

坂本 淳哉 論文内容の要旨

主 論 文

Immobilization-induced cartilage degeneration is mediated through the expression of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and chondromodulin-I

(不動による関節軟骨の退行性変化には、hypoxia-inducible factor-1 α 、vascular endothelial growth factor, chondromodulin-I の発現が関与する)

坂本淳哉, 折口智樹, 沖田 実, 中野治郎, 加藤克知, 吉村俊朗
和泉伸一, 小守壽文, 中村英樹, 井田弘明, 川上 純, 江口勝美

(Connect. Tissue Res. • 50 卷 1 号 37-45 2009 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻
主任指導教員：江口 勝美 教授)

緒 言

関節の不動に伴い関節軟骨層の菲薄化や血管様構造の侵入などの退行性変化が生じると報告されているが、その詳細は未だ明らかではない。一般に、低酸素状態にある組織では低酸素特異的転写因子 hypoxia inducible factor-1 α (以下、HIF-1 α) が発現しており、血管新生因子である vascular endothelial growth factor (以下、VEGF) の発現を促進することが知られている。また、軟骨組織に特異的に存在する Chondromodulin-1 (以下、ChM-1) は強力な血管新生抑制因子であり、軟骨組織への血管侵入を抑制していることが知られている。そして、変形性関節症モデルラットの関節軟骨では、ChM-1 の発現が減少しており、そのことが関節軟骨への血管様構造の侵入を促進し、軟骨層の石灰化を惹起すると考えられている。したがって、不動に伴う関節軟骨の退行性変化には、関節軟骨が低酸素状態に曝された結果生じる HIF-1 α 、VEGF、および ChM-1 の動態が関与しているのではないかと仮説できる。一方、Salter らにより関節炎や損傷後の関節軟骨の修復に対する持続他動運動 (以下、CPM) の有用性が報告されて以来、特に関節外科術後早期から CPM が実施されるようになった。そして、CPM は関節軟骨の低酸素状態を抑制し、不動に伴う関節軟骨の退行性変化に対しても効果があると思われるが、この点に関する報告は見られない。

本研究の目的は、足関節不動モデルラットを用い、不動による関節軟骨の退行性変化に関して上記仮説を検討すること、ならびに不動の過程で負荷する CPM が不動に伴う

関節軟骨の退行性変化に与える影響を検討することである。

対象と方法

1) 実験動物

12 週齢の Wistar 系雄性ラット 30 匹を用い、①無処置の対照群 (10 匹)、②両側足関節を最大底屈位で 4 週間ギプスを用いて不動化する群 (以下、不動群、10 匹) ③4 週間の不動化の過程で CPM を施行する群 (以下、CPM 群、10 匹) に振り分けた。なお、今回の実験は本学の動物実験倫理委員会の承認を得て、動物実験施設で行った。

2) CPM の方法

ペントバルビタールナトリウム (40mg/kg) の腹腔内投与によりラットに麻酔を行った後、CPM 機器を用いてラット足関節の底背屈運動を角速度 10° /秒、30 分/日、6 回/週の頻度で実施した。

3) 試料作成

実験期間終了後、麻酔下で両側足関節を摘出した。摘出した右側足関節は 10%ホルマリン固定、K-CX 脱灰後、左側足関節は 4%パラホルムアルデヒド固定、10%EDTA にて脱灰後、通法のパラフィン包埋処理を行った。

4) 組織学的検索

右側足関節試料の連続切片から試料 $55 \mu\text{m}$ 厚 (連続切片 11 枚) につき 1 枚、のべ 12 枚の切片を抜粋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡を用いて検鏡した。定量解析として、関節軟骨層の厚さ、および血管様構造の出現数を計測した。

5) 免疫組織化学的検索

血管様構造の出現のメカニズムを検索する目的で、左側足関節試料を用い $5 \mu\text{m}$ 厚の切片を作成し、HIF-1 α 、VEGF、ChM-1 に対する免疫組織化学的染色を行った。そして、光学顕微鏡を用いて検鏡し定量解析として HIF-1 α と VEGF の陽性細胞率を算出した。また、関節軟骨層の面積に対する ChM-1 陽性反応領域の面積の割合を ChM-1 陽性領域率として算出した。

結 果

1) 関節軟骨層の厚さは、対照群と比較して不動群、CPM 群は有意に低値を示した。また、不動群と CPM 群を比較すると CPM 群が有意に高値を示した。

2) 血管様構造の出現数は、不動群は対照群、CPM 群より有意に高値を示したが、対照群と CPM 群の間には有意差を認めなかった。

3) HIF-1 α 陽性細胞率は、不動群が最も高値を示しついで CPM 群、対照群の順であった。また、VEGF 陽性細胞率は、不動群は対照群、CPM 群より有意に高値を示したが、対照群と CPM 群との間には有意差を認めなかった。

4) ChM-1 陽性領域率は、不動群は対照群、CPM 群より有意に低値を示したが、対照群と CPM 群の間には有意差を認めなかった。

考 察

不動群では、血管様構造の出現数、ならびに HIF-1 α ・VEGF 陽性細胞率が対照群のそれより有意に高値を示し、さらに関節軟骨層の厚さと ChM-1 陽性領域率が対照群より有意に低値を示した。つまり、これらの結果は、関節の不動に伴う関節軟骨の退行性変化には関節軟骨が低酸素状態に曝された結果生じる HIF-1 α 、VEGF、ChM-1 の動態が関与するとした先の仮説を支持するものと思われる。一方、不動の過程で CPM を負荷

すると不動に伴う退行性変化を抑制できており、これは CPM による滑液の関節軟骨への浸透促進効果により、関節軟骨の低酸素状態を抑制できたためと推察される。