

### 3. 走行負荷でのマウス膝関節変形の検討

橋本和彦<sup>1</sup> 赤木将男<sup>1</sup> 岸本英樹<sup>1</sup> 瀧西千秋<sup>1</sup> 寺村岳士<sup>2</sup> 小野寺勇太<sup>2</sup>

<sup>1</sup>近畿大学医学部整形外科教室 <sup>2</sup>近畿大学医学部附属病院高度先端総合医療センター (再生医療部門)

**目的** マウスにおける膝関節のOA (変形性関節症) モデルは様々なものが開発されているが、ほとんどが手術侵襲を加えて数週間飼育の後に観察を行うものである。今回我々は侵襲を加えることなくマウス用トレッドミルを用いて走行負荷のみでマウスOAモデルの作製を行ったので報告する。

**方法** 9週令のC57BL/6Jclマウスを用い、週3回、1回15分 (running distance=165 m) トレッドミルにて走行させた。走行開始後2, 4, 6, 8週で膝関節 (各n=8) を摘出し、拡大X線撮影施行後、組織標本 (HE, サフラニン-O, トルイジンブルー染色) を作製した。OA変化はOARSI公認スコアで評価した。免疫染色にて内外側の脛骨軟骨でのタイプII, Xコラーゲンの発現状況を確認した。同様に2週間、半分の走行負荷をかけた群および倍の走行負荷をかけた群も観察した。(各n=4) また、走行負荷をかけず同じ期間自然飼育したものを対照群として観察した。(各n=4)

**結果** 拡大X線撮影では半月板の骨化と顆間部の骨棘形成が認められた。組織学的には、関節軟骨と半月板に軟骨細胞の肥大化、血管侵入や石灰化など内

軟骨性骨化様の変化、および、骨棘形成が認められた。内外側コンパートメントの比較では外側に変化が著しく、大腿骨側、脛骨側関節軟骨の非薄化がみられた。OARSIスコアによる評価では内側でコントロール; 0±0, 2週後; 0.5±0.76, 4週後; 1±0.26, 6週後; 1±0.23, 8週後1±0.46, 外側でコントロール; 0±0, 2週後; 1.5±0.53, 4週後; 3±1.07, 6週後; 4±1.31, 8週後4±0.35 (Mean±S.D.) であった。脛骨軟骨におけるタイプIIコラーゲンは走行負荷の増加に伴い染色性が低下した。また、タイプXコラーゲンはタイドマーク以下の軟骨肥大細胞に対して全群において染色性が認められ、走行負荷の増加に伴い、タイドマーク以上の軟骨肥大細胞に対する染色性が増加するのが認められた。

**結論** トレッドミル上を強制走行させることにより非侵襲性のマウスOAモデル作製が可能であることが示唆された。このOAモデルは今後OAにおける機械的ストレスの意義の解明、OA発症遺伝子の解明、OA予防や治療のための食餌や医薬品開発に貢献するものと考えられる。

### 4. ストレスに対するヒアルロン酸の軟骨保護作用

中川晃一<sup>1</sup> 寺村岳士<sup>2</sup> 竹原俊幸<sup>2</sup> 小野寺勇太<sup>2</sup> 福田寛二<sup>1,2</sup> 瀧西千秋<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大学医学部整形外科教室 <sup>2</sup>近畿大学高度先端総合医療センター再生医療部

**目的** 変形性関節症の発症には局所における機械的ストレスが重要な働きをする。我々は、軟骨片に圧迫負荷を加えることによって低下したプロテオグリカン (PG) 合成をヒアルロン酸 (HA) が回復させ、同時に亢進した活性酸素種 (ROS) をHAが抑制することを見出した。これによりHAの軟骨保護作用は抗酸化作用による可能性が示唆された。

今回は、軟骨のアナボリックマーカーとしてSOX9, type 2 collagen, aggrecanに着目し、機械的ストレスの影響とHAの保護作用について検討した。また、最近報告が散見されている、ストレス応答MAPキナーゼ経路に対する機械的ストレスの影響とHAの保護作用についても検討した。

**方法** ウシ関節軟骨を全層で採取した。軟骨片に対する圧迫はBiopress system FX-4000C™ (Flexercell) を用いて負荷した。SOX9, type 2 collagen, aggrecanについてはreal time PCRを、MAPキナ

ーゼについてはWestern blotを用いて評価した。

**結果** SOX9, type 2 collagen, aggrecanは機械的ストレスにより低下し、HAの添加によってその低下が抑制された。また、HAの受容体として知られるCD44に対する阻害剤であるIM7を負荷すると、HAのストレス保護作用が抑制された。P38の阻害剤であるSB202190の添加によっても、機械的ストレスによるアナボリックマーカーの低下が緩和された。MAPキナーゼについては、機械的ストレスによるERK, JNKに対しての影響は見られなかったが、リン酸化P38の増加が認められ、HA添加によって濃度依存性にリン酸化P38の増加が抑制された。

**結論** HAは機械的ストレスによる軟骨細胞外基質の合成阻害を、CD44受容体を介して緩和した。また、HAは機械的ストレスによるP38のリン酸化を抑制した。