

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462226

研究課題名(和文) 超高分子量ヒアルロン酸の関節軟骨マトリクスに与える影響の機序の解明と制御

研究課題名(英文) Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model.

研究代表者

船越 忠直 (Funakoshi, Tadanao)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：10528334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症に対する保存加療において用いられるヒアルロン酸製剤の分子量に依存する効果の違いについては不明な点が多い。ウサギ膝変形性関節症モデルを用いて異なる分子量(低分子量ヒアルロン酸(0.8 x 10⁶ Da)および超高分子量ヒアルロン酸(6 x 10⁶ Da)のヒアルロン酸がもつ軟骨保護作用について肉眼的、組織学的、生体力学的に検討した。超高分子量ヒアルロン酸は、優れた軟骨保護作用と低摩擦係数を示した。本研究結果により超高分子量ヒアルロン酸投与は軟骨表面の保護作用を有し、関節症性変化の進行抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effect of hyaluronic acid (HA) for osteoarthritis is still controversial. We examined the histopathological changes and the friction coefficient in osteoarthritic knee joint after different molecular weight HA injection (low molecular weight HA, 0.8x10⁶ Da or Ultra-high molecular weight, 6x10⁶ Da) using a rabbit osteoarthritis model. Macroscopic findings showed that severe damaged cartilage was observed in 10% of Ultra-high molecular weight HA and 30% of low molecular weight HA and NS. The histological score and the friction coefficient value of Ultra-high molecular weight HA group were significantly lower than those of the control group (P < 0.05). Ultra-high molecular weight HA has potential chondroprotective effects and superior friction coefficient. These factors would contribute to prevent progression of osteoarthritis. Intrajoint alteration of molecular weight HA should be clarified in future study.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リハビリテーション 理学療法 四肢機能再建学

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(以下 OA)は生活機能を低下させ生活寿命を短縮させる。1000 万人以上の有病率で、2010 年には人口の 25%以上が 65 歳以上となるため、今後も OA の患者数は増加すると考えられる。

OA の薬学的治療としては関節痛を軽減させ、関節の動きをスムーズにすることに重きが置かれている。変形性関節症において関節液中のヒアルロン酸分子は 50~300 万に低下し十分な摩擦軽減作用が得られないことが報告されている。ヒアルロン酸の関節への注入はこれらに有益であり OA 発展の進行防止の一役を担うという報告が散見される。また、ヒアルロン酸を外部から注入することで関節液の潤滑性を増大させ、軟骨からのグリコサミノグリカンの放出を抑えることで軟骨の変性を遅らせる効果があり、抗炎症作用、アポトーシス抑制作用を有するとの報告もある。実際、様々な国で OA の治療にヒアルロン酸の関節内注射は用いられている。我が国では分子量の異なるヒアルロン酸製剤が臨床応用され、近年さらに高分子ヒアルロン酸の臨床応用が認可された。この高分子ヒアルロン酸は分子量が 600 万と正常に近い粘弾性をもち、有効な関節内潤滑作用が期待される。しかし、高分子ヒアルロン酸が生体内でどの程度関節内に滞留し、どの程度まで分子量を保持しているかについては未だ不明な点も多い。

我々は既に日本白色家兎を用いたゲル関節投与モデルによる効果判定のプロトコルを確立し報告している。すわなちコントロールとして生理食塩水、対象となるゲル製剤を膝関節に注入し、1)肉眼的解析、2)組織学的解析、3)摩擦係数測定、4)臨床評価について比較検討する実験系である。本実験モデルは分子量の異なるヒアルロン酸の生体内に与える効果判定に有効であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の作業仮説は、分子量の異なるヒアルロン酸を膝関節内に投与すると膝関節内全体のヒアルロン酸分子量分布が異なることとし、この仮説を証明するために、本研究の目的は日本白色家兎の変形性関節症モデルを用いて、異なる分子量のヒアルロン酸を膝関節内に投与しウサギ自身が産生するものと投与されたヒアルロン酸全体の分布変化およびを明らかにすることである。さらに、得られたヒアルロン酸分子量と関節滑液の粘稠度、関節軟骨変性程度、他の細胞外マトリックスの変化、摩擦力学的試験結果について比較検討し、高分子ヒアルロン酸関節内投与が与える効果を証明することである。さらに、臨床上的治療における次のステップとして関節内遊離体内の関節軟骨細胞の viability についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 60 匹の日本白色家兎を用い、全身麻酔下に両膝の前十字靭帯を切離し低分子ヒアルロン酸群 (HA80)、高分子ヒアルロン酸群 (HA600)、生理食塩水群 (コントロール) (n=12) を注射した群の合計 3 群を作成し、それぞれ両膝に 1 回/week、術後 5 週より計 3 回 (術後 5~7 週まで) 片膝 0.3ml 投与し、術後 8 週で安楽死とさせ、両膝を採取する。肉眼的所見、組織学的解析、摩擦係数測定、関節液のヒアルロン酸分子量と粘弾性について検討する。

(2) 関節遊離体及び分離軟骨組織から軟骨細胞を分離して軟骨培養を行った。培養後、生細胞数、生細胞率、増殖率、グリコサミノグリカン (GAG) 含有量、軟骨細胞含有率を評価し、組織学的に検討を行った。

