

## 論文の内容の要旨

論文題目：機械的刺激に対する関節周囲軟部組織の応答特性と  
その生物学的適応

Response properties and the biological adaptation of the periarticular  
connective tissues to various mechanical stresses

身体運動科学

李 佐知子

### 要旨

加齢による身体機能の低下には、筋力低下や関節機能の低下から生じる移動能力の低下が大きな問題として注目されることが多い。関節機能は加齢によって低下することが先行研究によって報告されており、特に変形性関節症の罹患率が高齢者で高い。この主な原因として様々な原因が考えられているが、加齢や体重増加、下肢のアライメントのずれなどが発症に相関があると報告されており、過度な関節使用に伴う疼痛などから生じる関節劣化が変形性関節症の原因の一つになりうると考えられる。主な変形性関節症の罹患関節である膝関節は、荷重関節であり、歩行に伴う日常的な荷重や関節運動といった機械的刺激にさらされているが、このような機械的刺激に対する関節組織の応答特性や適応特性はほとんど知られていない。特に関節を取り囲む線維性結合組織である膝関節周囲軟部組織の研究はほとんど行われていないのが現状である。その関節周囲軟部組織は、関節の過度な動きを制限し脱臼を防ぎ、安定した関節運動を導く役割があり、関節機能において重要な組織である。そこで関節周囲軟部組織に対して、機械的刺激を加えることによって関節に対する応答特性や適応特性を明らかにすることを本研究の目的とした。

これまで我々は、骨格筋の適応機構の解明にストレスタンパク質 (Heat shock proteins: HSPs, ex  $\alpha$ B-crystallin, HSP27, HSP47) を用いて研究がなされてきている。そこで本研究では最初に、細胞の力学的応答機構である細胞骨格やその関連適応分子マーカーである HSPs を分子マーカーとして、関節への様々な機械的刺激に対する応答を評価できるかどうかを明らかにすることを試みた (第 2 章)。後肢懸垂モデル (非荷重刺激)、過重力モデル (過荷重刺激)、関節固定モデル (関節不動化刺激)、トレッドミル走モデル (関節運動刺激) の 4 つのモデルを用いて、関節周囲軟部組織に存在する細胞の刺激に対する応答を HSPs 発現変化により調べた。HSPs はタンパク質のシャペロンとして作用し、タンパク質の folding やタンパク質変性後の re-folding に関与している。また変性し凝集したタンパク質の分解系へと誘導するといった役目がある。HSP27 は細胞骨格の中でもアクチンフィラメントのシャペロンとしての役割をもち、アクチンフィラメントの安定化に作

用している。また HSP47 は、コラーゲンタンパク質合成には必須の特異的分子シャペロンである。後肢懸垂モデルと過重力モデルではコントロール群との比較において、モデル動物の体重の減少が顕著に生じ、さらに機械的刺激（7日間）実験後の体重はコントロール群では通常有意に増加するが、刺激群では身体ストレスの影響があるためか増加しなかった。一方関節不動化モデルやトレッドミル走行では実験前後で有意な体重減少は見られなかった。HSP27 と HSP47 の発現比較では、過重力刺激で HSP27 の発現が刺激群で有意に増加し、関節不動化刺激で HSP27 と HSP47 とともに刺激群で有意な発現低下が確認された。その他の刺激では HSPs の発現変化は見られなかった。これらの結果から、骨格筋の可塑性の研究と同様に、「不使用」による変化に対して HSP27 と HSP47 の応答が見られた。しかし、骨格筋と違い、関節の細胞数は少なく、これらの分子シャペロンをそのまま分子マーカーとして研究する方法では、関節の適応に関する分子シャペロンのターゲット分子を追跡研究することは無理であると判断し、関節を構成する細胞外基質（Extracellular Matrix: ECM）それ自身を研究する方法に変更することにした。

