## 慶應義塾大学学術情報リポジトリ

Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvirorunent : study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes
Sub Title	ヒト関節軟骨由来chondronおよび培養軟骨細胞を用いた軟骨細胞周囲環境におけるVI型コラーゲンの分布について
Author	堀川, 治
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.34-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041202-0034

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって 保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment: study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes

(ヒト関節軟骨由来chondronおよび培養軟骨細胞を用いた軟骨細胞周囲環境 におけるVI型コラーゲンの分布について)

# 堀 川 治

## 内容の要旨

軟骨細胞はその周囲に存在するpericellular microenvironment (PCME) と共にchondronと呼ばれる単位を形成し、また関節軟骨を構成するコラーゲン中、割合が 1%程度のVI型コラーゲンはこのPCMEに特異的に存在している。これまで、ヒト関節軟骨を用いて chondronにおける<math>VI型コラーゲンについて報告したものは非常に少ない。本研究ではヒト関節軟骨を用い、OAの病期進行に伴う chondronのPCMEにおけるVI型コラーゲンの分布を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) によって立体的に観察した。またinterleukin-I $\beta$  (IL-I $\beta$ )、transforming growth factor  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1) をヒト培養軟骨細胞に添加し、細胞周囲のVI型コラーゲン蓄積に対する影響についても検討した。

法医、病理解剖時に若年者の膝関節からヒト正常関節軟骨を、そ して膝関節OA患者に対する人工膝関節置換術時にヒトOA関節軟骨 を採取し、低速ホモゲネート法によりchondronを抽出した。同時に 作製した軟骨のパラフィン切片をsafranin-O染色し、Mankin scoreに よる軟骨の変性度で3群に分類した(正常群=Normal群、軽度変性 群=Slight群、中等皮変性群=Moderate群)。生存の軟骨細胞を標識 するためCell Tracker Green fluoroprobe (CMFDA) を添加した。これ らのchondronに抗ヒトVI型コラーゲン抗体による免疫染色を行い、 VI型コラーゲンを含むPCME、及び軟骨細胞の体積をCLSMを用いて 測定した。また正常ヒト関節軟骨を酵素処理して得られた軟骨細胞 をagarose gel内で三次元培袋し、IL-1βおよびTGF-β1を添加して、新 たに増加したVI型コラーゲンの体積をchondronと同様に免疫染色し た後にCLSMで測定した。その結果、VI型コラーゲンはPCMEに一致 して特異的に局在し、PCMEと軟骨細胞との体積比 (P/C ratio) では Moderate群は他群と比較して有意に大きい値を示していた。培養軟 骨細胞の周囲にはVI型コラーゲンが蓄積され、TGF-β1添加群ではVI 型コラーゲンの範囲が拡大し、IL-IB群では逆に縮小していた。

本研究により、軟骨変性が軽度から中等度に進むにしたがい PCMEの体積は増加し、この増加がchondronにおいてOAの進行に従い増加する化学的なストレスに対応している可能性が考えられた。 OA軟骨chondronで認められたPCMEの分布範囲の拡大には、基質合成抑制に働くIL-1βに比べ、基質合成促進に作用するTGF-β1がより強く関与しており、またVI型コラーゲンはOA病期で亢進している matrix metalloproteinasesによる影響を受けにくいことから、軟骨細胞の防御に効果的に働いているものと推測される。

#### 論文審査の要旨

軟骨細胞はその周囲に存在するpericellular microenvironment (PCME) と共にchondronという単位を形成し、VI型コラーゲンはこの PCMEに特異的に存在している。これまで、ヒト関節軟骨を用いての chondronにおけるVI型コラーゲンの報告は非常に少ない。本研究では ヒト関節軟骨を用い、OAの病期進行に伴うchondronのPCMEにおける VI型コラーゲンの分布を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) によって立 体的に観察した。またinterleukin-1β (IL-1β)、transforming growth factor β-I(TGF-βI)をヒト培養軟骨細胞に添加し、細胞周囲のVI型コラー ゲン蓄積に対する影響についても検討した。ヒト正常関節軟骨及びヒ トOA関節軟骨より、chondronを抽出した。作製した軟骨のパラフィン 切片をsafranin-O染色し、Mankin scoreによる軟骨の変性度で3群に分 類した(正常群、軽度変性群、中等度変性群)。これらのchondronに 抗ヒトVI型コラーゲン抗体による免疫染色を行い、PCME、及び軟骨 細胞の体積をCLSMで測定した。また軟骨細胞を三次元培養し、IL-Iβ およびTGF-β1を添加後、増加したVI型コラーゲン体積をchondronと同 様に免疫染色した後CLSMで測定した。その結果、PCMEと軟骨細胞と の体積比では中等度変性群は他群より有意に大きく、培養軟骨細胞周 囲に蓄積したVI型コラーゲンは、TGF-β1添加群ではその範囲が拡大 し、IL-1β群では縮小していた。これらから、軟骨変性の進行による PCMEの体積増加は、OAの進行に従い増加する化学的なストレスに 対応しており、この体積増加には、IL-Iβに比べTGF-βIがより強く関与 していると考えられた。

審査では、軟骨細胞の培養をOA軟骨で行ったのかとの質問がなされた。それに対して正常及びOA軟骨細胞でVI型コラーゲンの蓄積に差はなかったとの回答がなされた。またchondronの検討で高度軟骨変性群でのVI型コラーゲンの分布状態はどうであったかとの質問がなされた。それに対して、高度変性群では残存軟骨が少なくchondronの抽出が困難であったこと、machanicalな抽出方法によりchondron自体が破壊されたことから分析は困難であったとの回答がなされた。また、OAに典型的な形態のcluster formationに関しても解析していくべきとの助言がなされた。さらに、より生体に近いchondronを培養系に供し、cytokine、growth factorの添加実験を今後是非行っていくべきとの助言もなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、 軟骨chondronにおけるVI型コラーゲンの分布をCLSMによって三次元 的に解析し、また軟骨細胞のVI型コラーゲン合成とcytokine、growth factorとの相互関係を分析した点が、OA病態解明に向けて有意義な研 究であると評価された。

論文審查担当者 主查 整形外科学 戸山 芳昭

病理学 岡田 保典 発生・分化生物学 須田 年生

病理学 坂元 卒宇

学力確認担当者:北島 政樹、岡田 保典

審查委員長: 岡田 保典

試問日: 平成16年 6月30日