

機械的ストレスによる軟骨変性に対するヒアルロン酸の保護作用と細胞内情報伝達機構

中川 晃一

近畿大学医学部整形外科学教室

抄 録

変形性関節症の治療薬としてヒアルロン酸 (hyaluronan, HA) の関節内注入療法が広く使用されている。しかしその作用機序については不明な部分が多い。当教室では変形性関節症の病因に機械的ストレスが重要な影響を及ぼすこと、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) がその情報を伝達することを明らかにしてきた。そこで本研究では、HA の作用を機械的ストレスに対する軟骨細胞内情報伝達機構の側面より検討することとした。ウシ関節軟骨に対する圧迫負荷は ROS 産生を増加させ、type 2 collagen や aggrecan の遺伝子発現を抑制した。HA はこれらの基質合成能を回復させるとともに、ROS 産生を抑制した。基質合成調節因子である SOX9 は、圧迫負荷により発現量が減少し、HA 添加により回復した。この現象は抗 HA 受容体抗体にて打ち消された。また、圧迫負荷に伴う SOX9 の発現量の低下は Mitogen activated protein kinases (MAPK) の一つである P38 の阻害剤添加でも回復した。さらに、圧迫負荷によりリン酸化 P38、蛋白質分解酵素 (matrix metalloproteinase, MMP) である MMP-13 の発現が亢進し、HA 添加により抑制されることが明らかにされた。この過程にも HA 受容体および P38 MAPK が関与することが明らかにされた。

以上の結果より、軟骨細胞に対する機械的ストレスは ROS 合成亢進と P38 MAPK リン酸化へと変換され、それぞれ基質合成抑制と MMP13 の産生促進となり、最終的に軟骨変性を惹起する。これに対して、HA はその受容体である CD44 を介して ROS 産生抑制および P38 MAPK リン酸化抑制を来すことより、軟骨保護作用を発揮している可能性が示唆された。

Key words: 関節軟骨, ヒアルロン酸, 機械的ストレス, 蛋白質分解酵素, 活性酸素種

緒 言

変形性関節症は、運動器において最も頻度の高い疾患の一つである。患者の ADL・QOL を著しく低下させるため、高齢社会を迎え大きな社会的問題となっている。本疾患は関節軟骨を中心とした関節構成体における、退行性及び進行性病変が混在した、慢性かつ進行性の疾患である。その原因として、生化学的あるいは生体力学的メカニズムが関与することが示唆されているが、その主因は機械的ストレスである。

関節軟骨は細胞外基質と軟骨細胞で構成されている。細胞外基質には 2 種類の主要構成成分がある。1 つは線維成分で、II, IX 及び XI 型などの軟骨特有のコラーゲンから成り、軟骨に剛直性を与えてい

る¹。もう一つは軟骨細胞より産生されたプロテオグリカン (proteoglycan, PG) で、ヒアルロン酸 (hyaluronan, HA) と巨大な重合体であるアグリカン (aggrecan) を構成する²。PG の働きとして、関節軟骨における粘弾性の保持があげられる。すなわち、荷重に対して PG は水分子の出し入れにより軟骨本来の粘弾性を発揮する。

変形性関節症に対するヒアルロン酸の関節内注入療法は、疼痛の改善や関節機能改善などの臨床的な有用性が報告されている^{3,4}。HA は関節軟骨における主要構成要素であり、その働きは粘弾性 (viscoelasticity) の保持である。関節症の進行にともない、この粘弾性が低下することより、その補給は合目的にみえる。一方 HA は軟骨保護作用を有することも報告されているが、その詳細は不明であった。

近年多くの疾患において ROS の関与が示唆されており、変形性関節症についてもその関与を示唆する報告がある⁵。ROS は酸素が代謝される過程で体内に生じる物質である。活性酸素種に対して中和作用を発揮するスーパーオキシドジスムターゼなどの抗酸化物質の働きが十分でない組織障害が生じる事が知られている。