その一つの研究モデルとしては「関節の不使用モデル」として、膝関節の不動化モデルを採用した(第3章)。この研究モデルでは、適応自体がどのような時間経過で起こるかについて詳細に検討した結果、ECM自体の機械的刺激への応答(この場合は不適応応答)や、不動化した組織で起こる不可逆的な化学反応、そして関節の可塑性に動的に関わる細胞応答を間接的に明らかにした。膝関節不動化モデルでは組織硬性の増加などの組織特性の変化の発生メカニズムの詳細は分かっていない。9週間の関節不動化を行うと、関節周囲軟部組織の組織水分量は4~6%減少し、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸の含有量が30%も減少したと報告されている。組織硬性の増加にコラーゲン線維間に生ずる還元性架橋の増加が関与するとの報告もあるが、還元性架橋は加齢とともに減少することが知られており、組織硬性が加齢に伴って増すことから、還元性架橋の他にも組織硬性の増加に関与する架橋が存在するのではないかと推測した。糖化最終産物である Advanced glycation end products: AGEsの中には架橋構造をもつものもあり、AGEsの蓄積によって組織の硬性が増加することが知られている。本実験では、16週間という長期間の関節不動化刺激を行い、経時的な関節可動域の変化や組織構造の変化、さらに関節拘縮によって生じる組織硬性の増加、AGEsの蓄積の関与や組織変性が細胞の生存に影響を及ぼすか、検討した。AGEsの中でも、架橋構造をもち広く研究されているペントシジンの免疫組織化学染色を行った。関節不動化2週以降から関節可動域制限が生じ、組織形態変化としてコラーゲン線維の配向性の乱れが有意に生じていた。さらに関節不動化後8、16週でペントシジンの染色面積の有意な ( $p<0.05$ ) 増加が見られ、不動化後16週で細胞数の有意な減少も観察された ( $p<0.05$ )。関節不動化初期から、組織の形態変化がみられ、その次にAGEs蓄積増加が関節可動性の制限に影響を与えていること、最後に細胞数が有意に減少していた。これらの結果から、関節運動刺激は組織特性の維持、および細胞環境の維持に重要であることがわかった。

「関節の使用モデル」としては、中強度の走行を採用した(第4章)。速度の違いによって生体内適応応答に違いがあり、中強度な走行では抗酸化作用や脳への保護作用があるが、高強度走行ではそのような効果はみられないことが知られている。このことから、本実験においても中強度な走行モデルを用い、一過性の刺激が及ぼす目的遺伝子の mRNA 発現変化を解析した。一過性のトレッドミル走行によって、関節周囲軟部組織の細胞への影響を ECM 成分（ヒアルロン酸合成酵素 HAS1-3、ヒアルロン酸分解酵素 Hyal1-3、パーシカンコアタンパク質 PG-M、プロテオグリカン分解酵素 MMP3）、および急性刺激に対する HSPs の応答解析の

ために HSP27、HSP47mRNA の発現変化を real time RT-PCR 法によって解析した。また組織特性に大きな影響を与える組織水分量や、水分保持能の高い組織ヒアルロン酸量を測定した。繰り返しうける走行刺激によって HSP27 の mRNA 発現は、走行 1 時間後に有意ではないものの約 30%増加し、走行刺激に対して非常に早い応答を示した。機械的刺激が生じた細胞はアクチンフィラメントのダイナミクスが生じ、アクチンのシャペロンとして知られている HSP27 発現を増加させるシグナルになったのではないかと考えられた。さらに HAS1 および PG-M がトレッドミル走行 6、12 時間後有意に増加しており、関節運動刺激によってヒアルロン酸や水分保持能の高いプロテオグリカンの合成が誘導されたと考えられた。実際に、トレッドミル 24 時間後以降、組織水分量やヒアルロン酸量が有意に増加していた。つまり走行という反復した機械的刺激が、関節の組織特性維持に重要な水を結合する ECM 分子の発現に働きかける重要な刺激になっており、関節の柔軟性のバックグラウンドを構成している可能性が示唆された。また機械的刺激によって ECM 組成の変化が生じ、細胞を取り巻く ECM の環境が変化したと考えられた。この機械的刺激に対する ECM 関連分子の発現メカニズムは、細胞表面に存在する **Mechanotransduction** を介して伝えられていると考えられる。その **Mechanotransduction** の一つにインテグリンを介したシグナル伝達があり、インテグリンが細胞内のアクチンと間接的に連結し、細胞外からの機械的刺激を伝達すると考えられている。その他にも様々な機械的刺激を伝達するシグナル伝達系が存在し、細胞に伝えていると考えられる。

ECM には、大きく分けて 2 種類ある。即ち、伸張ストレスに抗する線維性コラーゲンと圧迫ストレスなどに抗する含水性の高いプロテオグリカンやヒアルロン酸がある。関節周囲軟部組織もこの 2 種類の作用をもつ ECM の組成変化は、組織特性に大きく影響を与える。つまり組織水分量の低下から、組織の硬性が増すなどが報告されている。このことから ECM 成分の発現は、組織の恒常性を維持するために必須と考えられる。加齢や拘縮に伴い組織水分量の減少が生じることから、一過性の関節運動刺激により組織水分量やヒアルロン酸量の増加は、組織特性維持に効果的に作用する可能性が示された。これらの研究結果を総括すると、運動の力伝達に必要な関節の周囲軟部組織に対する研究方法を導きだし、かつその適応を評価するための系について、おおまかに提起することができたと考える。このような様々な要因については、総括論議として第 5 章で議論を加えた(第 5 章)。