (PG)、2 型コラーゲン (Co12) の遺伝子発現を real time RT-PCR で、HSP70 と Ub を Western blotting で調べた。

4. 研究成果

細胞生存は各群間で有意差を認めなかった。(図 2 A、B)

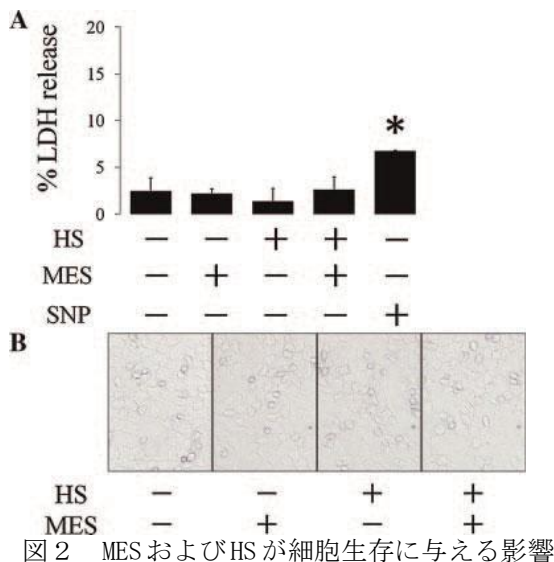


図2 MESおよびHSが細胞生存に与える影響

In vitro ではMES群のHSP70遺伝子発現はcontrol群と比較して有意差を認めなかったが、HS群およびMES+HS群では有意に増加した。(図3)

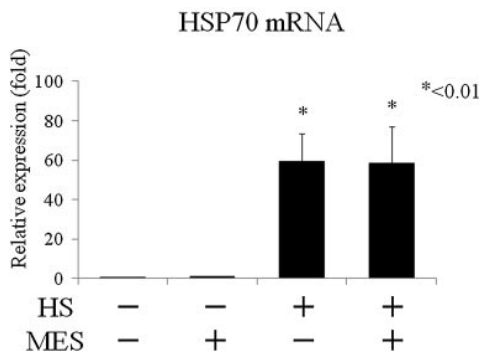


図3 MESおよびHSが軟骨細胞のHSP70遺伝子発現に与える影響

タンパク産生はMES群でHSP70およびUbはわずかに増加した。HS群でHSP70産生は増えた。MES+HS群ではともに強く誘導された。(図4)

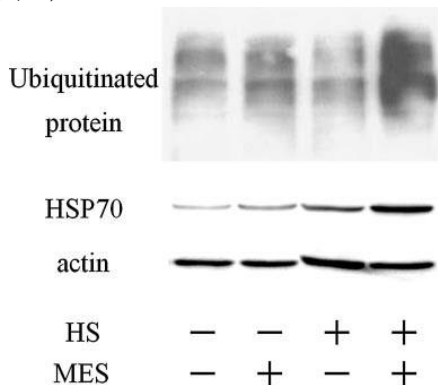


図4 MESおよびHSが軟骨細胞のUbおよびHSP70タンパクに与える影響

In vivo でも同様にHS群およびMES+HS群

におけるHSP70遺伝子発現は有意に上昇した。HSP70およびUbの蛋白産生は著しく増加した。(図5)

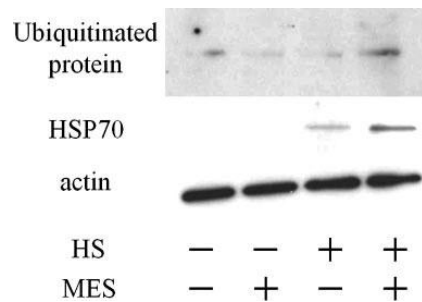


図5 MESおよびHSが関節軟骨のタンパク産生に与える影響

関節軟骨におけるHSP70の遺伝子発現は、in vitroの結果と同様に、HS群およびHS+MES群で有意に亢進した。PGの遺伝子発現はHS+MES群で有意に増加した。Col2は各群間で有意差を認めなかった。(図6)

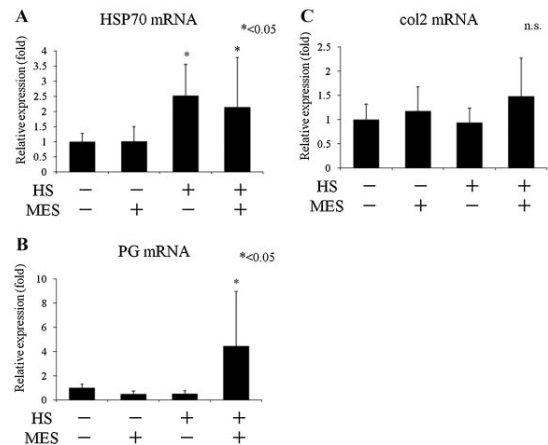


図6 MESおよびHSが関節軟骨の遺伝子発現に与える影響

本研究は、MESが、HSとあいまって培養軟骨細胞および関節軟骨でHSP70蛋白質を増加させ、関節軟骨で軟骨基質代謝を亢進させることを明らかにした。

本研究では、in vitroでMES+HSで細胞傷害性変化を引き起こさなかった。関節内の温度は、熱を発生する特殊なゴム製電極を用いて直接的に温熱を電導することで十分に上昇させられた。In vivoにおいても熱傷などの有害事象を引き起こさなかった。以上からこの方法は安全な方法であると考えた。

微弱電流は軟骨細胞でHSP70 proteinおよびユビキチン化タンパクを増加させ、HSP70の遺伝子発現を増加させなかった。軟骨細胞でHSP70が増加したことは、微弱電流がユビキチン-プロテアソーム系を抑制し、HSP70の分解を抑制することを通じてHSP70が蓄積

したことによると考えた。

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 1 件)

Hiraoka N, Kubo T, et al. Mild electrical stimulation with heat stimulation increase heat shock protein 70 in articular chondrocyte. J Orthop Res. 31: 894-900, 2013. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①井上裕章, 久保俊一, 他. グルタミン投与と温熱刺激の併用による軟骨細胞への HSP70 発現誘導. 第 25 回日本軟骨代謝学会, 2012/3/10, 名古屋

②井上裕章, 久保俊一, 他. 温熱刺激とグルタミンの併用による HSP70 誘導療法のラット変形性関節症に対する進行抑制効果. 第 27 回日本整形外科基礎学術集会. 2012/10/26-27, 名古屋

③松木智宏, 久保俊一, 他. 温熱刺激とグルタミンを併用した HSP70 誘導法による変形性関節症に対する進行抑制効果の検討. 第 40 回日本生体電気・物理刺激研究会. 2013/03/09

[図書] (計 0 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

久保 俊一 (KUBO TOSHIKAZU)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 20178031

(2)研究分担者

新井 祐志 (ARAI YUJI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号: 50347449

(3)連携研究者

()

研究者番号: