

Title	Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment : 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 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-1 β (IL-1 β)、transforming growth factor β -1 (TGF- β 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、中等度変性群 = Moderate 群)。生存の軟骨細胞を標識するため Cell Tracker Green fluorochrome (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 内で三次元培養し、IL-1 β および TGF- β 1 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- β 1 添加群では VI 型コラーゲンの範囲が拡大し、IL-1 β 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-1 β に比べ、基質合成促進に作用する TGF- β 1 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-1 β (IL-1 β)、transforming growth factor β -1 (TGF- β 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。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-1 β および TGF- β 1 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- β 1 添加群ではその範囲が拡大し、IL-1 β 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ストレスに対応しており、この体積増加には、IL-1 β に比べ TGF- β 1 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、mechanical 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 の添加実験を今後は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。

論文審査担当者 主査 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 亨宇
学力確認担当者: 北島 政樹、岡田 保典
審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成16年 6月30日