

論文内容の要旨

高分子ヒアルロン酸 (HA) による軟骨保護作用のメカニズムの解明

(原田真理, 宇月美和, 石黒直樹, 岩館克治, 澤井高志)

(臨床リウマチ 27 巻, 1 号 平成 27 年 3 月掲載)

I. 研究目的

ヒト変形性関節症 (OA) の関節注入治療に用いられる薬剤には, 強い抗炎症効果を示す副腎皮質ステロイドと, 関節の摩耗を防ぎ表面を潤滑する HA がある. 前者は滑膜炎が高度で多量の関節液貯留がある場合などに効果があり, 即効性がある反面, *in vitro* の研究では, aggrecan の合成抑制作用や滑膜細胞による HA の合成抑制作用があることが報告されており, 頻回投与による軟骨変性の加速が懸念されている. 一方 HA は, 効果発現までにある程度の時間を要するが, 関節液の粘弾性を回復させる効果がある. 長期投与後でステロイドと比較すると, HA が優れているとの報告もあるが, その機序は必ずしも明らかではない. OA 患者の軟骨組織に対する HA 製剤の影響を検討するために, ウサギ OA モデルの膝関節腔に, 2 種類の高分子 HA を反復投与し, その関節組織を用いて, HA による軟骨基質の保護効果, 軟骨変性の度合い, さらにリモデリングの可能性を組織学的に評価した.

II. 研究対象ならび方法

OA モデルはウサギで石黒らの方法に従い, 14~15 週齢の Kb1 : JW (SPF) 系ウサギ (オス) の左膝関節の外側側副靭帯および半月板の部分切除を行って, OA モデルを作製した.

検討対象とした HA 製剤は平均分子量 270 万 Da の HA 製剤 SUVENYL[®] (SVE) と鶏冠由来の HA を架橋化して混合した分子量 600 万 Da の Synvisc[®] (SYN) である. 対照として生食を用いた.

これらの製剤を反復投与し, 手術・投与開始から 25 日後の左側膝関節の大腿骨と脛骨を採取してホルマリン固定し, パラフィン切片を作製して種々の組織学的検討を行った.

軟骨に与える影響の評価項目は, ① 軟骨のプロテオグリカン, HA, Type II collagen など保全状態を反映する基質成分, ② aggrecan 分解産物や軟骨細胞のアポトーシスなど軟骨組織, 細胞の変性, 分解過程を反映する因子, ③ Ki67, HAS2, HAS3 など軟骨の再生, 合成を反映する因子である. 基質成分, aggrecan 分解産物および Ki67 の検出は免疫組織化学を用いて, アポトーシス細胞は TUNEL 染色法を, HAS2 と HAS3 の検出には *in situ* hybridization を用いた.

免疫組織化学の結果は, 画像処理ソフト Photoshop CS6 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) を用いて一定面積の染色強度を数値化して評価した. 陽性細胞が検出されるアポトーシス細胞, Ki67, HAS2 および HAS3 の mRNA は陽性細胞と軟骨細胞総数から陽性率を算出した.

III. 研究結果

OA の傷害度を OA cartilage histopathology grade assessment-grading methodology に基づいて分類した Grade は、大腿骨では、対照群 4.69 ± 0.25 、SVE 投与群 4.35 ± 0.43 、SYN 投与群 4.38 ± 0.30 であり、HA 投与群が対照群に対して有意に低値であった ($p < 0.05$)。脛骨では同順に 4.81 ± 0.25 、 4.69 ± 0.25 、 4.77 ± 0.26 であった。大腿骨では、対照群と比較して HA 投与群のプロテオグリカン、Type II collagen、HA の残量が多かった。アポトーシス細胞の陽性率、aggrecan の分解物は低下傾向を示した。また Ki67 陽性細胞数や HAS2 や 3 の mRNA 発現量は増加していた。脛骨についても大腿骨と同様の傾向を示したが、3 群間の差は小さかった。

OA モデルの傷害部のダメージが大きく、軟骨細胞自体の数が少なかった。脛骨では HA 投与群と対照群の各評価項目の差が小さかったが、大腿骨では対照群に比べ投与群の傷害度が軽減した結果であった。

IV. 結 語

HA 製剤は、基質の保護作用を有し、軟骨の傷害を示すパラメータを抑える一方、再生を示すパラメータを上昇させており、OA 軟骨に対する有効な影響をもたらしている可能性が組織学的にも示唆された。HA 製剤投与群では、有意差を認める効果は少ないものの、軽微な効果を示すことが実験的に証明された。個体間差もあり、症例数も限られていることから更なる比較検討が必要である。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 古山 和道 (生化学講座分子医化学分野)
副査 教授 土井田 稔 (整形外科学講座)
副査 講師 及川 浩樹 (病理学講座機能病態学分野)

高分子ヒアルロン酸(HA)は変形性関節症などの治療薬として広く用いられているが、その作用機序については不明な点が多い。本研究論文では、ウサギの変形性関節症モデルの膝関節腔内にHAを直接投与し、その効果を主に病理組織学的に検討した。その結果、HAの投与により①関節軟骨のプロテオグリカン、タイプIIコラーゲン、HAの残量が増加する事から関節内の軟骨組織全体に対する保護作用がある、②大腿骨の軟骨のアポトーシス細胞の減少やアグリカン分解産物の低下が認められた事から関節軟骨の変性を抑制する作用がある、③軟骨細胞におけるHA合性能を亢進させることから変形軟骨のリモデリング効果がある、ことなどを明らかにした。

本論文は変形性関節症などにおけるHAの作用機序を主に病理組織学的手法を用いて様々な面から明らかにしたものであり、学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

薬剤の投与回数、実験データの取得方法、投与したHAが軟骨細胞のHA合性能を亢進させる仕組み、関節液内のHA分泌機序などについて試問を行ない、それぞれについて適切な解答を得た。学位に値する学識を有している。

参考論文

- 1) 検査 病理組織検査 軟骨・骨破壊 (宇月美和 他4人と共著)
臨床リウマチ, 第27巻, 1号(2014): p280-285.
- 2) Usefulness and accuracy of the international normalized ratio and activity percent of prothrombin time in patients with liver disease (肝疾患患者におけるプロトロンビン時間のINRおよび活性%の精度と有用性) (滝川康裕 他3人と共著)
Hepatology Research, 第44巻, 1号(2014): p92-102.
- 3) Xa阻害活性測定による合成Xa阻害剤モニタリングの試み (小野寺智洋 他5名と共著)
東日本整形災害学会誌, 第23巻, 2号(2011): p258-262.