4. 研究成果

(1) 肉眼所見は全膝に軽度から重度の関節症性変化を認め、関節液貯留を確認した。変性変化は脛骨側より大腿骨側により著明に見られ、India ink を用いた関節軟骨の磨耗においても同様であった。2mm 以上の関節軟骨欠損 (Grade 4) がみられた膝数は各群では大きな差を認めなかった。組織学的検討ではコントロールは 17.6、HA80 は 16、HA600 は 14.8 であり、統計学的に高分子ヒアルロン酸は有意に良好な結果であった。摩擦係数測定は 3 群間に統計学的有意差はなかったが高分子群は低分子群と比べて摩擦係数が低い傾向であった。超高分子量ヒアルロン酸は、優れた軟骨保護作用と低摩擦係数を示した。本研究結果では分子量の違いにより統計学的な差を認めなかったが、超高分子量ヒアルロン酸は軟骨表面の保護作用を有し、関節症性変化の進行抑制する可能性が示唆された。

(2) 母床より分離または遊離した軟骨組織にも細胞分化能と細胞外マトリックス産生能が存在し、より低侵襲な自家細胞移植の可能性を示唆した。今後は、より侵襲の少ない治療法としてヒアルロン酸注射の治療や細胞治療の有効性について臨床的な検討が必要と考えられる。

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 4 件)

Kameda Y, Funakoshi T, Takeuchi S, Sugawara K, Iwasaki N. Viability of Cells From Displaced Fragments of the Elbow Osteochondritis Dissecans: Alternative Source of Autologous Chondrocyte Implantation. Arthroscopy. 2017 Feb;33(2):291-296. 査読有

Funakoshi T, Furushima K, Momma D, Endo K, Abe Y, Itoh Y, Fujisaki K, Tadanao S, Iwasaki N. Alteration of Stress Distribution Patterns in the Symptomatic Valgus Instability of the Elbow in Baseball Players Using Computed Tomography Osteoabsorptiometry. Am J Sports Med, 2016,44(4):989-94. 査読有

Tsukuda Y, Onodera T, Ito M, Izumisawa Y, Kasahara Y, Igarashi T, Ohzawa N, Todo M, Tadano S, Iwasaki N:Therapeutic effects of intra-articular ultra-purified low endotoxin alginate administration on an experimental canine osteoarthritis model. J Biomed Mater Res A、2015 Nov;103(11):3441-8.、査読有

Elmorsy S, Funakoshi T, Sasazawa F, Todo M, Tadano S, Iwasaki N. Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model. Osteoarthritis and Cartilage. 2014;22(1):121-7. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

Funakoshi T, Kameda Y, Takeuchi S, Sugawara K, Iwasaki N. Viability of Cells From Displaced Fragments of the Elbow Osteochondritis Dissecans: Alternative Source of Autologous Chondrocyte Implantation. Orthopaedic Reseach Society March 19-21, 2017, San Diego (USA) .

船越忠直, Elmorsy S, 岩崎倫政: 超高分子量ヒアルロン酸が関節軟骨マトリクスに与える影響、第 65 回東日本整形災害外科学会 2016 年 9 月 22-23 日、ザプリンス芦ノ湖 (神奈川県・箱根町)

船越忠直, 松井雄一郎, 河村太介, 亀田裕亮, 岩崎倫政: 上腕骨小頭離断性骨軟骨炎に対する骨軟骨柱移植術、第 59 回日本手の外科学会、2016 年 4 月 21-22 日、広島国際会議場 (広島県、広島市)

Funakoshi T, Urita A, Amano T, Matsui Y, Kawamura D, Kameda Y, Iwasaki N. Predictive factors of the long head of biceps tendon disorders - the bicipital groove morphology and subscapularis tendon tear -. Orthopaedic Reseach Society March 5-8, 2016, Orlando (USA) .

亀田裕亮, 船越忠直, 菅原桂, 竹内俊祐, 佃幸憲, 岩崎倫政, 肘関節遊離体または分離軟骨組織を用いた培養軟骨組織の評価。第 30

回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015 年 10 月 22-23 日, 富山国際会議場 (富山県・富山市)

船越忠直, 亀田裕亮, 菅原桂, 竹内俊祐, 佃幸憲, 岩崎倫政, 肘関節遊離体または分離軟骨組織を用いた培養軟骨組織の評価。第 7 回 JOSKAS 2015.6.18~20 札幌国際会議場 (北海道・札幌市)

Elmorsy, S.; Funakoshi, T.; Iwasaki, N. In vivo chondrogenesis using chondrogenic induced human Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) mixed with a novel ultra-purified alginate gel; a report of preliminary study. Orthopaedic Reseach Society March 15-18, 2015, Las Vegas (USA) .

Funakoshi T. Furushima K; Abe Y.; Oizumi N.; Iwasaki N. Alteration of stress distribution patterns in the elbow medial collateral ligament injury. Orthopaedic Reseach Society March 15-18, 2015, Las Vegas (USA) .

Elmorsy S, Funakoshi T, Sasazawa F, Todo M, Tadano S, Iwasaki N. Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model. Osteoarthritis and Cartilage. 第 87 回日本整形外科学会学術集会 2014 年 5 月 22 日 25 日 神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸市)

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船越 忠直 (FUNAKOSHI TADANAO)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：10528334

(2) 研究分担者

岩崎 倫政 (IWASAKI NORIMASA)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30322803

東藤 正浩 (TODO MASAHIRO)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：10314402

小野寺 智洋 (ONODERA TOMOHIRO)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：70547174

(3) 連携研究者

()

研究者番号：