Miki は HA が関節軟骨において、機械的ストレスによって誘導される ROS を中和することによって、軟骨代謝を改善することを初めて報告した⁶。

本研究では、その詳細な細胞内調節機構を検討することを目的とした。近年、細胞外基質産生に転写因子である SOX9 が重要な役割を果たすことが報告された⁷。また、関節軟骨破壊には MMP が重要な役割を果たし、とりわけ MMP-13 が中心的働きをすることが明らかにされた⁸。また、ストレス応答に関わる分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (Mitogen activated protein kinases, MAPK) が変形性関節症の発症に関与する可能性が示唆されている^{9,10,11}。MAPK にはサブファミリーが存在し、細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular Signal-regulated Kinase, ERK), c-Jun N 末端キナーゼ (c-jun N-terminal kinase, JNK), P38 の 3 つに分けられている¹²。そこで、これら機械的ストレスによって生じる細胞内情報伝達機構に与える HA の影響を検討することとした。

材料と方法

1. 使用薬剤

Alpha-minimum essential medium (aMEM) は Gibco (Grand Island, NY, USA) から、fetal bovine serum (FBS) は HyClone (Logan, UT, USA) から購入した。Purified HA (800-kDa, ARTZ, Dispo[®]) は科研製薬 (東京) から購入した。3'-(*p*-Aminophenyl) fluorescein (APF) は積水メディカル (東京) から購入した¹³。Anti-bovine MMP-13 antibody は AbD Serotec (Kidlington, OX, UK) から、Anti-bovine p38, p-p38, ERK1/2, p-ERK1/2, JNK, and p-JNK antibodies は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) から購入した。SB202190 (P38 inhibitor) は和光純薬 (大阪) から購入した。Anti-CD44 antibody (IM7) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。

2. 軟骨の器官培養

ウシ (生後10ヶ月) の関節軟骨を前足部 MP 関節より無菌的に採取した。この際フェザー (大阪) の10番剪刀を用い、手動的に関節面から直径 5 mm の

範囲を全層軟骨として切り出した。シャーレ上、10% FBS 添加 aMEM にて平衡状態に達するまで 37°C 5%O₂ 5%CO₂ 飽和水蒸気圧の条件下で 3 日間培養した。

3. 軟骨組織に対する周期的圧迫負荷

器官培養した軟骨を Flexercell[®] Compression Plus[™] System, FX-4000C[™] 専用の各ウェルに 1 個入れ圧迫を加えた。このシステムはコンピューター制御の空気圧にてシリコンの膜を押し上げ、検体にピストンとプレート (Biopress[™] culture plates) 間で任意の圧力と周期の圧迫を加えるシステムである (Flexcell International, Hillsborough, NC)。

4. 組織中の ROS の観察

APF は中性水溶液中ではほとんど蛍光を持たないが、これらのプローブが強い活性を持つ活性酸素種と反応すると、強蛍光性化合物であるフルオレセイン (励起波長 490 nm, 蛍光波長 515 nm) が生成し、蛍光強度の増大が観測される。

培養液中のウシ関節軟骨片に HA (2 mg/ml) を加え、周期的圧迫負荷 (28 kPa, 0.5 Hz, 6 時間) を加えた。処理後の軟骨片は、8 μm の厚さで表層から深層へ垂直に切り出した凍結切片を風乾し、PBS (-) で10分間洗浄した後、APF (5 μM) を加えて暗所で 37°C, 30分反応させた。これを BIOREVO BZ-9000 (KEYENCE, 大阪) を用いて検鏡した。

5. 遺伝子発現の解析

1) mRNA の抽出と逆転写反応

ウシ関節軟骨片 (12.0 mg) を 300 μl の TRIzol reagent (Invitrogen) 中でホモジナイザーにて粉砕し、4°C, 15000 rpm, 5 分間遠心分離を行い、その上清を 250 μl 回収し、検体とした。そこにクロロホルムを 125 μl 加え、ボルテックス10秒後10分間静置し、4°C, 15000 rpm, 10分間遠心分離を行った。上清を 100 μl 回収し、イソプロパノールを 100 μl 加え、ボルテックス10秒後10分間静置し、4°C, 15000 rpm, 10分間遠心分離を行った。デカンテーションにより液体成分を除去し、80%エタノールを 200 μl 加え、4°C, 15000 rpm, 5 分間遠心分離を行い、再度デカンテーションにより液体成分を除去した。その後フラッシュ遠心分離を行い、ピペットを用いて液体成分を除去し、5 分間ドライアップを行った後、RNase free water を 20 μl 加え、RNA を溶出した。抽出した RNA は High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて逆転写反応を行った。10×RT Buffer 1 μl, 25×dNTP 0.4 μl, 10×RT Random Primer 1 μl, Multi Scribe Reverse Transcriptase 0.5 μl, RNase free water 2.1 μl, RNA 抽出液 5 μl

表1 本研究で用いた real time PCR primer 塩基配列

Gene	Forward	Reverse
β -actin	AGGTCATCACCATCGGCAAT	GAATGCCGCAGGATTCCAT
Sox9	GTACCCGCACCTGCACAAC	CTTGTAATCTGGGTGGTCTTCTT
Type 2 collagen	TGGTATCGCCGGACCCAAG	CTCGTCCACCGTCCAACCC
Aggrecan	CACCTGTAAAAAGGGCACAGTG	GCATTGATCTCGTATCGGTCC

1を混合し、計10 μ lとした。サーモサイクラーにて25°C 10分間、37°C 120分間、85°C 5秒で逆転写反応を行いcDNAとした。得られたcDNAは1×Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (TE)にて5倍希釈し、-20°Cで保存した。

2) Real time polymerase chain reaction (real time PCR) 法による遺伝子発現の定量化

上記にて作製したcDNAを鋳型とし、Perfect real-time SYBR green II (Takara Bio, Shiga, Japan)を使用したインターカーレーター法にて実施した。使用したPrimer (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan)は表1に示す。SYBR Premix Ex Taq (2×) 10 μ l, PCR Forward Primer 0.8 μ l, PCR Reverse Primer 0.8 μ l, ROX Reference Dye (50×) 0.4 μ l, 滅菌蒸留水 7 μ l, 逆転写反応液 1 μ lで計20 μ lの混合液を作製し、7700 real-time PCR System (Applied Biosystems) を使用して反応及び検出を行った。初期変性は95°C 20秒とし、その後PCR反応として95°C 5秒、60°C 30秒を40サイクル行った¹⁴。尚、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、未処理ウシ関節軟骨をキャリブレーターサンプルとした $\Delta\Delta$ Ct法にて行った¹⁵。

6. ウェスタンブロッティング

ウシ関節軟骨片をSDS buffer(4% SDS, 125 mM trisglycine, 10% β -mercaptoethanol, 2% bromophenol blue in 30% glycerol) 300 μ l中でマイクロホモジナイザーにて粉碎した。その後、95°Cで5分間加熱した。次いで4°C, 15,000 rpmで5分間遠心し、上清を分離、検体とした。その検体5 μ lを10%アクリルアミドゲル(分離バッファ7.832 ml, 30%アクリルアミド 4 ml, 10%SDS 120 μ l, 10%Ammonium persulfite 120 μ l, NNNN テトラメチルエチレンジアミン14 μ l)にて200 mA, 40分電気泳動を行い、続いて100 V, 70分の条件でPVDF膜(Hybond-P; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)に転写を行った。転写後のPVDF膜はTBSで洗浄後、1時間ブロッティング(ブロッカー; 大日本住友製薬, 大阪)を行った。その後、0.2%Tween含有TBSで洗浄し、各種一次抗体をイムノ-エンハンサー試薬A(和光純薬, 大阪)で希釈

し、4°C, オーバーナイトで反応させた後、0.2% Tween含有TBSで洗浄し、各種Horse Radish Peroxidase (HRP) 標識二次抗体(Santa Cruz Biotechnology)をイムノ-エンハンサー試薬B(和光純薬, 大阪)で希釈し、室温で1時間反応させた。反応後、0.2%Tween含有TBSで洗浄し、ルミノールと過酸化水素(ECL plus western blotting detection system, GE Healthcare社)を用いて化学発光(ECL)を誘起させた。発光はLAS-4000(GE Healthcare, Tokyo, Japan)を用いて検出した。

7. 統計学的解析

グラフは、複数反復実験より得られた結果の平均値±標準偏差(mean±SD)で表した。比較実験区間の統計学的有意差は、JMP(SAS institute Japan)を用いて、コントロール区と任意の実験区間の比較をDunnett testを用いておこなった。

結 果

最初にHAの抗酸化作用について検討した。ウシ関節軟骨に圧迫負荷(28 kPa, 0.5 Hz, 6時間)を加え、そこにHA(2 mg/ml, 前処理1時間)を添加し、APFを用いて組織中のROSの発生を蛍光強度の増加として観察した。圧迫負荷に伴い軟骨組織の表層中心に蛍光強度が増加し、ROS産生を示唆した。HA添加により圧迫負荷に伴う蛍光強度の増加、すなわちROSの発生が抑制された(図1)。これにより、HAが抗酸化作用を有することが明らかにされた。

