

氏 名	高 橋 英 明			
学位の種類	博士（保健学）			
学位記番号	甲第30号			
学位授与の日付	2017年 3 月14日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
学位論文題目	<b>Articular chondrocyte alignment in the rat after surgically induced osteoarthritis</b> <b>変形性膝関節症モデルラットにおける関節軟骨細胞の細胞配列変化</b>			
論文審査員	主査	新潟医療福祉大学	教授	田 卷 弘 之
	副査	新潟医療福祉大学	教授	大 西 秀 明
	副査	新潟医療福祉大学	教授	大 山 峰 生

## 論文内容の要旨

### 【緒 言】

変形性関節症（Osteoarthritis ; OA）は関節軟骨の変性退行疾患で高齢者において最も多い骨関節疾患の一つであり，関節痛を誘発し活動制限を引き起こす。組織レベルでは，OA 進行に伴い軟骨細胞はアポトーシスによる細胞数の減少を認め，軟骨基質（extracellular matrix ; ECM）の減少により関節軟骨の力学的強度が著しく損なわれる。通常，関節軟骨細胞は，表層から石灰化層にいたるまで複雑に分化統制されており，局在別にその働きが異なる。そのため，関節軟骨細胞は表層の静止軟骨細胞から石灰化層の肥大軟骨細胞に至るまで柱状（カラム状）に規則性を持った配列パターンを成し細胞間において相互作用を有することが報告されている。例えば，肥大軟骨細胞から放出される IHH（Indian hedgehog）は，周辺の分化促進作用と増殖軟骨細胞の PTHrP（parathyroid hormone-related peptide）を放出促進作用がある。一方，PTHrP は肥大軟骨細胞に対し分化抑制作用を及ぼす。このネガティブフィードバックにより，分化は巧妙に調節され各位置を保っている。先行研究では，OA において IHH が高発現することや細胞配列が乱れることが定性的にいわれているが，細胞の規則的配列が恒常性維持に重要な因子であるかは不明である。そこで本研究では，OA モデルラットを用い OA 進行と軟骨細胞アライメント間に関連があるかについて定量的に明らかにすることを目的とした。

### 【方 法】

対象は13週齢の Wistar 系雄性ラット（n = 30）を用い，すべての処置は全身麻酔下にて実施した。OA 誘発処置として，右膝関節の内側半月靭骨靭帯を切除し，右膝関節を不安定にせしめた。左膝関節には半月板剖出までの Sham 処置を実施した後に縫合した。術後 0，1，2，4，8 週目（各 n = 6）の各時期で灌流固定後に膝関節を採取した。試料は24時間の後固定後，エチレンジアミン四酢酸で脱灰し，パラフィン包埋した。各サンプルブロックは5 $\mu$ m の薄切切片を作成し，Safranin-O 染色及び H-E 染色を施した。観察には光学顕微鏡を用い，設置した CCD カメラにて脛骨内側面の組織

画像を取得した。Safranin-O 染色画像は OA 重症度の半定量的評価 (OARSI スコア), H-E 染色画像は画像処理ソフトを用いて細胞密度と空間自己相関分析による配列パターンの指標 (Z スコア) を算出した。OARSI スコア, 細胞密度及び Z スコアの経時的変化については Steel 検定を用い, 有意水準は 5 % とした。OARSI スコアと細胞密度および Z スコア間における相関にはスピアマン偏順位相関を用い有意水準は 1 % とした。

### 【結 果】

組織学的所見として, 術後 2 週経過以降に染色性の低下を伴った表層部からの細胞数減少とアライメント異常を認めた。術直後と比較した結果, OARSI スコアは術後 1 週経過時点より有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。細胞密度と Z スコアは術直後と比較し, 術後 2 週経過時点より有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。OARSI スコアと細胞密度の間に弱い負の相関関係を認めた ( $r = -0.41$ )。一方, OARSI スコアと Z スコアの相関関係については, より強い負の相関関係を認めた ( $r = -0.62$ )。

### 【考 察】

本研究では, 関節軟骨の恒常性維持に軟骨細胞の数だけでなく, 細胞アライメントも重要な因子であることが明らかとなった。

OA では IHH が増加することにより, 肥大軟骨細胞マーカーである X 型コラーゲン, runt-related transcription factor 2 (RUNX 2), matrix metalloproteinase (MMP13), alkaline phosphatase (ALP), disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADMTS-5) などが高発現することが報告されている。その他にも, 表層の増殖軟骨細胞間には Gap junction (connexin 43) を介したクロストークが分化と基質恒常性に関与するとされており複数の分化調節因子が破綻した結果, 異化に加速した可能性が考えられる。

一方, 術後 1 週経過時点では関節表面の fibrillation による OARSI スコアの上昇が認められたが, 細胞数や細胞配列には有意差を認めなかった。OA 初期では, 表層部の軟骨細胞において, アポトーシスとオートファジーシグナルの共局在が報告されていることから, 術後 1 週経過時点では細胞数と細胞配列には影響を及ぼさなかったと考えられる。

したがって, OA 治療戦略に最も効果的な時期は, 発症前の予防的介入もしくは術後 2 週経過時点の組織像までにアポトーシスを防止する何かしらの介入が必要であると推察される。

キーワード：軟骨細胞アライメント, 変形性膝関節症, 空間自己相関分析

## 論文審査結果の要旨

本論文は, 変形性関節症 (OA) モデルラットを用いた関節軟骨の組織学的研究であり, 主に OA の進行に伴う軟骨細胞の規則的な配列パターンの乱れについて, 空間的自己相関分析を用いて定量評価した研究である。

本研究では, OA を惹起する膝関節内側半月脛骨靭帯を切除する手術を実施し, 関節軟骨の組織細胞について術後 8 週目までの経時的変化を顕微鏡にて詳細に観察した。関節軟骨細胞は一般に柱状

(カラム状)に規則的に配列されるパターンを示すが、OAにおいては細胞死や増殖分化過程が障害されることにより細胞配列パターンが乱れることが理解されているが、その定量化については国際的にも試みが少ない。本研究は、ある対象が規則的にパターン化しているか等の特徴を数量化し統計量として示す方法の一つである空間的自己相関分析を組織細胞形態学分野に応用し、細胞配列パターンの数量化(Zスコア)を試みた研究である。13週齢のWistar系雄性ラットを対象として、OA誘発処置群には右膝関節の膝関節内側半月脛骨靭帯切除術を行い、Sham群には半月板剖出後に縫合し、その後0, 1, 2, 8週目に各々膝関節部を採取して経時的に関節軟骨組織を顕微鏡観察した。軟骨組織画像から各軟骨細胞の周囲、重心、細胞面積を求め、空間的自己相関分析を行い、Zスコアの値を求め、Dispersed, Random, Clusteredの指標を得た。

その結果、本研究では以下の点を明らかにした。Safranin-O染色及びH-E染色により同定した軟骨組織において、術後2週目以後にその染色性の低下からプロテオグリカン等を含む軟骨基質の減少が認められた。また関節軟骨組織の表層部から軟骨細胞数の減少並びにアライメントの異常も術後2週目から認められた。OAの重症度を半定量的に評価するOARSIスコアは術後1週目から有意に増大し、経時的に漸増した。さらにOARSIスコアと軟骨細胞密度との関係を検証したところ、両者に有意な負の相関関係( $r = -0.41$ )が認められた。加えて、ZスコアとOARSIスコアとも有意な負の相関関係( $r = -0.62$ )が認められた。

上記の研究結果を通覧し、本研究では、軟骨細胞配列パターンが術後2週目から有意に乱れることをZスコアを用いて統計学的手法を用いて明らかにした点、及びZスコアとOARSIスコア並びに軟骨細胞密度との間に負の相関関係を明らかにした点はこれまでに報告がなく新規性の高い知見として評価される。OAの重症度と軟骨細胞配列パターンの変化との関連性は、OAにおける機能的構造的関連性を検証する上で重要な意義を有すると考えられる。

学位論文提出者に対し、本論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った結果、目的については、1) OAの発生機序に関する説明、2) OAガイドラインについての説明について質疑が行われた。方法については、3) 対象とする組織形態計測において関心領域の設定基準やその妥当性、4) OAモデルラットの作成方法、5) 空間的自己相関分析の詳細について質疑が行われた。結果については、6) 相関関係の検討に用いた対象サンプルについての説明、7) 組織画像から観る軟骨細胞分布の疎密の局所的差異についての説明とその解釈について質疑が行われた。考察については、8) 本研究の結果から考えられる適切な介入時期の選択とその理由、9) 8週間以上の長期間の処置をしたケースでの予想される結果、10) 力学的ストレスとの関連性等について質疑が行われ、全ての質疑について適切な解答を得ることができた。

今後、ヒトへの応用を考える場合、実験動物とヒトとの軟骨組織の代謝回転特性の違い等を考慮し、また非侵襲的な細胞観察同定手法が確立されることで本研究の知見が活かされる可能性がある。そのため、更に長期間の実験期間の設定や実際に生じる関節間の力学的ストレス強度の実測などが課題として挙げられ、これらの詳細な検証によりさらなる発展が期待できる。

以上のことから、審査委員会は本論文を博士論文に相応しいと認める。