

Fig. 4 ROCK inhibition blocked the cyclic compression induced p38 phosphorylation and MMP13 expression. **a** Western blot analysis for p38 and MMP13. **b** qRT-PCR analysis for *MMP13*. Both SB202190 (p38 inhibitor) or/and Y27632 (ROCK inhibitor) supplementation during compression treatment blocked mechanical stress induced *MMP13* expression. Asterisk means significant differences at $p < 0.05$. All experimental groups included the vehicle of SB202190 (DMSO) at same concentration. Bars show the mean score of three independent experiments and bars depict SD

cells. Its function was closely related to chondrocyte matrix metabolism and cell physiology, for example it was shown that p38 could lead to inducing expression of transcription factor Sox9, which regulates the expression of several cartilage-specific matrix components via p38 phosphorylation [23]. Functions of p38 in the cartilage development are important; inhibition of p38 by a dominant-negative (DN) construct, which can interfere with p38 activation results in deficient endochondral bone formation and death shortly after birth. Even if the DN mutation occurs in monoallelic, the heterozygotes represent articular cartilage defects in the knee joints [24]. These facts apparently

indicate that p38 is basically essential to articular cartilage. On the other hand, in adult articular tissues, p38 is known to play an important role in inflammatory processes and some evidence suggests that the activity of the p38 can bring about negative effects for the cartilage matrix maintenance [25, 26]. In both OA and rheumatoid arthritis (RA) chondrocytes, it has been shown that p38 is selectively activated to increase MMP13 in response to an inflammatory cytokine IL-1 [13]. Furthermore, Ziegler et al. [27], demonstrated that mechanical stress induced p38 activation could result in MMP13 expression using periodontal ligament cells. Also in the present study, loading of compressive stimulation led to increased p38 phosphorylation and subsequent MMP13 expression. Though the detailed meaning of the mechanical stimulation-reacted evocation of p38 is up for debate, at least these facts suggest that p38 is a major signaling molecule in the induction of MMP13 in articular cartilage, and exploring the upper molecule of p38 is necessary to control the mechanical stress-inducible matrix degeneration reaction of the cartilage. Interestingly, it was reported that the mechanical stimulation-induced p38 phosphorylation is dependent on the α -smooth muscle actin (SMA) filament-dependent pathway [18]. In this work, it was also demonstrated that inhibition of Rho kinase intensely blocked SMA filament assembly, and subsequent mechanical stress-induced p38 activation. Upregulation of Rho activity by mechanical forces has already been demonstrated in various types of cells [14, 28–30] and the direct evocation of p38 phosphorylation by Rho/ROCK has also been reported in cancer cells [17]. Therefore, it is reasonable to consider that small GTPase Rho and its effector kinase ROCK may function in the upper part of the mechanical stress-induced matrix-degrading cascade in cartilage comprised of p38 and MMP13.

Clinically, most important finding from this study may be a fact that the ROCK inhibition actually showed inhibitory effect of p38 and MMP13. To date, specific inhibitors to p38 would be anticipated as novel medicine to RA and OA [31, 32]. On the other hand, since p38 also relates to development and maintenance of chondrocyte specific characteristics, complete interception may result in serious side effects such as defective regeneration of the injured tissues. It is possible that Rho/ROCK inhibition brings about novel alternative strategies for controlling the stress cascades while leading to unfavorable p38 activation and followed by negative reactions of chondrocyte, since it does not directly target p38 and not inhibit p38 activity completely.

To date, some beneficial effects by targeting of ROCK by the specific inhibitor has already determined in patients with cardiovascular diseases such as systemic hypertension [33] and chronic heart failure [34]. However, little is

known about the molecular mechanisms that contribute to increased Rho/ROCK activity or the downstream targets of the Rho/ROCK. The Rho/ROCK functions in chondrocyte are also almost uncovered, but some researchers reported the negative effects of Rho/ROCK on the chondrocyte phenotype. In recent studies it was described that the effects of Rho/ROCK signaling on chondrogenesis appear to be mediated by regulation of both expression and activity of the Sox9 [35]. RhoA, which is the predominant Rho isoform and important possible activator of ROCK, especially inhibits both chondrogenesis and hypertrophic chondrocyte differentiation, while inhibition of RhoA or ROCK promotes chondrocyte maturation. Tew et al. [23] reported that ROCK inhibition by Y27632 increased Sox9 expression in articular chondrocytes, and Novakofski et al. [36], confirmed that inhibition of RhoA by the Rho antagonist C3 transferase increased expression of Sox9 and its target genes collagen II and aggrecan. Importantly, there are reports demonstrating activation of the RhoA in chondrocyte by inflammatory stimulation, such as the cytokine interleukin 1 α [36] or transforming growth factor α [37], and the Rho/ROCK signaling is involved in catabolic pathways of chondrocyte homeostasis such as expression of MMP13. Also in our studies, ROCK activation by the overload of the mechanical stress brought about the MMP13 expression. On the other hand, insulin-like growth factor 1, which is an anabolic factor known to play a key role in the regulation of chondrocyte proteoglycan (PG) metabolism, was reported to repress the RhoA activity [36] contrarily. These results suggest that the Rho/ROCK activity is fundamentally evoked when the cartilage is exposed to the unfavorable extracellular factors such as inflammatory cytokines or destructive mechanical stress, and control of its function directly may lead to inhibit the collagenolytic molecules and to enhance the chondrogenesis.

In contrast, Woods et al. [38] demonstrated that the ROCK inhibition resulted in diminished mRNA levels of the transcriptional co-activators L-Sox5 and Sox6 and a decrease in Sox9 activity subsequently in the three-dimensional micro-mass cultures of mouse primary limb mesenchymal cells. Interestingly, they previously reported that Rho/ROCK inhibition results in the enhancement of chondrogenesis such as Sox9 activity and collagen II and aggrecan expression in monolayer cultures of a chondrocytic cell line ATDC5 and primary chondrocytes [39], and they concluded that the role of Rho/ROCK was dependent on the cellular context [38]. To date, it was also broadly accepted that the moderate mechanical stimulation enhances matrix synthesis of the chondrocyte [40–42]. From this aspect, if the Rho/ROCK is a common sensor of the wide mechanotransduction, we need to assume the potential risk of complete ROCK inhibition that may lead to diminution of chondrocyte matrix synthesis on the cartilage tissue level. Moreover, the present results were

obtained in the model study using bovine normal cartilage tissue with the serum-free condition, thus we think over-interpretation for clinical utility should be avoided. In the actual condition of the OA joint, the injured cartilage may receive multiple stresses adding with the mechanical force in synovial fluid including inflammatory cytokines. Therefore, actual reproducibility in the human OA joint and the realistic value of drugs targeting Rho/ROCK in the treatment of OA needs to be carefully examined in future studies. However, based on some results in vitro and an evidence of pharmacological effects such as pain reduction and chondroprotective effect of a ROCK inhibitor in the rat OA model [43], it is clear that the Rho/ROCK inhibitors are interesting candidates for OA treatment. Detailed elucidation for the function of Rho/ROCK in chondrocyte will directly lead to novel and effective way for prevention and cure of OA.

Acknowledgments We gratefully acknowledge Ms. Naomi Backes Kamimura, Department of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, for English editing. We also thank Ms. Kanae Shigi and Ms. Naoko Ohoshi for excellent technical assistance.

References

1. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med.* 2000;133:321–8.
2. Lee JH, Fitzgerald JB, Dimicco MA, Grodzinsky AJ. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2386–95.
3. Setton LA, Mow VC, Muller FJ, Pita JC, Howell DS. Mechanical properties of canine articular cartilage are significantly altered following transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* 1994;12:451–63.
4. Piscoya JL, Fermor B, Kraus VB, Stabler TV, Guilak F. The influence of mechanical compression on the induction of osteoarthritis-related biomarkers in articular cartilage explants. *Osteoarthr Cartil.* 2005;13:1092–9.
5. Messier SP. Osteoarthritis of the knee and associated factors of age and obesity: effects on gait. *Med Sci Sports Exerc.* 1994;26:1446–52.
6. Guilak F, Meyer BC, Ratcliffe A, Mow VC. The effects of matrix compression on proteoglycan metabolism in articular cartilage explants. *Osteoarthr Cartil.* 1994;2:91–101.
7. Sui Y, Lee JH, DiMicco MA, Vanderploeg EJ, Blake SM, Hung HH, et al. Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha in immature bovine and adult human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2985–96.
8. Tomiyama T, Fukuda K, Yamazaki K, Hashimoto K, Ueda H, Mori S, et al. Cyclic compression loaded on cartilage explants enhances the production of reactive oxygen species. *J Rheumatol.* 2007;34:556–62.
9. Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1653–61.

10. van den Berg WB. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. *Osteoarthr Cartil.* 2011;19:338–41.
11. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 2000;43:801–11.
12. Pei Y, Harvey A, Yu XP, Chandrasekhar S, Thirunavukkarasu K. Differential regulation of cytokine-induced MMP-1 and MMP-13 expression by p38 kinase inhibitors in human chondrosarcoma cells: potential role of Runx2 in mediating p38 effects. *Osteoarthr Cartil.* 2006;14:749–58.
13. Julovi SM, Ito H, Nishitani K, Jackson CJ, Nakamura T. Hyaluronan inhibits matrix metalloproteinase-13 in human arthritic chondrocytes via CD44 and P38. *J Orthop Res.* 2011;29:258–64.
14. Kawamura S, Miyamoto S, Brown JH. Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through caveolae: cytoskeletal regulation of ERK translocation. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31111–7. doi:10.1074/jbc.M300725200.
15. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997;11:2295–322.
16. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420:629–35.
17. Ordóñez-Moran P, Larriba MJ, Palmer HG, Valero RA, Barbachano A, Dunach M, et al. RhoA-ROCK and p38MAPK-MSK1 mediate vitamin D effects on gene expression, phenotype, and Wnt pathway in colon cancer cells. *J Cell Biol.* 2008;183:697–710.
18. Wang J, Fan J, Laschinger C, Arora PD, Kapus A, Seth A, et al. Smooth muscle actin determines mechanical force-induced p38 activation. *J Biol Chem.* 2005;280:7273–84.
19. Miki Y, Teramura T, Tomiyama T, Onodera Y, Matsuoka T, Fukuda K, et al. Hyaluronan reversed proteoglycan synthesis inhibited by mechanical stress: possible involvement of antioxidant effect. *Inflamm Res.* 2010;59:471–7.
20. De Croos JN, Roughley PJ, Kandel RA. Improved bioengineered cartilage tissue formation following cyclic compression is dependent on upregulation of MT1-MMP. *J Orthop Res.* 2010;28:921–7.
21. Sanchez C, Pesesse L, Gabay O, Delcour JP, Msika P, Baudouin C, et al. Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. *Arthritis Rheum.* 2012;64:1193–203.
22. Dmitrieva NI, Bulavin DV, Fornace AJ Jr, Burg MB. Rapid activation of G2/M checkpoint after hypertonic stress in renal inner medullary epithelial (IME) cells is protective and requires p38 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:184–9.
23. Tew SR, Hardingham TE. Regulation of SOX9 mRNA in human articular chondrocytes involving p38 MAPK activation and mRNA stabilization. *J Biol Chem.* 2006;281:39471–9.
24. Namdari S, Wei L, Moore D, Chen Q. Reduced limb length and worsened osteoarthritis in adult mice after genetic inhibition of p38 MAP kinase activity in cartilage. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3520–9.
25. Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, Bay-Jensen AC, Kassem M, Karsdal MA. MAPKs are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation—divergence in pathways leading to aggrecanase and MMP-mediated articular cartilage degradation. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18:279–88.
26. Joos H, Albrecht W, Laufer S, Brenner RE. Influence of p38MAPK inhibition on IL-1beta-stimulated human chondrocytes: a microarray approach. *Int J Mol Med.* 2009;23:685–93.
27. Ziegler N, Alonso A, Steinberg T, Woodnutt D, Kohl A, Mussig E, et al. Mechano-transduction in periodontal ligament cells identifies activated states of MAP-kinases p42/44 and p38-stress kinase as a mechanism for MMP-13 expression. *BMC Cell Biol.* 2010;11:10–24.
28. Sarasa-Renedo A, Tunc-Civelek V, Chiquet M. Role of RhoA/ROCK-dependent actin contractility in the induction of tenascin-C by cyclic tensile strain. *Exp Cell Res.* 2006;312:1361–70.
29. Teramura T, Takehara T, Onodera Y, Nakagawa K, Hamanishi C, Fukuda K. Mechanical stimulation of cyclic tensile strain induces reduction of pluripotent related gene expressions via activation of Rho/ROCK and subsequent decreasing of AKT phosphorylation in human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417:836–41.
30. Haudenschild DR, Nguyen B, Chen J, D'Lima DD, Lotz MK. Rho kinase-dependent CCL20 induced by dynamic compression of human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2735–42.
31. Pargellis C, Regan J. Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase for the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003;4(5):566–71.
32. Brown KK, Heitmeyer SA, Hookfin EB, Hsieh L, Buchalova M, Taiwo YO, et al. P38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with osteoarthritis. *J Inflamm (Lond).* 2008;5:22–30.
33. Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension.* 2001;38:1307–10.
34. Kishi T, Hirooka Y, Masumoto A, Ito K, Kimura Y, Inokuchi K, et al. Rho-kinase inhibitor improves increased vascular resistance and impaired vasodilation of the forearm in patients with heart failure. *Circulation.* 2005;111:2741–7.
35. Beier F, Loeser RF. Biology and pathology of Rho GTPase, PI-3 kinase-Akt, and MAP kinase signaling pathways in chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2010;110:573–80.
36. Novakofski K, Boehm A, Fortier L. The small GTPase Rho mediates articular chondrocyte phenotype and morphology in response to interleukin-1alpha and insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res.* 2009;27:58–64.
37. Appleton CT, Usmani SE, Mort JS, Beier F. Rho/ROCK and MEK/ERK activation by transforming growth factor-alpha induces articular cartilage degradation. *Lab Invest.* 2010;90:20–30.
38. Woods A, Beier F. RhoA/ROCK signaling regulates chondrogenesis in a context-dependent manner. *J Biol Chem.* 2006;281:13134–40.
39. Woods A, Wang G, Beier F. RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *J Biol Chem.* 2005;280:11626–34.
40. Demarteau O, Wendt D, Braccini A, Jakob M, Schafer D, Heberer M, et al. Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;310:580–8.
41. Waldman SD, Couto DC, Grynblas MD, Pilliar RM, Kandel RA. A single application of cyclic loading can accelerate matrix deposition and enhance the properties of tissue-engineered cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 2006;14:323–30.
42. Waldman SD, Spiteri CG, Grynblas MD, Pilliar RM, Kandel RA. Long-term intermittent compressive stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng.* 2004;10:1323–31.
43. Takeshita N, Yoshimi E, Hatori C, Kumakura F, Seki N, Shimizu Y. Alleviating effects of AS1892802, a Rho kinase inhibitor, on osteoarthritic disorders in rodents. *J Pharmacol Sci.* 2011;115:481–9.

強制走行負荷による非侵襲性マウス変形性膝関節症 モデルの作成

橋本和彦 赤木将男

近畿大学医学部整形外科学教室

抄 録

目的：非侵襲性で再現性に優れたマウス変形性膝関節症 (OA) モデルを作製し、その特性を明らかにする。

方法：マウス用走行強制トレッドミルを使用した。①経時的変化観察群：マウスに1回15分、11 m/分の速度、1週間に3回(2週間当たりの走行距離1 km)で、2, 4, 6, 8週間の走行負荷を加えた(各n=4)。②走行時間変化群：短時間走行群(1回7.5分、1週間に3回走行)と長時間走行群(1回30分、1週間に3回走行)を2週間走行させた(各n=4)。膝関節の変形はX線のおよび組織学的に評価した。関節軟骨変性の評価には国際関節症学会(OARSI)評価スケールを用いた。また軟骨変性のマーカーであるII型コラーゲンおよびX型コラーゲンの発現変化を免疫染色にて評価した。

結果：組織学的変化：半月板骨化、骨棘形成、十字靭帯変性および断裂、関節軟骨変性が認められ、これらの変化の出現頻度は経時的に増加した。OARSIスコア：経時的変化観察群および走行時間変化群の両群において、それぞれ走行週数および一回当たり走行時間に依存してスコアは増加した。また、OA変化は全て膝内側コンパートメントに比較し外側コンパートメントに顕著であった。関節軟骨におけるII型コラーゲンの発現は走行負荷により減少し、X型コラーゲンは発現の増加がみられた。

結論：本モデルの利点として運動負荷が生理的であること、作成方法の単純さと非侵襲性、そして何よりもOAの高い再現性および調節性が挙げられる。そして、遺伝子操作が可能なマウスを使用する本モデルでは、機械的負荷によるOAの発症および進行を、遺伝子レベルにおいて解明できる可能性が大きく示された。

Key words：マウス、変形性膝関節症、非侵襲性、動物モデル、強制走行

緒 言

変形性膝関節症(OA)は関節軟骨変性をはじめ、半月板、靭帯、滑膜、軟骨下骨の変化を含む関節全体の多様な病変を示す¹。OAの病態は依然として十分に解明されていないが、機械的負荷が関節全体の変性の進行において重要な役割を果たしていることは明らかである²。過剰な機械的負荷はOAを増悪させる重要な因子であり、また、機械的負荷の減少により関節痛の軽減および関節機能の改善が報告されているにも関わらず、機械的負荷がどのような機序でOA発症に影響を与えるかについては明らかになっていない²。これは、非侵襲性で再現性に優れ、さらに調節性のある変形性膝関節症(OA)動物モデルがなかったことが一つの理由として挙げられ

る^{3,4}。

調節可能な機械的負荷が軟骨細胞におよぼす影響は細胞培養系を用いて広く研究されてきた。すなわち、単層(二次元)もしくは三次元的軟骨培養細胞系を用いて特定の負荷を加え検討が行われてきた⁵⁻⁷。しかし、これらの実験系では軟骨細胞と細胞外マトリックス(ECM)の相互関係の喪失が問題点として指摘されてきた。関節軟骨片の組織培養を用いれば、この弱点を回避できるが⁸⁻¹⁰、関節軟骨のみを採取するため、半月板、滑膜、軟骨下骨、靭帯の相互関係を再現することができない^{3,4}。一方、生体モデルは細胞と細胞外マトリックスの相互関係、および、軟骨と他の関節構成組織との相互関係の保持が可能である。一般に、生体でのOAモデルでは犬¹¹や家兎¹²の膝関節に前十字靭帯切離および内側側副靭

帯切離,あるいは,半月板切除などの外科的侵襲を加えて関節を不安定化し,OAを発症させる方法が用いられてきた.外科的侵襲によるマウスOAモデルは飼育期間を変化させることにより様々な重症度のものを作製することが可能である¹³.しかし,麻酔下での手術侵襲は軟骨代謝に影響を及ぼす可能性があり,感染の危険もある.さらに,外科的侵襲による過剰な負荷は安定的ではなく,調節性もない.最近,Pouletらは膝関節に加える負荷と時間を各々調節できる装置を用いて新しいマウスOAモデルを開発した¹⁴.これは特定の負荷に対する膝関節の反応を検討するには有用なモデルである.しかし,特殊な装置(加圧カップを有する自動制御小型試験装置)が必要であり,加圧時には麻酔が必要である.さらに,このモデルは膝関節と踵にカップを当て,膝関節に対して垂直方向に負荷を加えるものであり,膝関節に対する機械的負荷は生理的とは言えない.

我々はトレッドミルを用いた強制走行負荷による新しい非侵襲性のマウスOAモデルの作成を試みた.トレッドミルは安価で走行負荷量の調節は容易である.このモデルは極めて単純で,膝関節に対し生理的な負荷を加えることができる.本研究の目的は,強制走行負荷により,非侵襲的で再現性に優れたマウスOAモデルを作製し,X線学的,および,組織学的検討によりその特性を明らかにすることである.

方法

1. 実験動物と強制走行負荷

実験動物として9週令の雄のC57BL6/Jclマウス(日本クレア社,東京)を用いた.全ての実験は近畿大学医学部実験動物取扱規約を遵守して行なわれた.強制走行負荷にはマウス用トレッドミル(メルクレスト社,富山)を傾斜なしで用いた.トレッドミルの走行レーンの末端には電気ショックをマウスの尻尾に与えることができる金属棒が設置されており,強制走行負荷を確実に行うことができるよう工夫されている(図1A).この研究はマウスを2群に分けて行った.

経時的変化観察群:コントロール群は強制走行させずに0,2,4,6,8週間後に屠殺し,(各n=4),経時的変化観察群は2週間で1km,4週間で2km,6週間で3km,8週間で4km走行負荷をかけた後に屠殺した(各n=4).マウスはトレッドミル上を1回15分,11m/分の速度で1週間に3回強制走行させた.

走行時間変化群:短時間走行群は1回7.5分,11m/

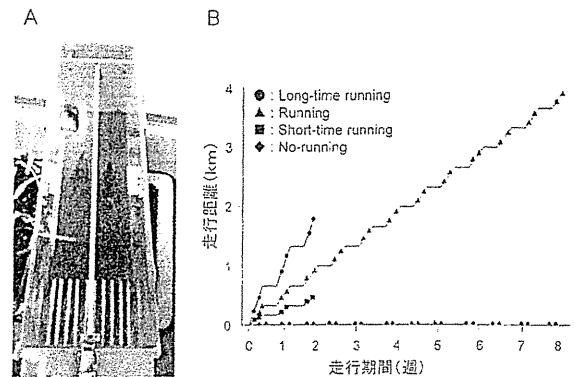


図1 強制走行負荷に用いたマウス用トレッドミル(A)とマウス強制走行負荷図(B).経時的変化観察群として2群作成した.走行負荷をかけたなかった群(n=4)と強制走行負荷をかけた群(n=4).マウスにトレッドミル上を1回15分(11m/分)強制走行させた.週3回(1週間に2km).走行時間変化群として2群用意した.短時間走行群(n=4,1回7.5分,11m/分,週3回)と長時間走行群(n=4,1回30分,11m/分,週3回).走行時間変化群はともに2週間観察した.※:トレッドミル※※:電気ショックをマウス尻尾に与える金属棒

分の速度にて1週間に3回(総距離0.5km/2週間,各n=4)強制走行させた後,中時間走行群(経時的変化観察群)は1回15分,11m/分の速度にて1週間に3回(総距離1km/2週間,各n=4)強制走行させた後,長時間走行群は1回30分,11m/分の速度にて1週間に3回(総距離2km/2週間,各n=4)強制走行させた後それぞれ屠殺した.(図1B).

屠殺する直前に各々のマウスの体重を測定した.コントロール群の平均体重(±標準偏差)は0週,2週,4週,6週,8週においてそれぞれ21.9±0.7,24.0±0.5,26.0±0.2,28.0±1.0,30.1±1.0g(各n=4)であった.経時的変化観察群の平均体重は0週,2週,4週,6週,8週においてそれぞれ21.1±1.0,23.2±1.0,25.0±1.3,26.9±0.7,28.3±1.8g(各n=4)であった.経時的変化観察群においてコントロール群と比較して体重の有意な変化はなかった.

2. X線学的検討

骨棘形成および半月板骨化を評価するため,膝関節正面X線撮影を行った.頸椎脱臼法によるマウスの屠殺後,経時的変化観察群では0,2,4,6,8各週で,走行時間変化群では2週における膝関節正面像を拡大X線にて撮影した.両下肢を膝上で切断し,イメージプレート上に独自に作成した下肢固定フレーム(京都化学,京都)を設置し,膝正面像が撮影できるよう切断肢を固定した.X線撮影は40Kv,100mA,5秒間照射,拡大率10倍の撮影条件で

行なった (μFX-1000, 富士フィルム, 東京). 撮影したフィルムはスキャナー (BAS-2000 IP リーダー, 富士フィルム) にて読み取った.

3. 組織学的検討

X線撮影の後, 両側膝関節は4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を用いて固定された (4°C, 24時間). 組織標本は10%EDTA (pH7.4) にて脱灰した (4°C, 2週間). 脱灰後, 高濃度エタノールにて脱水した. パラフィンブロックとした標本をパラフィン用滑走式ミクロトームにて約4 μmの連続切片として切り出した. 切片は脱パラフィン後, HE染色, サフラニンO染色およびトルイジンブルー染色を行い, 組織学的OA様変化および軟骨におけるプロテогリカン存在の有無を評価した. 軟骨変性の程度は国際関節症学会 (OARSI) の定めたマウス軟骨組織変性評価スコア¹⁵を用いて評価した. 本評価法は平均変性スコアと最大変性スコアからなる. 平均変性スコアとは関節面の最大変性部分のスコアと最小変性部分のスコアの平均値である. 最大変性スコアとは関節面の最大変性部分のスコアを指す.

