慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Intermittent Compressive Strain May Reduce Aggrecanase Expression in Cartilage : A Study of Chondrocytes in Agarose Gel
Sub Title	間歇的圧縮負荷は軟骨のアグリカナーゼを抑制する可能性がある： アガロースゲル培養下軟骨細胞の研究
Author	三尾, 健介
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.3 (2007. 9) ,p.8-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070901-0008

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.

Intermittent Compressive Strain May Reduce Aggrecanase Expression in Cartilage
- A Study of Chondrocytes in Agarose Gel -
（間歇的圧縮負荷は軟骨のアグリカナーゼを抑制する可能性がある
ーアガロースゲル培養下軟骨細胞の研究ー）

三　尾　　健　介

内容の要旨

機械的負荷は関節軟骨の恒常性維持に重要な因子であることが知られている。間歇的圧縮負荷が軟骨代謝に重要な役割を持つという報告もあるが、正確なメカニズムは未だ明らかではない。また、アガロース培養下軟骨細胞を用いての間歇的圧縮負荷における軟骨破壊に関する研究はきわめて少ない。本研究の目的は、破壊因子であるインターロイキン-1ベータ（IL-1β）存在下で軟骨細胞に対する間歇的圧縮負荷の影響を解明することである。

実験ではウシの足趾関節軟骨より軟骨細胞を採取し、アガロースゲルに包埋培養した。IL-1β添加群および無添加群に分け、自家考案による圧縮負荷装置にて15%の圧縮負荷を間歇的に1 Hzの頻度で加えた。圧縮負荷24時間後にtotal RNAを抽出し、real-time PCRにてアグリカン、Ⅱ型コラーゲン、アグリカナーゼ-1、アグリカナーゼ-2、MMP-3のmRNA発現量を半定量した。また、負荷2、5、10日後にはジメチルメチレンブルーを用いた吸光測定にてグリコサミノグリカンを定量した。さらに、負荷2週間後にパラフィン切片をトルイジンブルーOで染色し、光学顕微鏡にて細胞周囲の軟骨基質を観察した。

本実験結果では、まずIL-1β添加群は無添加群に比して軟骨合成因子であるアグリカンやⅡ型コラーゲンのmRNAレベルを低下させ、破壊因子であるアグリカナーゼ-1、アグリカナーゼ-2やMMP-3のmRNAレベルを増加させた。間歇的圧縮負荷はIL-1β無添加群ではアグリカンやⅡ型コラーゲンのmRNAレベルを増加させた。一方、IL-1β添加群では負荷を加えない群に比してアグリカナーゼ-1とアグリカナーゼ-2のmRNAレベルを低下させた。この結果は間歇的圧縮負荷が軟骨破壊酵素として知られるアグリカナーゼ-1とアグリカナーゼ-2を抑制することによって、軟骨を保護する可能性があることを示唆している。グリコサミノグリカン定量や組織学的観察では、IL-1β添加群では負荷の影響は明らかではなかったが、IL-1β無添加群において間歇的圧縮負荷によるグリコサミノグリカン量の増加と細胞周囲の濃染色が観察されプロテオグリカンの増加が示唆された。

これらの実験結果は、間歇的圧縮負荷がIL-1β添加群も無添加群も遺伝子発現レベルにおいて軟骨破壊を抑制し合成を促進する可能性を示唆している。さらに、間歇的圧縮負荷はアグリカナーゼ-1とアグリカナーゼ-2を抑制することによってIL-1βの破壊的要素を制御する可能性があることが示唆された。

論文審査の要旨

機械的負荷は関節軟骨の恒常性維持に重要であると知られるが、そのメカニズムは明らかではない。三次元培養軟骨細胞を用いての間歇的圧縮負荷における軟骨破壊に関する研究は少ない。そこで本研究では、ウシの足趾関節軟骨細胞をアガロースゲルに包埋培養し、インターロイキン-1ベータ（IL-1β）を添加し、15%の圧縮負荷を1 Hzの頻度で加えてその影響を検討した。負荷24時間後にtotal RNAを抽出し、real-time PCRにてmRNA発現量を半定量した。IL-1β無添加群では間歇的圧縮負荷はアグリカンやⅡ型コラーゲンのmRNAレベルを増加させ、軟骨合成因子を刺激することを示唆した。IL-1βは強力な破壊因子であり、アグリカンやⅡ型コラーゲンのmRNAレベルを低下させ、破壊因子であるアグリカナーゼ-1、アグリカナーゼ-2や MMP-3のmRNAレベルを増加させた。IL-1β添加群で間歇的圧縮負荷はアグリカナーゼ-1とアグリカナーゼ-2のmRNAレベルを低下させた。この結果は間歇的圧縮負荷がアグリカナーゼ-1とアグリカナーゼ-2を抑制することによって、軟骨を保護する可能性を示唆した。

審査では、まず実験での機械的負荷の設定について質問がなされた。歩行をイメージした生理的な圧縮負荷となるように設定したと回答された。さらに、圧縮負荷による細胞に対する圧負荷の変化、及びその影響について質問された。本実験の設定では圧縮負荷によって細胞に加わる圧は生理的な圧より低く、変形による影響が主であると回答された。次に、三次元培養を実験に用いた理由について質問がなされた。アガロースゲル包埋培養による三次元培養では軟骨細胞が球形を保ち形質保持をすること、また、圧縮負荷を加える事も可能であること、さらに複雑な軟骨細胞と軟骨基質間の相互影響を除外して細胞そのものの変化を調べることが出来ること、などの利点があるためと回答された。また、変形性関節症や関節リウマチの病的軟骨に対する間歇的圧縮負荷の影響に対して質問がなされた。間歇的圧縮負荷はIL-1β存在下にアグリカナーゼのmRNAレベルを抑制しており、軟骨保護に役立つ可能性があると回答された。最後に、間歇的圧縮負荷が実際にアグリカナーゼの働きを抑制しているかどうかの証拠が乏しい事の指摘がなされた。アグリカナーゼのプロテインレベルや活性レベルの検討、および、アグリカナーゼによるアグリカンの分解産物の検討などを行い、因果関係を正確に調べる事が今後の課題であると回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、間歇的圧縮負荷が軟骨破壊因子であるアグリカナーゼ-1とアグリカナーゼ-2のmRNAレベルを抑制することによって、軟骨を保護する可能性を示唆した点で有意義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　リハビリテーション医学　里宇　明元
形成外科学　中島　龍夫
学力確認担当者：
　　審査委員長：岡田　保典

試問日：平成19年3月5日