次にウシ関節軟骨に対する圧迫負荷に伴う細胞外基質産生能の変化をtype 2 collagen, aggrecanの遺伝子発現を指標に観察した。圧迫負荷(28 kPa, 0.5 Hz, 6時間)を加えることにより、それぞれのmRNAが減少する傾向がみられた。HA(2 mg/ml, 前処理1時間)を添加することにより、圧迫負荷に伴うmRNAの減少が回避された。従って、機械的ストレスによる基質合成抑制がHAにより回復されることが確認された(表2)。

転写因子であるSOX9は、関節軟骨の細胞外基質産生に重要な役割を果たす。SOX9mRNAは圧迫負荷により発現量が減少し、HA添加(2 mg/ml, 前処理1時間)により回復した。CD44はHA受容体とし

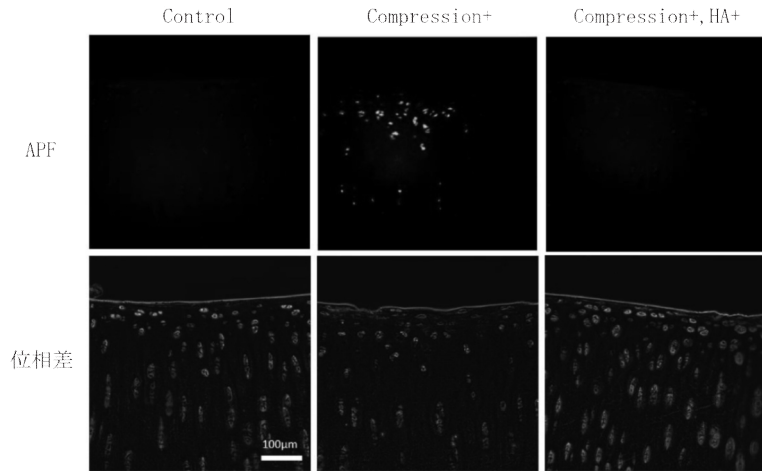


図1 圧迫負荷による軟骨組織中のROS産生とHAによる抑制。ウシ関節軟骨に圧迫負荷(28 kPa, 0.5 Hz, 6時間)を加え、軟骨組織中のROSの発生を蛍光試薬APFを用いて観察した。圧迫負荷によりROS産生は亢進するが、HA存在下では圧迫負荷によるROS産生は抑制された。スケールバー=100µm。

表2-1 Type 2 collagen の遺伝子発現

		実験1	実験2	実験3
圧迫負荷(-)	HA(-)	1.12	0.93	0.97
圧迫負荷(+)	HA(-)	0.82	0.53	0.51
圧迫負荷(+)	HA(+)	0.85	0.72	0.76

Type 2 collagen/ β -actin 比

表2-2 Aggrecan の遺伝子発現

		実験1	実験2	実験3
圧迫負荷(-)	HA(-)	1.31	0.73	1.05
圧迫負荷(+)	HA(-)	0.35	0.23	0.26
圧迫負荷(+)	HA(+)	0.78	0.69	0.77

Aggrecan/ β -actin 比

ウシ関節軟骨に圧迫負荷(28 kPa, 0.5 Hz, 6時間)を加え、HA(2 mg/ml)の有無によるtype 2 collagen, aggrecanのmRNA発現の変化をreal time PCRを用いて検討した。

て知られている¹⁶。その阻害剤である抗CD44抗体(IM7)で前処理を行った場合、HAによるSOX9mRNAの回復は認められなかった。p38 MAPKの阻害剤であるSB202190で前処理(10µM, 1時間)を行った場合、圧迫負荷によるSOX9mRNAの発現量の減少は抑制された(図2)。これらの結果より、HAによる基質合成抑制に対する回復作用は、転写因子SOX9を介するとともに、その情報伝達機構にHA受容体およびp38 MAPKが関与することが明らかにされた。

そこで、p38 MAPKの関与を、より詳細に検討することとした。ウエスタンブロッティングにより、圧迫負荷に伴うp38のリン酸化について検討した。圧迫負荷(28 kPa, 0.5 Hz)30分でリン酸化P38の発現が増加し、1時間の時点でピークとなり、その後継時的にリン酸化P38の発現が低下した(図3)。