スコアは以下の如くである.

0 = 正常,

0.5 = 構造上の破壊なくサフラニンO染色の染色性低下のみ,

1 = 軟骨欠損なく, 微細な線維化のみ,

2 = 垂直方向の浅層下への亀裂とわずかな表層の欠損,

3 = 石灰化軟骨層への表層から25%未満内の垂直方向への亀裂もしくはびらん,

4 = 石灰化軟骨層への表層から25%以上50%未満内の垂直方向への亀裂もしくはびらん,

5 = 石灰化軟骨層への表層から50%以上75%未満内の垂直方向への亀裂もしくはびらん,

6 = 石灰化軟骨層への表層から75%以上の垂直方向への亀裂もしくはびらん.

切片観察は撮影機能付き光学顕微鏡 (BIOREVO BZ-9000, キーエンス, 大阪) を用いて行った.

4. II型コラーゲンおよびX型コラーゲンの免疫組織学的検討

脱パラフィン後の切片を用いてII型コラーゲンおよびX型コラーゲンの免疫染色を行った. 0.3%過酸化水素による前処理 (室温, 30分) の後, 1%ウシ血清アルブミン (シグマ, セントルイス, ミズーリ, アメリカ) を用いてブロッキングを行った (室温, 1時間). PBSで洗浄後, 一次抗体を反応させた (4°C, 24時間). 一次抗体には抗II型コラーゲン・ラビットIgGポリクローナル抗体 (LB1297, LSL東京, 濃度1:100, 1%BSA含有PBSに溶解), およ

び, 抗X型コラーゲン・ラビットIgGポリクローナル抗体 (LB0092, LSL東京, 濃度1:100, 1%BSA含有PBSに溶解) を用いた. ネガティブコントロールの一次抗体としては, 非特異的ラビットIgG抗体を用いた. PBSで洗浄後, 二次抗体を用いて, 反応させた (室温, 30分). 二次抗体としてII型コラーゲン免疫染色には, ドンキー抗ラビットIgG抗体 (SC2313, サンタクルズバイオテクノロジー, カリフォルニア, 濃度1:1000) を, X型コラーゲン免疫染色にはフルオレセインイソチオシアン酸含有チキン抗ラビットIgG抗体を用いた (SC2990, サンタクルズバイオテクノロジー, カリフォルニア, 濃度1:1000). PBSで洗浄後, II型コラーゲンの免疫染色に対しては, DAB (K4007, ダコ, グロストラップ, デンマーク) にて発色を行った. DAB染色の方法としてまずストレプトアビジン-HRP原液 (K1016, ダコ, グロストラップ, デンマーク) を反応させた (室温, 30分). PBSで洗浄後, DAB色素体液 (K3468, ダコ, グロストラップ, デンマーク, 濃度1:100, DAB基質緩衝液1mに溶解) を反応させた (室温, 10分). 最後にヘマトキシリン液 (和光純薬工業, 大阪) を用いて核染色を行い, PBSで洗浄, 透徹, 封入後観察を行った. X型コラーゲンの免疫染色は蛍光染色により行った. 2次抗体反応後, PBSで洗浄, 封入し, 蛍光顕微鏡 (BIOREVO, BZ-9000, キーエンス, 大阪) にて観察を行った. X型コラーゲン以外の全ての組織切片の観察は蛍光顕微鏡 (BIOREVO, BZ-9000, キーエンス, 大阪) の光学顕微鏡機能を用いて行った.

5. 統計解析

結果は平均 (95%信頼区間) ±標準偏差 (SD) (標本数) にて表記した. 統計的な解析はANOVA検定, Scheffe's test, unpaired Student's t-testを用いて行なった. p値については, 0.0001未満はp < 0.0001, それ以上は小数点3桁の数値で示した.

結 果

各群におけるX線学的検討

膝関節正面の拡大X線写真撮影を行った.

経時的变化観察群: 強制走行負荷後4週間以降外側半月板部分のX線透過性の低下が認められた. 6週間で内側半月板X線透過性の低下が認められた. 顆間部は骨棘形成による経時的な狭小化の増強が認められた. しかし, ほかの部位での骨棘は認められなかった. コントロール群では特に変化は認められなかった (図2A).

走行時間変化群: 短時間走行群においては半月板部分のX線透過性変化および骨棘形成は認められな

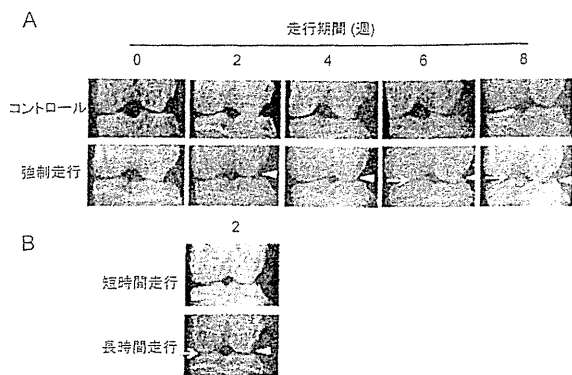


図2 拡大X線撮影による半月板の変性。経時的変化観察群(A)、走行時間変化群(B)、拡大X線撮影を各観察週において行った。(A)外側半月板の骨化が2週間目以降で観察された。内側半月板の骨化は6週間目以降にて観察された。(B)長時間走行群では2週間で外側半月板の骨化が認められたが、短時間走行群において2週間で特徴的な変化は認められなかった。矢印=内側半月板の骨化、矢頭=外側半月板の骨化を示す。各群4羽とも同様の変化が認められ、図には代表的画像を使用した。

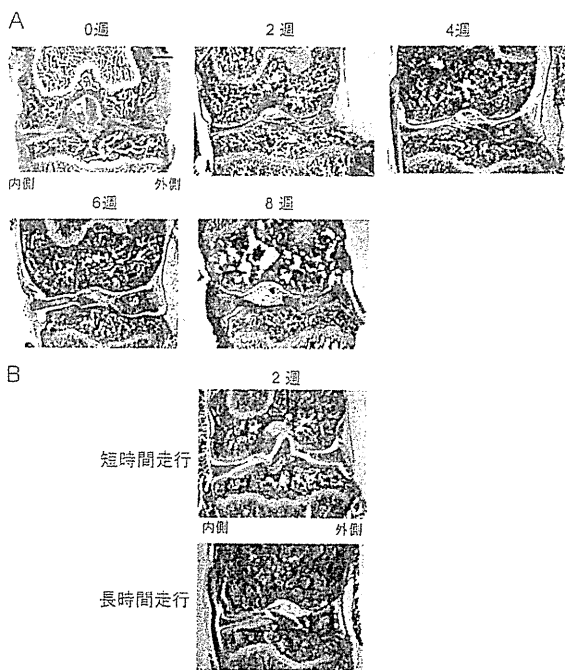


図3 H-E染色による組織学的変化。経時的変化観察群(A)、走行時間変化群(B)。(A)2週間の骨棘形成、外側半月板の肥大化、十字靭帯の変性そして顆間部の狭小化。4週間で変化は進行し、外側半月板は骨化がみられた。6週間で内側半月板の内軟骨性骨化がみられた。(B)短時間走行群では2週間で軽度の外側半月板肥大化がみられた。対照的に長時間走行負荷群では外側半月板骨化、内側半月板の内軟骨性骨化、十字靭帯の変性、顆間部の狭小化がみられた。各群4羽とも同様の変化が認められ、図には代表的画像を使用した。スケールバー=300 μ m。

った。一方、長時間走行群においては外側および内側半月板部分のX線透過性の低下が認められた(図2B)。

各群の組織学的検討

HE染色およびトルイジンブルー染色を各実験群の組織標本に対してほどこした。組織学的に主に評価した部分は大腿骨および脛骨の関節部、半月板、十字靭帯および顆間部である。

経時的変化観察群および2週間の強制走行負荷において外側半月板の肥厚および内軟骨性骨化、十字靭帯の変性および断裂、脛骨外側部での骨棘形成が認められた(図3)。骨棘は内軟骨性骨化様変化を示し、トルイジンブルーにて強染される細胞外マトリックスおよび軟骨細胞集塊として認められた(図4)。4週後、この変化はさらに進行し、外側半月板には明らかな骨化が認められた(図3)。6週後には内側半月板の肥厚および内軟骨性骨化が認められた(図3A)。これらの変化はコントロール群には認められなかった。特異的な組織学的変化の発現頻度の経時的変化を表1に示す。内側コンパートメントと比較し、外側コンパートメントで変化の発現頻度が早期から高くなり、十字靭帯変性の発現頻度は顆間部における骨棘形成と平行して高くなっていった。

走行時間変化群では短時間走行群では外側半月板の軽度肥厚と十字靭帯の軽度変性が認められたが、経時的変化観察群の2週間走行負荷マウスと比較し

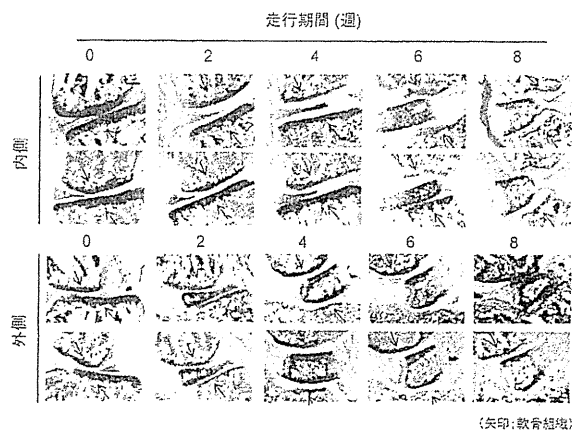


図4 サフラニンO染色およびトルイジンブルー染色における半月板と関節軟骨の変化。膝関節内側コンパートメント(上図)と外側コンパートメント(下図)を示す。サフラニンO染色とトルイジンブルー染色は走行週数の増加に伴い染色性が低下した。染色性の低下は内側コンパートメントより外側コンパートメントでより観察された。半月板の染色性は走行週数の増加と共に増加し、肥大化および血管侵入がみられた。各群4羽とも同様の変化が認められ、図には代表的画像を使用した。矢印=軟骨組織。

てOA変化は軽度であった。長時間走行群では外側半月板の肥厚および内軟骨性骨化、内側半月板の肥厚、十字靭帯の変性および断裂、顆間部での骨棘形成、脛骨外側での骨棘形成、大腿骨遠位での骨棘形成などが認められた。これらのOA変化は経時的変化観察群の2週間走行負荷マウスと比較して重度であった(図3B)。すなわち、OA変化は一回当たり走行時間の増加に伴い重度となった。また、特異的な組織学的変化の発現頻度も一回当たり走行時間の増加とともに高くなった(表2)。

経時的変化観察群において各週の関節軟骨におけるサフラニンO染色およびトルイジンブルーによる染色性の低下は内側コンパートメントより外側コンパートメントに著明であった。また、内外側半月板においては肥厚および内軟骨性骨化、血管侵入の進行に伴い軟骨部分のトルイジンブルー染色性は増加した(図4)。

表1 各週数における特異的組織学的変化の出現頻度(特異的組織学的変化をきたした膝数/総膝数)

週数(週)	0	2	4	6	8
総走行距離(Km)	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0
骨棘形成					
外側脛骨	0/8	6/8	8/8	8/8	8/8
外側大腿骨	0/4	4/8	6/8	6/8	8/8
内側脛骨	0/8	0/8	2/8	4/8	4/8
内側大腿骨	0/8	0/8	2/8	2/8	6/8
顆間部	0/8	6/8	8/8	8/8	8/8
半月板肥大化および骨化					
外側	0/8	8/8	8/8	8/8	8/8
内側	0/8	2/8	4/8	6/8	6/8
十字靭帯の変性および断裂	0/8	6/8	8/8	8/8	8/8

表2 走行時間変化による特異的組織学的変化の出現頻度(特異的組織学的変化をきたした膝数/総膝数)

走行時間(分)	control (0.0)	short (7.5)	middle (15)	long (30)
総走行距離(Km)	0.0	0.5	1.0	2.0
骨棘				
外側脛骨	0/8	1/8	6/8	8/8
外側大腿骨	0/8	2/8	4/8	6/8
内側脛骨	0/8	0/8	0/8	1/8
内側大腿骨	0/8	0/8	0/8	2/8
顆間部	0/8	4/8	6/8	8/8
半月板肥大化および骨化				
外側	0/8	5/8	6/8	8/8
内側	0/8	0/8	2/8	4/8
十字靭帯の変性および断裂	0/8	4/8	6/8	8/8