この圧迫負荷によるリン酸化P38発現に対する

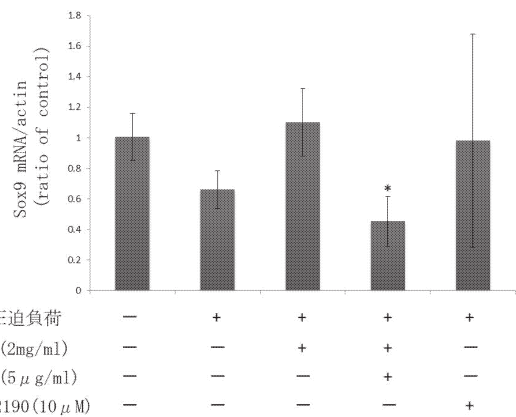


図2 圧迫負荷に伴う転写因子SOX9発現量の変化

ウシ関節軟骨に圧迫負荷(28 kPa, 0.5 Hz, 6時間)を加え、HA(2 mg/ml), IM7(5µg/ml), SB202190(10µM)の有無によるSOX9mRNA発現の変化を検討した。結果はコントロール群に対する相対値の平均値で示した。エラーバーは標準偏差を示す(n=3, Dunnet test, *p<0.05)。

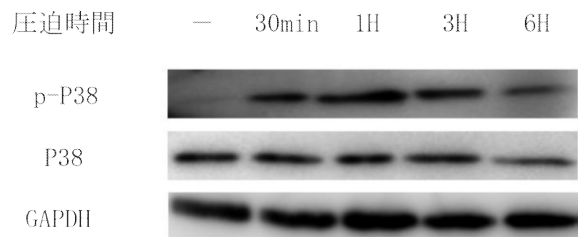


図3 圧迫負荷に伴うリン酸化P38の発現の継時変化

ウシ関節軟骨に圧迫負荷(28 kPa, 0.5 Hz)を加え、リン酸化P38の蛋白発現量をウエスタンブロッティングにて検出した。

HAの効果を検討した。圧迫負荷によるリン酸化P38発現はHA添加により濃度依存性に抑制された。尚、JNK, ERKについては、圧迫負荷によるリ

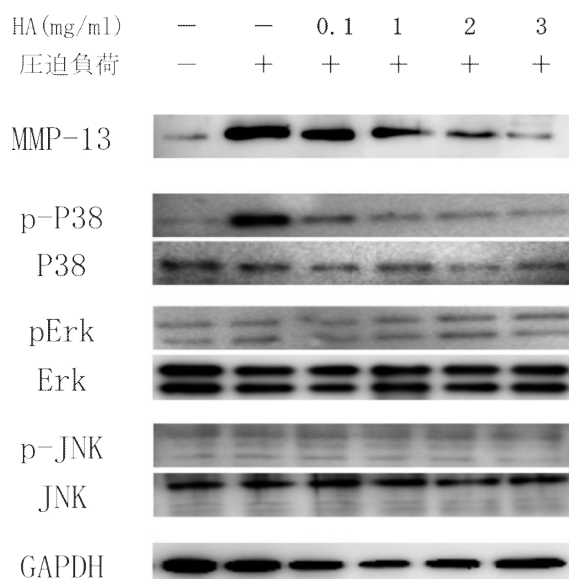


図4 圧迫負荷に伴う MAPK, MMP-13の発現と HA の効果
ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (28 kPa, 0.5 Hz, 1時間)を加え,リン酸化 MAPK, MMP-13の蛋白発現量をウエスタンブロットングにて検出した. HA は0.1 mg/ml~3 mg/mlの各種濃度のものを添加した.

ン酸化の変化はなかった. 基質分解酵素である MMP-13は,機械的負荷により明らかに発現が亢進した.これは,リン酸化 P38発現と同様に HA 添加により濃度依存性に抑制された (図4).

圧迫負荷によるリン酸化 P38 および MMP-13 発現亢進の機構を,さらに検討した.圧迫負荷 (28 kPa, 0.5 Hz, 1時間)を加えることでこの両者の発現が亢進し,HA (2 mg/ml)の前処理にてその発現は抑制された.しかし,抗 CD44 抗体 (IM7)の前処理 (5 µg/ml, 1時間)を行った場合は,圧迫負荷に伴うリン酸化 P38, MMP-13の増加に対する HAの抑制効果がみられなかった.また,P38の阻害剤である SB202190により前処理 (10 µM, 1時間)を行った場合,圧迫負荷に伴う MMP-13の増加は抑制された (図5).

考 察

変形性関節症の発症には,肥満や老化,遺伝的背景など,様々な因子が関与している¹⁷.しかしながら,最も重要な因子は局所における機械的ストレスである¹⁸.我々のこれまでの検討により,軟骨細胞に対する軽度の負荷は PG 合成能を増加させ,逆に高度の負荷はそれを低下させるという知見を得た^{19,20}.この軟骨細胞に対する高度の負荷による PG 合成抑制の背景には,ROS 誘導があることも我々の研究により明らかにされた²¹.

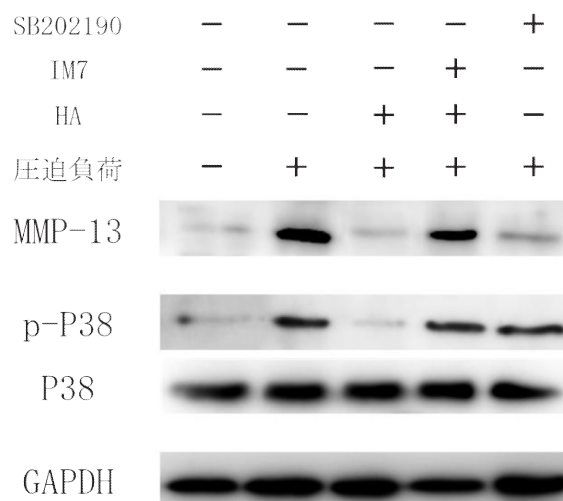


図5 圧迫負荷に伴うリン酸化 P38を介した MMP-13の発現と受容体を介した HA の効果
ウシ関節軟骨に圧迫負荷 (28 kPa, 0.5 Hz, 1時間)を加え,リン酸化 P38, MMP-13の蛋白発現量をウエスタンブロットングにて検出した. HA は2 mg/ml, IM7 は5 µg/ml, SB202190 は10 µMの濃度で,それぞれ1時間の前処理を行った.

今回の研究では,軟骨組織に対して28 kPaの圧迫負荷を加えた.この強度は非生理的で,軟骨変性を惹起する強度と考えられる⁶.我々は以前軟骨に対する機械的負荷により ROS が誘導されることを蛍光色素 L-012 を用いて報告した^{20,22}.今回の検討により,HA 添加により機械的ストレスによる ROS 誘導が抑制されることが確認された⁶.さらに HA は圧迫負荷により産生される ROS を抑制するとともに,圧迫負荷による抑制された type 2 collagen, aggrecan の遺伝子発現を回復させた.

変形性関節症には主要な2つの機序が存在する.1)細胞外基質合成能の低下,および2)細胞外基質分解能の亢進である.今回の検討により,機械的ストレスによる基質合成能の低下には,その調節因子である SOX9 が関与することが明らかにされた.ヒアルロン酸は SOX9 発現を回復させるが,この反応には HA 受容体が関与するとともに,p38 MAPK の関与も示唆された.この経路に ROS がどのような修飾を与えるかについては今後の検討を要するが,HAの軟骨保護作用としての新たな情報を提供している.

一方,細胞外基質分解能の亢進には MMP-13 発現が重要な役割を果たす⁸.今回我々は機械的ストレスによる MMP-13 発現を初めて明らかにした.これは,P38 リン酸化と同様に HA 添加により濃度依存性に抑制され,ERK, JNK の発現との相関は見ら

れなかった。また、SB202190 が機械的ストレスによる MMP-13 の発現を抑制したことから、MAPK の中でも特に P38 のリン酸化により MMP-13 の発現が亢進し、HA は P38 のリン酸化を抑制することで MMP-13 の発現を抑制しているということが示唆された。これまでも、HA が軟骨細胞においてサイトカイン刺激による P38 のリン酸化に伴う MMP-13 の発現を抑制したとする報告はある²³。しかし、機械的ストレスによる MMP-13 発現亢進を抑制したとする報告はなく、HA の軟骨保護作用を検討する上で、有用な実験デザインとなる可能性が強く示唆された。