OARSI 評価スコアによる関節軟骨変性評価

各群における内外側コンパートメントの軟骨変性の程度をOARSI評価法(平均および最大スコア)に従い点数化した。

経時的変化観察群：内外側コンパートメントの軟骨変性平均スコアおよび最大スコアはともに走行負荷の増加に伴い増加した。また、走行負荷を加えないコントロール群のスコアは常に0であった。また、2、4、6、8週の走行負荷において平均および最大スコアはともに内側コンパートメントより外側コンパートメントのほうが有意に高値であった(n=8, P<0.01, unpaired t-test, 図5A)。そして8週間の走行負荷後には、外側コンパートメントの平均スコアは3.9(3.6-4.2)±0.4(n=8)、最大スコアは5.0(5.0-5.0)±0.0(n=8)まで上昇したのに対し、内側コンパートメントの平均スコアは1.3(0.9-1.6)±0.5(n=8)、最大スコアは2.3(1.3-3.2)±1.2(n=8)にとどまった(図5A)。

走行時間変化群：いずれも走行負荷2週で評価した。外側コンパートメントでの平均スコアは、コントロール群で0.0(0.0-0.0)±0.0(n=8)、一回当たり7.5分の短時間走行群で0.9(0.5-1.3)±0.5(n=8)、一回当たり15分走行の経時的変化観察群の2週で1.5(1.3-0.7)±0.3(n=8)、一回当たり30分走行の長時間走行群で3.1(2.2-3.8)±0.9(n=8)であった。また、内側コンパートメントの平均スコアは同様に0.0(0.0-0.0)±0.0、0.2(0.0-0.4)±0.3(n=8)、0.6(0.4-0.7)±0.2(n=8)、1.1(0.3-1.9)±0.9(n=8)であった。平均スコアは各週において内側コンパートメントより外側コンパートメントで有意に高かった(n=8, P<0.01, unpaired t-test, 図

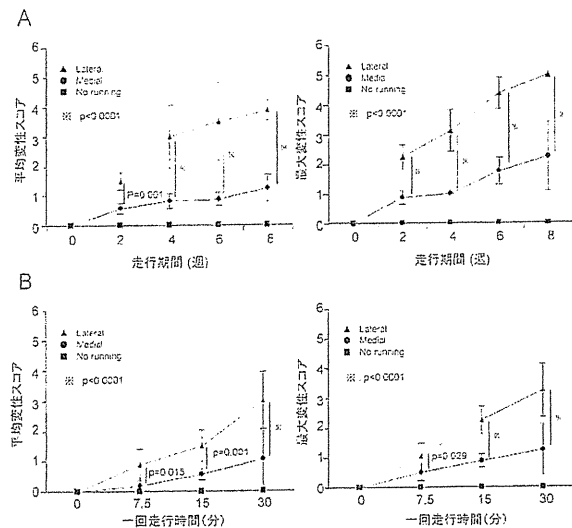


図5 OARSI 評価法による軟骨損傷の平均、最大スコア。経時的変化群(A)。走行時間変化群(B)。

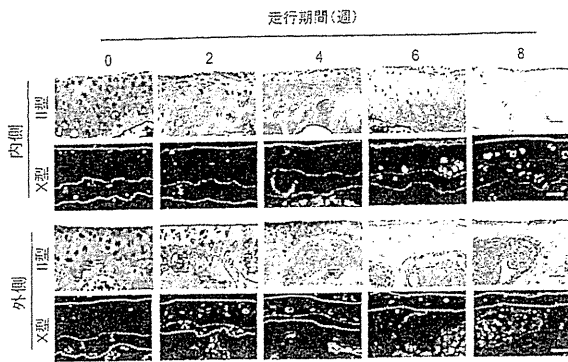


図6 内外側コンパートメントの脛骨関節軟骨でのタイプIIコラーゲン蛋白、タイプXコラーゲン蛋白の免疫染色。タイプIIコラーゲンの染色性は走行週数の増加に伴い低下した。対照的にタイプXコラーゲンの染色性は2週間で、タイドマーク以上の表層から中層（赤矢印先）にかけてみられた。6週間、8週間においてタイプXコラーゲンの外側軟骨の染色性は重度の変性とタイドマーク消失により低下していた。各群4羽とも同様の変化が認められ、図には代表的画像を使用した。スケールバー=20 μm 。

5 B)。同様に最大スコアも各週において内側コンパートメントより外側コンパートメントにて有意に高値であった($n=8$, $P<0.01$, unpaired t-test, 図5 B)。

II型コラーゲン蛋白およびX型コラーゲン蛋白の免疫染色

経時的変化観察群の軟骨変性部におけるII型、X型コラーゲンの発現変化を免疫染色により評価した。II型コラーゲンの発現は走行負荷週数の増加に伴い、内外側コンパートメントともに減少した。走行負荷前の0週においてX型コラーゲンはタイドマーク（図6、矢頭）より下層の石灰化軟骨層の軟骨細胞周囲にのみ染色性が認められた。しかし、2週間の走行負荷後には、外側コンパートメントの関節軟骨でタイドマークより表層の軟骨細胞周囲にも発現が認められた。しかし、6週間、8週間の走行負荷後においては軟骨の損傷が激しく、タイドマークの消失とともに、X型コラーゲンの染色は消失していた（図6）。内側コンパートメントでは、6週間、8週間の走行負荷後においても、X型コラーゲンの染色性は明らかであった。

考 察

本研究では、強制走行により膝関節への機械的負荷を増大させ、非侵襲的にマウス膝OAモデル作成が可能であることを示した。このマウスの強制走行による膝OAモデルにはいくつかの利点がある。すなわち、モデル作成法が単純で安全であること、動

物に対するストレスが低いこと、膝関節に加わる運動が生理的であること、負荷量が調節可能であることなどである。手術や麻酔、薬剤が不要で、トレッドミルのみを使用するため、運動負荷を加える方法としては極めて単純である。実験中、マウスに脱毛や体重減少が生じたり、死亡したりすることはなく、この走行負荷量はマウスにとってストレスは少ないと考えられる。走行はマウスの日常的かつ生理的活動であり、当然、膝関節に加わる運動は生理的である。さらに、今回の実験結果はこのマウスOAモデルを作成するに当たり再現性が極めて高いことを示している。つまり、マウスOAモデルは機械的負荷とOA関連遺伝子の相互関係を検討することができる。すなわち、過剰な機械的負荷の下で特定の遺伝子が軟骨やその他の関節組織の変化にどのような影響を及ぼしているのかを検討することが可能である。また、今回調節性の有無を確認するため、2週間まで走行時間を変化させて組織学的変化の割合の増減を調べた。これは、経時的変化観察群において2週間で早期OA様変化がほとんど全てのマウスに生じており、走行時間を変化させて結果を観察するのに適切であると考えたためである。

経時的変化観察群では外側コンパートメントにおけるOA変化は内側コンパートメントにおける変化より早期に出現した。この結果は、マウスにおいては膝関節への機械的負荷は主に外側コンパートメントに加わることを示していると考えられる。ラットでの膝関節OAモデルにおいても外側コンパートメントが主に変性を起こしていること¹⁶が報告されているが、げっ歯類では外側コンパートメントが荷重に対する主コンパートメントとして生理的な役割を果たしている可能性が高い。これは膝内側コンパートメントが主な荷重関節として機能するヒト¹⁷とは対照的である。特殊な装置（加圧カップを有する自動制御小材料試験装置）を用いて作成されたOAモデルもこの考察を支持する¹⁴。

経時的変化観察群において2週間の走行負荷後に、顆間窩での骨棘形成、脛骨関節面外側縁での骨棘形成を認めた。これらのOA変化はコラゲナーゼを注入¹⁸および関節負荷装置によるマウス膝関節OAモデル¹⁴の変化と類似していた。経時的変化観察群において6、8週走行後には大腿骨と脛骨関節面の辺縁部で骨棘形成を認めた。いくつかの研究で骨棘の形成部位が検討されているが、骨棘形成は動物モデルに依存することが知られている¹⁸。Pouletらによるマウス膝関節OAモデルの研究では、骨棘形成は顆間窩の内側面に局在していた¹⁴。骨棘形成部位はPouletらの報告とは完全には一致しなかつ

た。これは運動負荷の加わり方が異なるためであると考えられる。今後も骨棘を形成する生体力学および分子生物学的メカニズムを解明すべく研究の継続が必要である。

十字靭帯切離による膝関節不安定化は多くの動物で膝関節 OA を引き起こす。一方、我々のモデルでは 2 週間の強制走行負荷後には、顆間窩の骨棘形成とともに十字靭帯変性および断裂という著しい変化を生じた。これらは強い機械的負荷が一つの発症要因であるヒト OA 膝における変化によく似ている^{19,20}。顆間窩の骨棘形成と十字靭帯の変性および断裂は相互に影響を及ぼす可能性がある^{21,22}。我々のモデルでは、これらの変化の相互作用をより詳細に観察することが可能である。

半月板の骨化はげっ歯類^{14,23}、犬²⁴、ギニアピッグ²⁵、そしてヒト^{26,27}でも報告されており、加齢と変性変化に関連していると考えられている。ヒトにおける半月板骨化の報告は稀であるが、半月板への過剰な負荷、微細な外傷、変性、断裂が関与しているとされている^{26,27}。半月板骨化は内軟骨性骨化と考えられ^{28,29}、ヒトにおける骨棘形成も同様に内軟骨性骨化と考えられている¹。我々のモデルでも同様に、2 週後には外側半月板の軟骨化生を伴う肥厚、および血管侵入がみられた。4 週後の骨化半月板周囲には軟骨組織が認められ、内軟骨性骨化による骨棘形成と同様の形態を示した。内軟骨性骨化による骨棘形成と関節軟骨変性とともに、走行負荷による半月板骨化は我々の OA モデルを特徴づけている。さらに、これらの OA 変化が負荷開始後早期から出現することは過剰な機械的負荷が OA 発症に極めて重要な役割を果たしていることを示している。そして、半月板の骨化および顆間窩の骨棘形成の OA 様変化が X 線写真で観察できるということは OA モデルとして有利な点であるといえる。

この OA モデルの有用性は関節軟骨における II 型コラーゲン発現の減少および X 型コラーゲンの発現の亢進でも示された。これらの結果はこのモデルがヒト OA における軟骨変性に極めて類似していることを示している³⁰。II 型コラーゲンは正常関節軟骨を構成する主なコラーゲンで軟骨変性の進行に伴い減少し、X 型コラーゲンは変性関節軟骨における肥大軟骨細胞周囲に発現する軟骨変性のマーカーである³⁰。X 型コラーゲンの発現は走行負荷前の 0 週ではタイドマークより深層の石灰化軟骨層の軟骨細胞にのみ発現を認めたが、走行負荷を加えるとタイドマークより表層の軟骨細胞に発現を認めた。これは、OA 軟骨に特徴的な所見であり、軟骨組織が軟骨細胞の肥大化を伴って軟骨変性を生じるという考

え方の根拠となりうる所見である。また、十字靭帯切離マウス OA モデルでも同様に関節軟骨における II 型コラーゲン発現の減少および X 型コラーゲンの発現の増加が報告されている¹³。

このマウス OA モデルにはいくつかの問題点があり、本研究結果の解釈には注意が必要である。すなわち、すべての動物モデルに共通する弱点として、身長、体重、解剖、そして膝関節の生体力学的环境がマウスとヒトとは大きく異なる点が挙げられる。当然のことながら、遺伝的背景もヒトとマウスでは異なる。さらに OA 発症の感受性はマウス系統間で異なり³、どの系統のマウスを用いるかで実験結果が大きく変化する可能性がある。STR/OR1 マウスは 12 週令の早期において膝 OA を自然発症し、CBA マウスは 24 週令において膝 OA を発症すること³¹、膝関節 OA は週令とともに進行することが知られている。我々は今後の研究の発展性を考慮し、遺伝子操作に頻用される C57BL6/Jcl マウスを用いたが、通常の飼育環境では 24 週令までは OA を発症していないことを確認している。