変形性関節症に対するヒアルロン酸関節内注入の臨床知見に関する報告は1996年ごろより散見される²⁴。これらの報告を受けて、その臨床応用が ACR のガイドラインに引用されるようになった。これまでに6つのメタ解析が行われ、明らかに有用^{25,26}とする報告がある一方、効果が殆ど無いという報告もある²⁷。これは対象疾患の変形性関節症の病期や疾患活動性における多様性、効果判定時期の違いなどに起因しているものと思われる。これを受けて、効果判定時期を一定としたメタ解析が行われ、6ヶ月以上にわたっての除痛効果が報告された⁴。このように、関節内注入療法の効果は除痛効果の観点から検討がなされてきた。その作用機序として、先に述べた粘弾性の改善は大きな要素であり、これによる関節潤滑の改善が除痛効果に繋がっていると思われる。これまでに HA の関節内注入療法によって、関節軟骨の修復を示す臨床成績は得られていない。一方実験モデルにおいては、ヒアルロン酸の軟骨修復効果が示されており、いわゆる disease-modifying activity が期待されている²⁸。

今回の検討により、その細胞内情報伝達機構の一

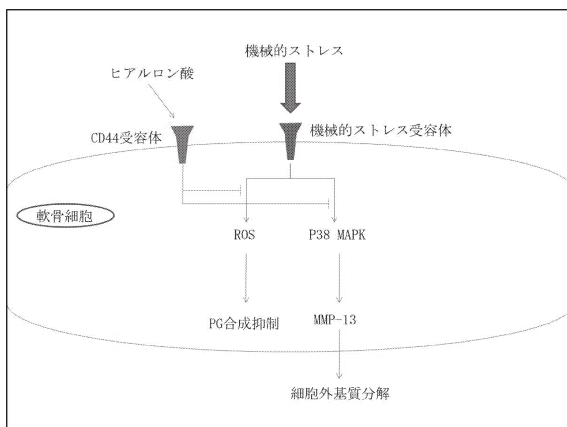


図6 機械的ストレスに対するヒアルロン酸の保護作用と細胞内情報伝達機構

部が明らかにされた。軟骨細胞に対する機械的ストレスは、何らかの受容体で関知され ROS 合成亢進と p38 MAPK リン酸化へと変換される。これはそれぞれ基質合成抑制と MMP13 の産生促進となり、最終的に軟骨変性を惹起する。これに対して、HA はその受容体である CD44 を介して ROS 産生抑制および P38 MAPK リン酸化抑制を来すことより、軟骨保護作用を発揮している可能性が示唆された (図6)。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました浜西千秋教授に深く感謝の意を捧げます。また、研究を遂行するにあたり全般にわたり御指導を頂きました福田寛二教授、終始御助言を頂いた高度先端総合医療センター再生医療部の寺村岳士先生、竹原俊幸先生、小野寺勇太先生、ならびに御協力頂いた諸先生方に心から感謝の意を申し上げます。

文 献

1. Eyre D (2002) Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4: 30-35
2. Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J (1990) Domain structure in aggregating proteoglycans from cartilage. *Biochem Soc Trans* 18: 794-796
3. Bellamy N (2006) Hyaluronic acid and knee osteoarthritis. *J Fam Pract* 55: 967-968
4. Bannuru RR, Natov NS, Dasi UR, Schmid CH, McAlindon TE (2011) Therapeutic trajectory following intra-articular hyaluronic acid injection in knee osteoarthritis-meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 19: 611-619
5. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP (2003) The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 747-755
6. Miki Y, Teramura T, Tomiyama T, Onodera Y, Matsuoka T, Fukuda K, Hamanishi C (2010) Hyaluronan reversed proteoglycan synthesis inhibited by mechanical stress: Possible involvement of antioxidant effect. *Inflamm Res* 59: 471-477
7. Kupcsik L, Stoddart MJ, Li Z, Benneker LM, Alini M (2010) Improving chondrogenesis: Potential and limitations of sox9 gene transfer and mechanical stimulation for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 16: 1845-1855
8. van den Berg WB (2011) Osteoarthritis year 2010 in review: Pathomechanisms. *Osteoarthritis Cartilage* 19: 338-341
9. Takebe K, Nishiyama T, Hayashi S, Hashimoto S, Fujishiro T, Kanzaki N, Kawakita K, Iwasa K, Kuroda R, Kurosaka M (2011) Regulation of p38 mapk phosphorylation inhibits chondrocyte apoptosis in response to heat stress or mechanical stress. *Int J Mol Med* 27: 329-335
10. Tetsunaga T, Nishida K, Furumatsu T, Naruse K,