結 語

強制走行負荷によるマウス膝 OA モデルを開発した。このモデルの利点として生理的な運動負荷であること、作成方法の単純さと非侵襲性、そして何よりも変形性膝関節症の高い再現性と調節性が挙げられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を頂いた浜西千秋教授に深く謝意を表します。また、本研究にあたり終始御助言を頂いた国立循環器病センター研究所脈管生理部の中野厚史先生、高度先端総合医療センター再生部門の寺村岳士先生、小野寺勇太先生、並びにご協力頂いた教室員の皆様、実験助手の皆様に心から感謝申し上げます。

文 献

1. Hough AJ Jr (2007) Pathology of osteoarthritis. In: Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. Forth edition. Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM (eds): Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp51-72
2. Poole AR, Guilak F, Abramson SB (2007) Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. Forth edition. Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM (eds): Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp27-49
3. Smith MM, Little CB (2007) Experimental models of osteoarthritis. In: Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. Forth edition. Moskowitz

- RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM (eds): Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp107-125
4. Brandt KD (2007) Animal models of osteoarthritis. *Biorheology* 39: 221-235
 5. Chowdhury TT, Arghandawi S, Brand J, Akanji OO, Bader DL, Salter DM, Lee DA (2008) Dynamic compression counteracts IL-1 β induced inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 expression in chondrocyte/agarose constructs. *Arthritis Res Ther* 10: R35.
 6. Chano T, Tanaka M, Hukuda S, Saeki Y (2000) Mechanical stress induces the expression of high molecular mass heat shock protein in human chondrocytic cell line CS-OKB. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 115-119
 7. Akagi M, Nishimura S, Yoshida K, Kakinuma T, Sawamura T, Munakata H, Hamanishi C (2006) Cyclic tensile stretch load and oxidized low density lipoprotein synergistically induce lectin-like oxidized ldl receptor-1 in cultured bovine chondrocytes, resulting in decreased cell viability and proteoglycan synthesis. *J Orthop Res* 24: 1782-1790
 8. Frank EH, Jin M, Loening AM, Levenston ME, Grodzinsky AJ (2000) A versatile shear and compression apparatus for mechanical stimulation of tissue culture explants. *J Biomech* 33: 1523-1527
 9. Thibault M, Poole AR, Buschmann MD (2002) Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. *J Orthop Res* 20: 1265-1273
 10. Jeffrey JE, Aspden RM (2007) Cyclooxygenase inhibition lowers prostaglandin E2 release from articular cartilage and reduces apoptosis but not proteoglycan degradation following an impact load in vitro. *Arthritis Res Ther* 9: R129
 11. Pond MJ, Nuki G (1973) Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. *Ann Rheum Dis* 32: 387-388
 12. Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, Burstein AH, Frankel VH (1973) Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum* 16: 397-405
 13. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H (2005) Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 632-641
 14. Poulet B, Hamilton RW, Shefelbine S, Pitsillides AA (2011) Characterizing a novel and adjustable noninvasive murine joint loading model. *Arthritis Rheum* 63: 137-147
 15. Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB (2010) The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 3: S17-23
 16. Tang T, Muneta T, Ju YJ, Nimura A, Miyazaki K, Masuda H, Mochizuki T, Sekiya I (2008) Serum keratan sulfate transiently increases in the early stage of osteoarthritis during strenuous running of rats; protective effect of intraarticular hyaluronan injection. *Arthritis Res Ther* 10: R13
 17. Hsu RW, Himeno S, Coventry MB, Chao EY (1990) Normal axial alignment of the lower extremity and load-bearing distribution at the knee. *Clin Orthop Relat Res* 215-227
 18. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Loo FA, van den Berg WB, van der Kraan PM (2007) Resemblance of osteophytes in experimental osteoarthritis to transforming growth factor β -induced osteophytes: limited role of bone morphogenetic protein in early osteoarthritic osteophyte formation. *Arthritis Rheum* 56: 4065-4073
 19. Hill CL, Seo GS, Gale D, Totterman S, Gale ME, Felson DT (2005) Cruciate ligament integrity in osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 52: 794-799
 20. Benjamin M, McGonagle D (2007) Histopathologic changes at "synovio-entheseal complexes" suggesting a novel mechanism for synovitis in osteoarthritis and spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 56: 3601-3609
 21. Stein V, Li L, Guermazi A, Zhang Y, Kent Kwok C, Eaton CB, Hunter DJ; OAI Investigators (2010) The relation of femoral notch stenosis to ACL tears in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 192-199
 22. Quasnicka HL, Anderson-MacKenzie JM, Tarlton JF, Sims TJ, Billingham ME, Bailey AJ (2005) Cruciate ligament laxity and femoral intercondylar notch narrowing in early-stage knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52: 3100-3109
 23. Pearson K (1921) On the sesamoids of the knee joint. *Biometrika* 13: 133-175
 24. Weber NA (1998) Apparent primary ossification of the menisci in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 212: 1892-1894
 25. Kapadia RD, Badger AM, Levin JM, Swift B, Bhattacharyya A, Dodds RA, Coatney RW, Lark MW (2000) Meniscal ossification in spontaneous osteoarthritis in the guinea-pig. *Osteoarthritis Cartilage* 8: 374-377
 26. Liu SH, Osti L, Raskin A, Merlo F, Bocchi L (1994) Meniscal ossicles: two case reports and a review of the literature. *Arthroscopy* 10: 296-298. Review
 27. Mine T, Taguchi T, Ihara K, Tanaka H, Moriwaki T, Kawai S (2003) Meniscal ossification. *Arthroscopy* 19: E11
 28. Kugler JH, Tomlinson A, Wagstaff A, Ward SM (1979) The role of cartilage canals in the formation of secondary centres of ossification. *J Anat* 129: 493-506
 29. Rivas R, Shapiro F (2002) Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study

- in the New Zealand white rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 84-A : 85-100
30. Sandel LJ, Heinegard D, Hering TM (2007) Cell Biology, Biochemistry, and Molecular Biology of Articular Cartilage in Osteoarthritis. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management*, Forth Edition, Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM (eds) : Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 73-106
31. Sarukawa J, Takahashi M, Doi M, Suzuki D, Nagano A (2010) A longitudinal analysis of urinary biochemical markers and bone mineral density in STR/Ort mice as a model of spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 62 : 463-471

レニン・アンジオテンシン系コンポーネントの軟骨組織 における発現：軟骨細胞の増殖と分化への関与

井上 紳 司 墳 本 一 郎 赤 木 将 男

近畿大学医学部整形外科教室

抄 録

目的 レニン・アンジオテンシン系 (RAS) は生体の脈圧・電解質調節機構として重要であるが、近年局所性 RAS がさまざまな組織で同定されている。RAS の存在は、筋骨格系である骨や滑膜組織に示され、骨代謝や炎症に関与することが報告された。軟骨組織は骨に隣接し、成長軟骨板で軟骨から骨へ置換されること、滑膜組織の一部から分化することが認められているため、本研究は軟骨組織における RAS の存在を検討し、その役割を考察した。

方法 8週齢のマウス脛骨近位部、鼻中隔、気管、椎骨、胎生期四肢原基、脛骨骨折仮骨にてアンジオテンシン変換酵素 (ACE)、アンジオテンシノーゲン (Ang)、アンジオテンシン II 1型 (AT1R)・2型受容体 (AT2R) を免疫組織法により評価した。またウシ培養軟骨細胞を用いて real-time PCR、蛍光免疫染色、western blot で RAS コンポーネントの発現を観察し、炎症性サイトカインによる影響を評価した。

結果 長管骨および椎骨成長軟骨板における増殖層から肥大層軟骨細胞、また、骨折仮骨の肥大軟骨細胞は、これら RAS コンポーネントの染色を認めた。ウシ培養軟骨細胞で AT1R、AT2R の発現が確認され、IL-1 β および TNF- α の添加でそれらの発現は亢進した。

考察と結語 RAS は、成長や骨化に関わる軟骨や、変性に向かう軟骨における生理的・病的機能に関与することが示唆され、長管骨や脊椎の成長制御や変形性関節症の病態解明・治療に新たな展開をもたらす可能性を示すものであった。

Key words : 局所性 RAS, 軟骨組織, 成長軟骨帯, 軟骨細胞, 増殖, 分化

緒 言

従来、レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system ; RAS) は血圧や体液電解質の調節にかかわる循環内分泌系として見いだされた¹。この系の最終活性ペプチドはアンジオテンシン II (Ang II) であり、Ang II はアンジオテンシン変換酵素 (angiotensin-converting enzyme ; ACE) によって、アンジオテンシン I (Ang I) から形成される。従って、ACE はこの系での鍵となるコンポーネントである。この前駆体 Ang I は、腎の傍糸球体装置によって産生され循環血液中に入るレニンによって肝臓で産生されるアンジオテンシノーゲンから切り出される。活性体リガンドである Ang II の生物学的作用は細胞表面のアンジオテンシン II 1型受容体 (Angiotensin II type 1 receptor ; AT1R)、お

よび2型受容体 (type 2 receptor ; AT2R) に結合することにより発揮される²。近年この全身性 RAS とは別に、局所性組織特異的 RAS が様々な臓器、すなわち、心臓、腎臓、骨髄、血管、そして脂肪織などで同定されており、その生理的機能や様々な病態への関与について検討されている¹。現在では、様々な組織において局所性 RAS により、細胞増殖、炎症、血管新生、そしてアポトーシスによる細胞死を生じることが明らかになっている³。

近年、骨代謝における局所性 RAS の役割が注目を集めている^{4,5}。すなわち、いくつかの RAS コンポーネントが骨芽細胞や破骨細胞において発現し機能していることが報告されている⁶⁻⁸。Hatton⁶らは骨芽細胞と破骨細胞との共培養系において、Ang I 及び Ang II の刺激は骨吸収を促進すること、その作用は ACE 阻害剤によって減弱することを示した。す

なわち、骨芽細胞または破骨細胞が局所性に発現する ACE により Ang II は Ang I から変換されて生成することを示している。これらの結果は、局所性 RAS が骨組織に存在し骨代謝の制御に関与することを示唆する。最近の研究では、RAS コンポーネントが vivo でも発現していることが示されており⁸、骨代謝における RAS の役割が注目を浴びている。

関節組織では、Price⁹ らが、急性および慢性ラット滑膜炎モデルを用いて、炎症を生じた滑膜組織に AT1R および Ang I/II の発現が亢進していることを報告した。彼らは、AT1R の阻害剤であるアンジオテンシン II 受容体ブロッカー (ARB) が用量依存的に関節炎を抑制し、炎症滑膜での TNF- α 産生を抑制する作用も示した。滑膜組織には間葉系細胞が存在することが示されており、滑膜間葉系細胞は軟骨へ分化することが知られている^{10,11}。従って、滑膜細胞は軟骨細胞に比較的近い細胞種であると考えられている。

以上より、我々は軟骨細胞において局所性 RAS が発現している可能性を考えた。生体には様々な軟骨組織が存在する。また、軟骨組織には成熟後の正常関節軟骨や気管軟骨のようにほとんど静止状態にある組織から、成長軟骨帯や骨折仮骨に見られる軟骨組織のごとく軟骨細胞が生理的あるいは機能的に分裂・増殖して骨化方向へと分化するもの、また、変形性関節症軟骨のごとく軟骨細胞が病的に分裂し、分化を生じてアポトーシスに陥る病的組織まで様々な状態がある。本研究の目的は軟骨組織における局所性 RAS コンポーネントの発現状況を検討し、さらに、ウシ培養軟骨細胞における発現と誘導を検討することで、局所性 RAS の機能的な意義を考察することである。

材料と方法

1. 使用動物

組織学的検索のための動物としては、8週齢の雄の C57BL6/Jcl マウス (日本クレア社、東京) を用いた。また、胎児の四肢原基を得るため同系の 14.5 日妊娠雌マウスを同社より購入した。全ての実験は近畿大学医学部実験動物取扱規約を遵守して行なわれた。また、軟骨細胞の分離・培養のための軟骨組織には、生後 10ヶ月のウシ前足部 MP 関節軟骨を用いた (阪南畜産株式会社 (大阪) のご好意により提供)。

2. 骨折モデルマウスの作成方法

8週齢のマウス 4 個体にペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、共立製薬株式会社 東京) 40 mg/kg を腹腔内投与し、全身麻酔下にマウス膝関節 5 mm 遠位で 10 mm の皮膚切開を行い、皮下を

剥離し脛骨を露出した。脛骨中央部内側骨皮質のみを外科剪刃にて切断後、手動的に不全骨折させた。脛骨外側と腓骨で下腿の連続性が保たれていることを確認し、ステイプラーにて閉創した。ゲージ内で 9 日間経過観察し、麻酔覚醒後も自立歩行が保たれていることを確認した。術後 9 日目に頸椎脱臼法にて屠殺し、膝関節から下腿の組織を採取した。

3. 組織学的検討

頸椎脱臼法によるマウス 4 個体の屠殺後、膝関節、鼻中隔、気管軟骨、椎骨を採取した。また、4 個体の脛骨骨折モデルマウスの膝から下腿を採取した。さらに、妊娠雌マウスより胎生 15 日の胎児を摘出、顕微鏡下に四肢原基を採取した。10%ホルマリン (マイルドホルム 10N, 和光純薬工業、大阪) にて固定した (4°C, 24時間)。骨を含む組織は Morse 溶液 (10% (w/v) クエン酸ナトリウム + 22.5% (v/v) ギ酸) を使用して脱灰した (4°C, 24時間)。高濃度エタノールによる脱水後、パラフィンブロックとした標本をパラフィン用滑走式マイクロームにて約 4 μ m の切片として切り出した。切片はアルコールとキシレンにて脱パラフィン後、HE (hematoxylin-eosin) および、アルシアン青/アリザリン赤 S による重複染色を行なった。組織学的にアルシアン青で染色される部位をプロテオグリカンの存在部位と考え、軟骨組織とした。

1) HE 染色

ヘマトキシリンで 4 分間染色後、水洗を 10 分間施行し、エオジンで 4 分間染色した。数秒水洗し、アルコールとキシレンで脱水、封入した。

2) アルシアン青染色とアリザリン赤 S による重複染色

軟骨に存在するプロテオグリカン (コンドロイチン硫酸) の酸性ムコ多糖物質検出のため、アルシアン青で染色を行った。3%酢酸水で 5 分間固定し、アルシアン青で 30 分間染色した。3%酢酸水で十分に洗浄し、蒸留水で水洗した。続いて、組織内に沈着した Ca を検出するため、アリザリン赤 S で 5 分間染色し、蒸留水で十分に水洗した。その後、アルコールとキシレンで脱水、封入した。

4. 免疫組織化学的検討

骨折モデルマウスの下腿、8週齢マウスの膝関節、鼻中隔、気管軟骨、椎骨、および、胎生 15 日のマウス四肢を採取し、上記と同様に固定、脱灰後、パラフィン切片を作成した。アルコールとキシレンで脱パラフィンを施行し、RAS コンポーネントである ACE, Ang, AT1R, および AT2R の免疫染色を行った。

10% TTBS (Tween Tris-HCl Buffer Solution

(TBS, pH7.6), MB-013, Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA) にて20分間マイクロウェーブ加熱(100度)し, 抗原を賦活化した. 内因性ペルオキシダーゼのプロッキングのため80%メタノールと30%過酸化水素を9:1で混合した溶液にて室温で10分間した後に1時間のプロッキングを施行した. プロッキング溶液には10% Block Aceを加えた50 mM TBS (雪印乳業, 札幌)を使用した. 次に一次抗体(プロッキング溶液にて溶解, 濃度1:100)を散布し, 4°C over nightしたのちPBSで3回洗浄した. ネガティブコントロールの一次抗体としては, 非特異的ラビットIgG抗体を用いた. その後, 2次抗体(プロッキング溶液にて溶解, 濃度1:1000)を散布し, 2時間室温で留置したのちPBSで3回洗浄した. DAB色素液(K3468, DAKO, グロストラップ, デンマーク, DAB基質緩衝液1mに溶解, 濃度1:100)で着色し, ヘマトキシリン(和光純薬)を用いて核染色を行い, アルコールとキシレンで脱水, 封入した.

ACEの免疫染色一次抗体には, ヤギ抗ACEポリクローナルIgG抗体(Angiotensin Converting Enzyme 1 Antibody, sc-12187, Santa Crus Biotechnology, CA, 濃度1:100)を使用した. Angの免疫染色一次抗体にはラビット抗IgGモノクローナル抗体(Anti-angiotensinogen Antibody, EPR2931, abcam, Cambridge, UK, 濃度1:100)を使用した. AT1Rの免疫染色一次抗体にはラビット抗AT1RポリクローナルIgG抗体(Anti-AT1 Receptor, AB15552 Millipore, MA, 濃度1:100)を使用した. AT2Rの免疫染色一次抗体にはラビット抗AT2R IgGポリクローナル抗体(Anti-AT2, sc9040, Santa Crus, 濃度1:100)を使用した. 二次抗体には, 抗マウスIgG horse radish peroxidase (HRP) 標識抗体(SC2313, Santa Cruz, 濃度1:1000)を使用した. 染色後 BIOREVO BZ-9000 (KEYENCE, 大阪)にて検鏡した.

5. ウシ軟骨細胞の分離と培養

分離, 培養の方法については, 岸本¹²らの報告を参照し, 同様の手法でおこなった.

6. Real-time polymerase chain reaction (real-

time PCR)によるACE, Ang, AT1RおよびAT2R遺伝子発現の解析

1) mRNAの抽出と逆転写反応

mRNAの抽出と逆転写反応は, 岸本ら³³の報告を参照にして, 同手法を用いた.

2) Real time PCR法による遺伝子発現の定量化

本研究では, real time PCR法を用いて培養ウシ軟骨細胞におけるACE, Ang, AT1RおよびAT2Rの培養軟骨細胞における発現と誘導に関する検討を行った. Real time PCRは, 上記にて作成したcDNAを鋳型とし, SYBR Greenを使用したインターカレーター法にて実施した. インターカレーター法は, 2本鎖DNAに結合する色素SYBR GreenをPCR反応液に混ぜ, ポリメラーゼによって合成された2本鎖DNAを検出する方法であり, 単位サイクル後の蛍光の強さからサンプル中のmRNA量を計算, 定量する方法である. 同法では, primer同士の結合によるprimer-dimer, ゲノムDNAの混入, 非特異反応によるDNAの増幅も蛍光の強さに反映しうるため, 予めforward primer, reverse primerをそれぞれ異なるexon上に設計し, さらにコントロールサンプルを用いた反応にて乖離曲線を計測し, 非特異反応が生じない事を確認した. 使用したprimerを表1に示す. SYBR Premix Ex Taq II(タカラバイオ, 滋賀, 大津) 10 µl, PCR Forward Primer 0.8 µl, PCR Reverse Primer 0.8 µl, 滅菌蒸留水 7.4 µl, 逆転写反応液 1 µlで計20 µlの混合液を作製し, Thermal Cycler Dice Real Time System II(タカラバイオ)にて反応および検出を行った. 初期変性は95°C20秒とし, その後PCR反応として95°C5秒, 60°C30秒を40サイクル行った. なお, 遺伝子発現の定量化は, β-アクチン遺伝子の発現を内在性コントロールとし, 未処理培養軟骨細胞をキャリアプレートサンプルとしたΔΔCt法にて行った.

7. ウシ培養軟骨細胞免疫染色

培養ウシ軟骨細胞におけるAT1RおよびAT2Rの発現と誘導に関して, 蛋白レベルでの定性的観察を行うため, 細胞免疫染色を行った.

培養液を24穴wellから吸引し, 室温で15分間10%

表1 本研究で用いたreal time PCR primer塩基配列

gene	Forward primer	Reverse primer
ACE	GACAGATACATCAACCTCAGG	ATCGGTAACATCAAGATTGG
Ang	TCAATGCCTACGTCCACTTC	TCCACCCAGAACTCCTTGAG
AT1R	TCTGAGACTGACTAACCCAAG	ATGTAATTGTGCCTTCCAGC
AT2R	ACTTCTCCCTTGCCACCATC	ATGCTTATCCGATGGCTTATG
Actin	AGGTCATCACCATCGGCAAT	GAATGCCGCAGGATTCCAT

ホルマリン固定した Well を PBS で 3 回洗浄した。10% Block Ace を各 well に 500 μ l 添加し、1 時間室温で静置した。上清を捨てて、PBS で well を 3 回洗浄した。各 well に各一次抗体 (組織免疫染色に用いたものと同じ抗体) を 200 倍希釈にて添加し 4 $^{\circ}$ C で over night 静置した。Well を PBS で 3 回洗浄し、各 well に二次抗体として FITC 標識抗 rabbit-IgG 抗体 (sc-2090, Santa Cruz) および FITC 標識抗ヤギ IgG 抗体 (sc-2348, Santa Cruz) を 1000 倍希釈にて添加し、1 時間遮光で室温静置した。PBS で well を 3 回洗浄した後、細胞核染色のため 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む PBS で洗浄、滅菌蒸留水で well を浸して BIOREVO BZ-9000 (KEYENCE, 大阪) にて検鏡した。

8. ウシ培養軟骨細胞における AT1R および AT2R の Western blot 解析

1) 細胞培養および細胞抽出液の調整

ウシ軟骨細胞を 35 mm ディッシュに 2×10^5 個播種した。コンフルエントに達した後、IL-1 β を 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, TNF- α を 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml の濃度で培地に添加した。コントロールには PBS を等量添加したものをを用いた。24 時間後、スクレイパーにて細胞および細胞外基質を剝離し、マイクロチューブに回収した。回収した細胞および細胞外基質を Sample Buffer Solution (和光純薬, 大阪) 100 μ l に融解し、96 $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸した。上清を細胞抽出液とし、うち 5 μ l を 1 アッセイごとに用いた。

2) 電気泳動および転写膜への転写

15% ポリアクリルアミドゲル (マリソル, 東京), 100 V で電気泳動を行った。マーカがゲルの下端 2 cm に達するまで泳動し、PVDF メンブレンに 100 V 200 mA で 80 分転写を行った。その後 PBS で 5 分間洗浄したのち、ブロッキング剤 (Block Ace, 雪印乳業) に室温で 60 分間浸漬した。

3) 抗体の反応と検出

0.2% polyoxyethylene sorbitan monolaurate-PBS (PBT) と Block Ace を 9 対 1 の割合で混合し、混合液を作成した。一次抗体 (組織免疫染色で用いたものと同じもの) を上記混合液にて 10,000 倍希釈した抗体希釈液を作成し、メンブレンを浸し 4 $^{\circ}$ C で over night した。その後 PBT で 5 分間洗浄し、上記の混合液で 50,000 倍希釈した抗マウス IgM horse radish peroxidase (HRP) 標識抗体にて震盪しながら 1 時間、室温で反応させた。PBT で 5 分間ずつ 3 回洗浄後 ECL plus Western Blotting Detection System^R (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) を使用し、Image Quant LAS4000 ル

ミノイメージアナライザー (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) にてシグナルの検出を行った。

8. 統計学的検討

得られた定量的データは各群の平均値士標準偏差 (SD) で示した。有意差検定として、多群間の比較において Dunnett 法を用いて対象群との比較を行った。有意水準 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

結 果

1. 各種軟骨組織における RAS コンポーネントの発現についての組織学的検討

8 週齢マウス 4 個体より脛骨近位端、鼻中隔、気管、脊椎骨を摘出し、さらに胎生 15 日の胎生期四肢

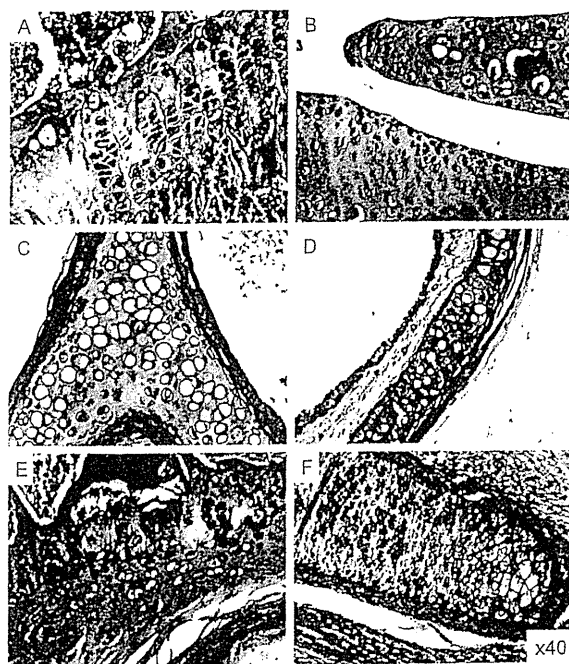


図1 生後8週のマウス各軟骨組織におけるアルシアン青/アリザリン赤Sによる組織二重染色の結果。(拡大率はすべて40倍)