- Hirohata S, Yoshida A, Saito T, Ozaki T (2011) Regulation of mechanical stress-induced mmp-13 and adamts-5 expression by runx-2 transcriptional factor in sw1353 chondrocyte-like cells. *Osteoarthritis Cartilage* 19: 222-232; Saklatvala J (2007) Inflammatory signaling in cartilage: Mapk and nf-kappab pathways in chondrocytes and the use of inhibitors for research into pathogenesis and therapy of osteoarthritis. *Curr Drug Targets* 8: 305-313
11. Sondergaard BC, Schultz N, Madsen SH, Bay-Jensen AC, Kassem M, Karsdal MA (2010) Mapks are essential upstream signaling pathways in proteolytic cartilage degradation-divergence in pathways leading to aggrecanase and mmp-mediated articular cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 279-288
12. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM (2008) Mapks and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 47: 409-414
13. Cohn CA, Pedigo CE, Hylton SN, Simon SR, Schoonen MA (2009) Evaluating the use of 3'-(p-aminophenyl) fluorescein for determining the formation of highly reactive oxygen species in particle suspensions. *Geochem Trans* 10: 8
14. Teramura T, Fukuda K, Kurashimo S, Hosoi Y, Miki Y, Asada S, Hamanishi C (2008) Isolation and characterization of side population stem cells in articular synovial tissue. *BMC Musculoskelet Disord* 9: 86
15. Dussault AA, Pouliot M (2006) Rapid and simple comparison of messenger rna levels using real-time pcr. *Biol Proced Online* 8: 1-10
16. Knudson CB, Knudson W (2004) Hyaluronan and cd44: Modulators of chondrocyte metabolism. *Clin Orthop Relat Res*: S152-162
17. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP (2010) Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 18: 24-33
18. Sun HB (2010) Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1211: 37-50; Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K (1998) Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: A review. *Semin Arthritis Rheum* 27: 392-399
19. Fukuda K, Asada S, Kumano F, Saitoh M, Otani K, Tanaka S (1997) Cyclic tensile stretch on bovine articular chondrocytes inhibits protein kinase c activity. *J Lab Clin Med* 130: 209-215
20. Tomiyama T, Fukuda K, Yamazaki K, Hashimoto K, Ueda H, Mori S, Hamanishi C (2007) Cyclic compression loaded on cartilage explants enhances the production of reactive oxygen species. *J Rheumatol* 34: 556-562
21. Hara F, Fukuda K, Asada S, Matsukawa M, Hamanishi C (2001) Cyclic tensile stretch inhibition of nitric oxide release from osteoblast-like cells is both g protein and actin-dependent. *J Orthop Res* 19: 126-131; Yamazaki K, Fukuda K, Matsukawa M, Hara F, Yoshida K, Akagi M, Munakata H, Hamanishi C (2003) Reactive oxygen species depolymerize hyaluronan: Involvement of the hydroxyl radical. *Pathophysiology* 9: 215-220
22. Yamazaki K, Fukuda K, Matsukawa M, Hara F, Matsushita T, Yamamoto N, Yoshida K, Munakata H, Hamanishi C (2003) Cyclic tensile stretch loaded on bovine chondrocytes causes depolymerization of hyaluronan: Involvement of reactive oxygen species. *Arthritis Rheum* 48: 3151-3158
23. Julovi SM, Ito H, Nishitani K, Jackson CJ, Nakamura T (2011) Hyaluronan inhibits matrix metalloproteinase-13 in human arthritic chondrocytes via cd44 and p38. *J Orthop Res* 29: 258-264
24. Lohmander LS, Dalen N, Englund G, Hamalainen M, Jensen EM, Karlsson K, Odensten M, Ryd L, Sernbo I, Suomalainen O, Tegnander A (1996) Intra-articular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis of the knee: A randomised, double blind, placebo controlled multicentre trial. *Hyaluronan multicentre trial group. Ann Rheum Dis* 55: 424-431
25. Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G (2006) Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev*: CD005321
26. Wang CT, Lin J, Chang CJ, Lin YT, Hou SM (2004) Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am* 86-A: 538-545
27. Arrich J, Piribauer F, Mad P, Schmid D, Klaushofer K, Mullner M (2005) Intra-articular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee: Systematic review and meta-analysis. *CMAJ* 172: 1039-1043
28. Goldberg VM, Buckwalter JA (2005) Hyaluronans in the treatment of osteoarthritis of the knee: Evidence for disease-modifying activity. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 216-224