- 膝関節遠位にある脛骨成長軟骨板にアルシアン青にて染色性を認める。
- 膝外側関節軟骨と外側半月板にアルシアン青にて染色性を認める。
- 鼻中隔軟骨にアルシアン青にて染色性を認める。
- 左側が気管腔であり、気管壁中心に気管軟骨を観察できる。気管軟骨にアルシアン青にて染色性を認める。
- 上方が髄腔 (*) であり、下方に向かって、成長軟骨板、椎骨終板軟骨、椎間板繊維輪、髄核 (•) である。アルシアン青にて成長軟骨板、椎骨終板軟骨、椎間板繊維輪、髄核に染色性を認める。
- 胎生15日マウスの四肢原基の右下が中心方向である。四肢原基全体にアルシアン青にて染色性を認める。

原基を採取した。アルシアン青でプロテオグリカン(コンドロイチン硫酸)の酸性ムコ多糖物質を検出し、染色性を認めた部位を軟骨組織(図1)とした。長管骨(脛骨)近位部の縦断面では成長軟骨板と、関節軟骨に染色性を認めた(図1 A, B)。鼻中隔の縦断面では鼻中隔の硝子軟骨部に染色性を認めた(図1 C)。気管の横断切片においては馬蹄型の気管軟骨に染色性を認めた(図1 D)。椎骨の縦断面では椎骨成長帯軟骨板、椎間板繊維輪で染色性を認めた(図1 E)。胎生15日の四肢原基では四肢原基全体に染色性を認めたが、この時点での四肢原基には血管侵入や骨髓腔の形成は認めなかった(図1 F)。

アルシアン青で染色性を認めた部位について、ACE, Ang, AT1R および AT2R の発現を組織免疫染色にて検討した。ACE の免疫染色では、長管骨成長軟骨板、椎骨成長軟骨板、胎生期四肢原基に陽性細胞を認めた(図2)。長管骨成長帯軟骨では増殖層から肥大層にかけて陽性細胞を認めた(図2 A)。また、椎骨成長軟骨板の増殖層軟骨細胞に染色性を認

めた。長管骨成長軟骨板に比べて肥大軟骨細胞の形態は小さかった(図2 E)。胎生期四肢原基では増殖層から肥大層への移行部で陽性細胞を少数認めたが染色性は低く、肥大層では陽性細胞を認めなかった(図2 F)。関節軟骨、鼻中隔軟骨、気管軟骨では陽性細胞は認めなかった(図2 B, C, D)。Ang については、長管骨成長軟骨板、椎骨成長軟骨板において、増殖層軟骨細胞から肥大層軟骨細胞にかけて染色性を認めた(図3 A, E)。関節軟骨、鼻中隔軟骨、気管軟骨、胎生期四肢原基においては陽性細胞を認めなかった(図3 B, C, D, F)。AT1R についても同様に、長管骨成長軟骨板、椎骨成長軟骨板で陽性細胞を認めた(図4 A, E)。関節軟骨、鼻中隔軟骨、気管軟骨、胎生期四肢原基では陽性細胞は認めなかった(図4 B, C, D, F)。AT2R についても同様に長管骨成長軟骨板、椎骨成長軟骨板で陽性細胞を認めた(図5 A, E)。関節軟骨、鼻中隔軟骨、気管軟骨、胎生期四肢原基には陽性細胞を認めなかった(図5 B, C, D, F)。

2. マウス骨折仮骨内軟骨性骨化部における RAS

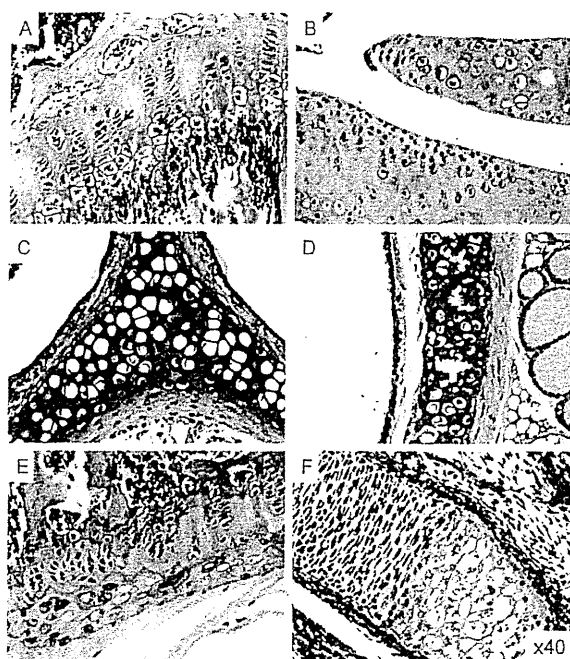


図2 生後8週のマウスの各軟骨組織におけるACE免疫組織染色の結果。(拡大率はすべて40倍)

膝関節遠位にある脛骨成長軟骨板を観察した(A)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 肥大層軟骨細胞(♠), 骨芽細胞(◀)に染色性を認める。関節軟骨, 鼻中隔軟骨, 気管軟骨に染色性を認めなかった(B, C, D)。椎骨骨髓から椎間板髓核を観察した(E)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 及び肥大層軟骨細胞(♠)に染色性を認める。胎生15日マウスの四肢原基を観察した(F)。右下が中心方向である。増殖層から肥大層に移行する部位で一部染色性を認める。

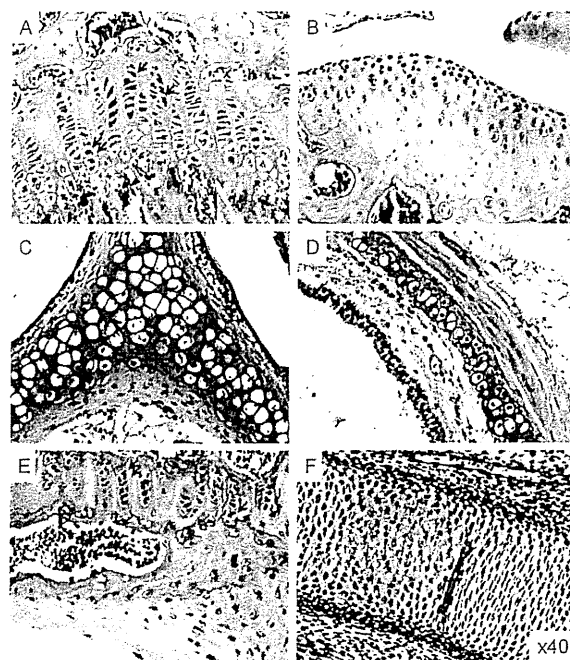


図3 生後8週のマウスの各軟骨組織におけるAng免疫組織染色の結果。(拡大率はすべて40倍)

膝関節遠位にある脛骨成長軟骨板を観察した(A)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 肥大層軟骨細胞(♠), 骨芽細胞(◀)に染色性を認める。関節軟骨, 鼻中隔軟骨, 気管軟骨, 胎生期四肢原基では染色性を認めなかった(B, C, D, F)。椎骨骨髓から椎間板髓核を観察した(E)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 及び肥大層軟骨細胞(♠)に染色性を認める。

コンポーネントの発現についての組織学的検討

骨折部仮骨には未分化な間葉系組織、未熟な骨組織、骨髄組織、軟骨組織などさまざまな組織が混在していた。特に内軟骨性骨化部に注目して、ACE, Ang, AT1R, AT2R の発現について検討した。これら4つのコンポーネントは肥大軟骨細胞の一部に発現を認めた(図6 A, B, C, D)。すなわち、軟骨細胞や肥大軟骨細胞が集簇する部分の中でも血管侵入が認められ骨化しつつある組織の周辺部で陽性細胞を多く認めた。骨芽細胞にもこれらの4つのコンポーネントの染色性を認めたが、成熟軟骨細胞には染色性を認めなかった。AT1R は RAS のその他のコンポーネントに比べて染色性が低かった(図6 C)。

3. Real time PCR によるウシ培養軟骨細胞における RAS コンポーネント発現の検討

ウシ培養軟骨細胞より mRNA を抽出し、RAS コンポーネントの発現を検討した。2-dCT 値で0.0014 から0.0028 と低いレベルではあったが、AT1R および AT2R mRNA の発現が認められた。一方、ACE および Ang の発現は認められなかった(図7)。AT1R と AT2R の mRNA の発現量に有意差はな

かった(図7)。したがって、以降のウシ培養軟骨細胞を用いた実験に関しては、AT1R と AT2R に絞って検討を行った。

4. ウシ培養軟骨細胞の AT1R および AT2R の蛍光細胞免疫染色

ウシ培養軟骨細胞において AT1R, AT2R について蛍光細胞免疫染色を行った。AT1R および AT2R は細胞膜に局在が認められた(図8)。

5. ウシ培養軟骨細胞における IL-1 β および TNF- α 刺激による AT1R および AT2R mRNA 発現の解析

ウシ培養軟骨細胞において IL-1 β および TNF- α 刺激による AT1R および AT2R の遺伝子発現の解析を real-time PCR を用いて行った。IL-1 β は、それぞれ0.1, 1.0, 10.0 ng/ml を培地に添加し、TNF- α は、それぞれ1.0, 10.0, 100.0 ng/ml を培地に添加し、コントロールには等量の PBS を添加した。試薬添加後24時間培養を行なった後に RNA を抽出し、AT1R および AT2R mRNA の発現の変化を検討した。IL-1 β 刺激では用量依存性に AT1R

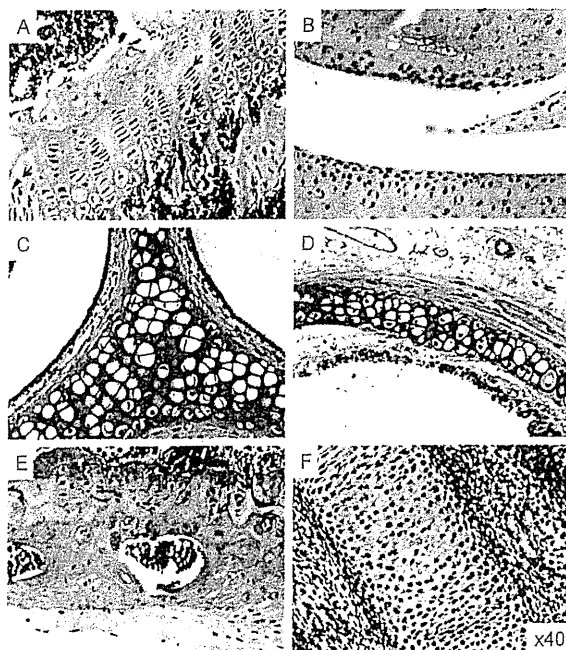


図4 生後8週のマウスの各軟骨組織における AT1R 免疫組織染色の結果。(拡大率はすべて40倍)

膝関節遠位にある脛骨成長軟骨板を観察した(A)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 肥大層軟骨細胞(♠), 骨芽細胞(◀)に染色性を認める。関節軟骨, 鼻中隔軟骨, 胎生期四肢原基では染色性を認めなかった(B, C, D, F)。椎骨骨髄から椎間板髄核を観察した(E)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 及び肥大層軟骨細胞(♠)に染色性を認める。

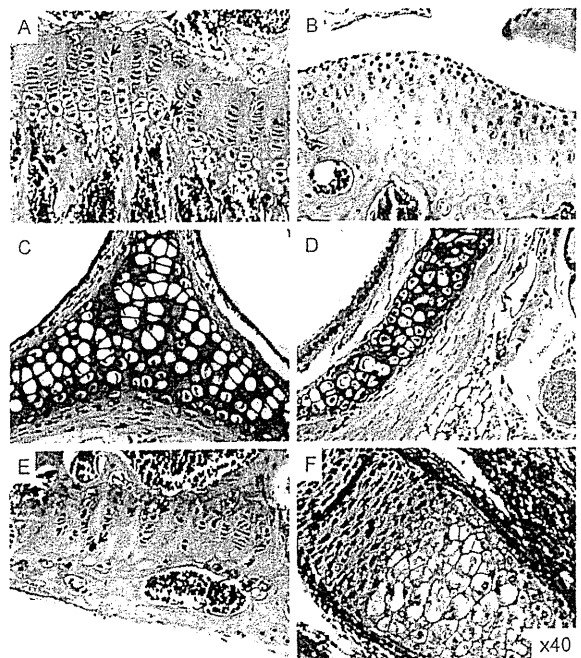


図5 生後8週のマウスの各軟骨組織における AT2R 免疫組織染色の結果。(拡大率はすべて40倍)

膝関節遠位にある脛骨成長軟骨板を観察した(A)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 肥大層軟骨細胞(♠), 骨芽細胞(◀)に染色性を認める。関節軟骨, 鼻中隔軟骨, 気管軟骨, 胎生期四肢原基では染色性を認めなかった(B, C, D, F)。椎骨骨髄から椎間板髄核を観察した(E)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 及び肥大層軟骨細胞(♠)に染色性を認める。

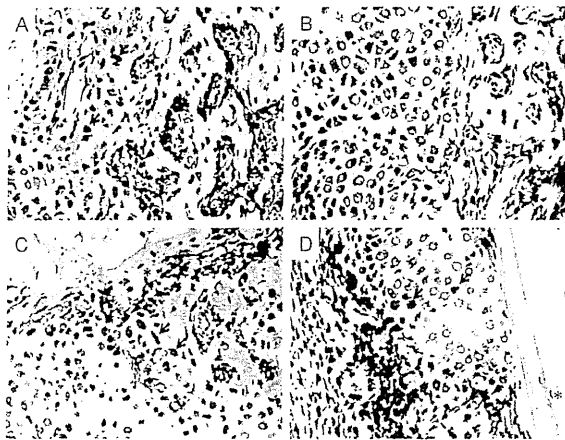


図6 骨折仮骨内軟骨性骨化部における RAS コンポーネントの免疫染色の結果。(拡大率はすべて40倍)

- A. ACE の免疫染色 左側に軟骨組織があり、一部血管侵入が観察される。右側は骨へと置換されつつある。血管侵入を認めている周囲の肥大軟骨細胞 (♣) と骨芽細胞 (◄) で染色性を認める。
- B. Ang の免疫染色 左側に軟骨細胞を認め、右側では骨へと置換されつつある。骨への移行部で一部の肥大軟骨細胞 (♣) と骨芽細胞 (◄) で染色性を認める。
- C. AT1R の免疫染色 左側に軟骨細胞を認め、右側では血管侵入を認め、骨へと置換されつつあるのが観察される。骨への移行部で一部の肥大軟骨細胞 (♣) と骨芽細胞 (◄) で染色性を認める。
- D. AT2R の免疫染色 左側には未分化間葉系細胞、骨芽細胞などを認め、血管侵入も認める。右側には軟骨細胞があり、肥大軟骨細胞 (♣) と骨芽細胞 (◄) で染色性を認める。

	ACE	Ang	AT1R	AT2R
mRNA発現	—	—	+	+
2-dCT±SD	ND	ND	0.0023±0.0005	0.0017±0.0003

図7 Real-time PCRによるウシ培養軟骨細胞における ACE, Ang, AT1R, AT2R の mRNA 発現の検討。

2-dCT 値で比較し、内部コントロールには actin mRNA を用いた。0.0014から0.0028と低いレベルではあったが、AT1RおよびAT2R mRNA の発現を認めた。しかし、ACE および Ang の発現は認められなかった (ND: not detected). (N=4).

および AT2R mRNA 発現の亢進を認めた (図9 A)。TNF- α 刺激でも同様に AT1R および AT2R mRNA 発現の亢進を認めたが、低用量での発現亢進が小さい結果であった (図9 B)。

6. ウシ培養軟骨細胞における IL-1 β および TNF- α 刺激による AT1R および AT2R 蛋白発現の解析

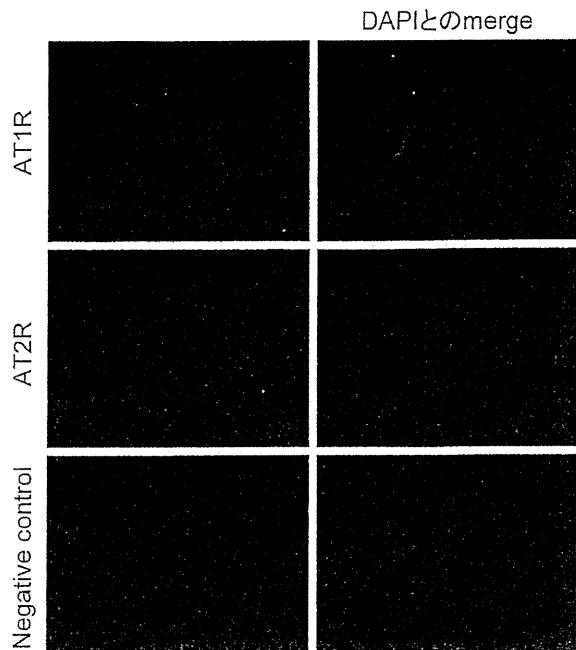


図8 ウシ培養軟骨細胞の蛍光免疫染色による AT1R, AT2R の発現の検討。右列に DAPI との Merge を表示した。AT1R, AT2R いずれの受容体も蛍光を認めた。

ウシ培養軟骨細胞において IL-1 β および TNF- α 刺激による AT1R および AT2R の蛋白発現の解析を western blotting 法を用いて行った。IL-1 β は、それぞれ0.1, 1.0, 10.0 ng/ml を培地に添加し、TNF- α は、それぞれ1.0, 10.0, 100.0 ng/ml を培地に添加し、コントロールには等量の PBS を添加した。試薬添加後24時間培養を行なった後に蛋白を抽出し、AT1R および AT2R 蛋白の発現の変化を検討した。

Western blot による検討においても、IL-1 β 刺激では用量依存性に AT1R および AT2R 蛋白の発現亢進を認めた (図9 A)。TNF- α 刺激でも同様に AT1R および AT2R 蛋白発現の亢進を認めた (図9 B)。

考 察

本研究では、これまで報告の無い正常軟骨組織において局所性 RAS が発現していることを示した。性成熟後の若年マウス (生後8週齢) における様々な硝子軟骨組織での RAS コンポーネントの発現を検討した。関節軟骨、鼻中隔軟骨、気管軟骨のごとき基本的に静止状態である軟骨組織の細胞には RAS コンポーネントの発現は認められなかった。一方、長管骨の成長軟骨板軟骨細胞、椎骨成長軟骨板軟骨細胞には RAS コンポーネントの発現が認められた。しかし、盛んに分裂増殖を行い肥大軟骨への

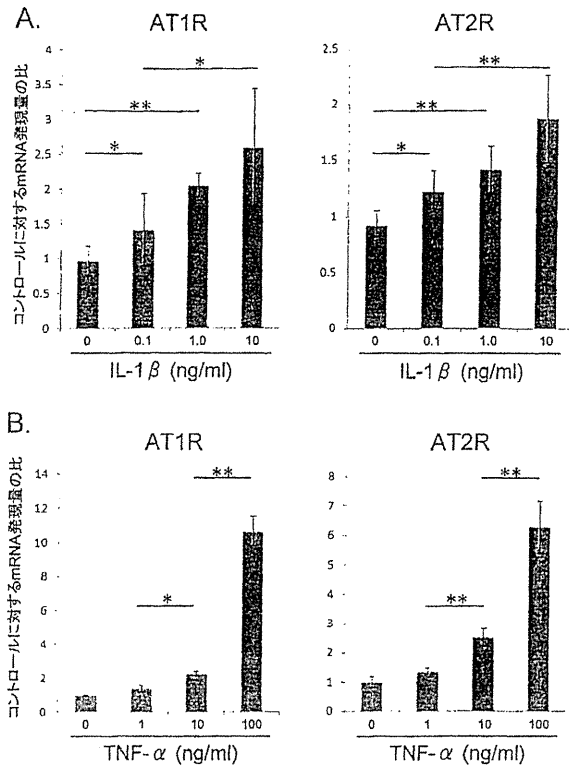


図9 ウシ培養軟骨細胞におけるIL-1 β およびTNF- α 刺激によるAT1R, AT2R mRNAの発現の変化 (Real-time PCR).

- A. IL-1 β 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/mlをそれぞれ添加し24時間培養した細胞の, AT1R, AT2RのmRNAの発現をコントロール群との相対値で比較した. IL-1 β 刺激では用量依存性にAT1RおよびAT2R mRNA発現の亢進を認めた.
- B. TNF- α 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/mlをそれぞれ添加し24時間培養した細胞の, AT1R, AT2RのmRNAの発現をコントロール群との相対値で比較した. TNF- α 刺激でも同様に, AT1RおよびAT2R mRNA発現の亢進を認めたが, 低用量での発現亢進が小さい結果であった.

分化を行う胎生15日の四肢原基には発現をほとんど認めなかった. 以上より, RASは発生段階での軟骨細胞の増殖や肥大化に関与しないが, 性成熟後にも骨格の成長を維持するマウス成長軟骨板の軟骨細胞の増殖と分化には関与することが推察された. 今回の研究結果は, マウスの骨折仮骨内軟骨性骨化部における肥大軟骨細胞にRASコンポーネントの発現が認められるとする Garcia¹³らの所見と一致する. 本研究で, 我々は脛骨骨折モデルを用いて骨折仮骨における内軟骨性骨化部分の肥大軟骨細胞にRASコンポーネントが発現することを確認した. また, 骨芽細胞にはRASコンポーネントが発現し, 骨細胞にはそれらが発現しないとする過去の報告⁶⁻⁸にも, 本研究の結果は一致した.

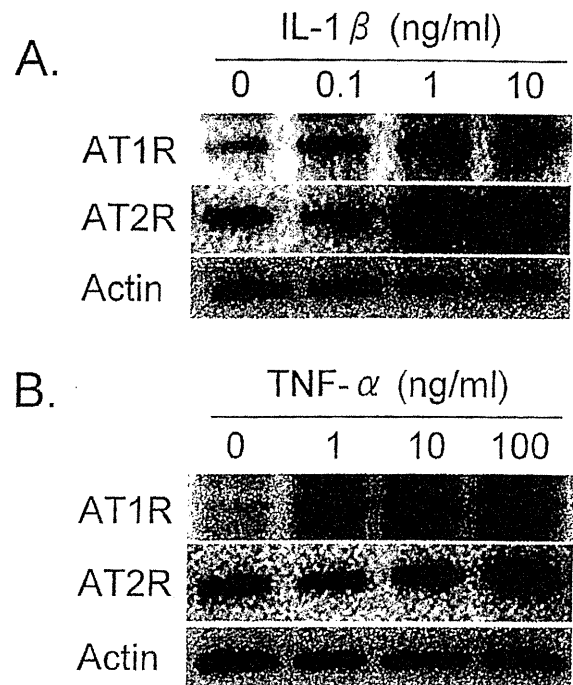


図10 ウシ培養軟骨細胞におけるIL-1 β (A) およびTNF- α (B)刺激によるAT1RおよびAT2R蛋白発現の変化 (western blotting法).

- A. IL-1 β 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/mlをそれぞれ添加し24時間培養した細胞のAT1R, AT2Rのタンパク発現量を比較した. AT1R, AT2RはIL-1 β の用量依存性にタンパク発現の亢進を認めた.
- B. TNF- α 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/mlをそれぞれ添加し24時間培養した細胞のAT1R, AT2Rのタンパク発現量を比較した. AT1R, AT2RはTNF- α の用量依存性にタンパク発現の亢進を認めた.

長管骨の長軸方向への成長は長管骨成長軟骨板における内軟骨性骨化によって生じ, この骨化は間葉系細胞から軟骨細胞への分化と増殖, さらには軟骨細胞の肥大化および石灰化を伴う細胞死に至る一連の細胞分化の過程を経て行われる¹⁴. まず, 間葉系細胞から軟骨細胞への分化が方向付け (commitment) され, 軟骨細胞は凝集し細胞塊 (軟骨結節) を形成し, 軟骨細胞へと分化する. 軟骨細胞は急速に増殖し形態を形成する. 軟骨細胞は分裂の過程で柱状配列し, 軟骨細胞に特異的なII型コラーゲンやプロテオグリカンのような細胞外基質蛋白を産生する¹⁴. 次いで, 軟骨細胞は分裂を停止し急速に肥大化する¹⁵. 肥大軟骨細胞はX型コラーゲンおよびフィブロネクチンを産生・分泌して基質を改変させ, 炭酸カルシウムによるミネラル沈着を促進する. さらに, 肥大軟骨細胞はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-13を産生し, アポトーシスによる細胞死に至る¹⁴⁻¹⁶. この一連の細胞分化過程は, 閉鎖された無