

# 東洋大学審査学位論文

発育期ラットの脛骨粗面の構造に及ぼ  
す種々の物理刺激の影響に関する研究  
—Osgood-Schlatter 病の  
機序解明と予防法の検討—

ライフデザイン学研究科

ヒューマンライフ学専攻博士後期課程

4A40210001 水藤飛来

・目次

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 第 1 章 | 序論  | 1   |
| 本論    |   |     |
| 第 2 章 | ラット脛骨粗面の石灰化と骨化には ENPP1 の<br>下方制御と FGF23 の上方制御が関与する        | 6   |
| 第 3 章 | 脛骨粗面の形成には Chondromodulin-1 の発現衰退が関連する<br>—深層軟骨組織の構造に着目して— | 27  |
| 第 4 章 | 下り走運動はラット脛骨粗面にオスグッド病を発症させる                                | 36  |
| 第 5 章 | ラット脛骨粗面の石灰化に及ぼす荷重軽減の影響                                    | 59  |
| 第 6 章 | ラットにおける大腿四頭筋の求心性収縮は脛骨粗面の石灰化を<br>促進する                      | 88  |
| 第 7 章 | ベクトルポテンシャルは関節軟骨の石灰化を抑制し、<br>軟骨細胞の増殖を促す                    | 105 |
| 第 8 章 | 結論  | 131 |

## 第1章 序論

### 第1節 学術的背景

脛骨粗面に発生するスポーツ障害として、**Osgood-Schlatter** 病（以下、オスグッド病）が広く知られている 1, 2)。脛骨粗面には膝関節の強大な伸展筋である大腿四頭筋が停止し、同筋は脛骨粗面を強く牽引する。また、脛骨粗面は下肢骨である脛骨の近位前方に位置し、その特徴的な構造から「舌状骨端」と称されることもしばしばである 1, 2)。現代の若年者における運動量は、昔に比べて低いという報告があり 3)、また、この障害は、スポーツ活動を行わなくても発症することから、発育障害としても認識されている。

前述の如く、オスグッド病は男児に多く発生すると報告されてきたが、近年における比較的若い女性アスリートの増加に伴い、オスグッド病の発症率には有意な差がないのではないかと推測されている。この要因として、近年におけるテレビゲームの普及により思春期児童の活動性が低下していることが考えられている 3)。しかしながら、オスグッド病の発症率には有意な差がなくとも、発症年齢は男女の間に違いが認められており、女兒は 8 から 13 歳、男児は 12 から 15 歳に多発する 4, 5)。また、オスグッド病は運動を盛んに行う児童の約 20% に発症するが、同年代の運動をしない児童の約 5% にも認められる 6)。

このように、オスグッド病は発育促進に有効な運動を行った場合や、それを行わなくても脛骨粗面付近に強い痛みを生じて、日常的な活動が制限される。発育期の児童において、その活動制限は活発な成長に悪影響をもたらす可能性があることから、このオスグッド病の発症機序を明らかにするとともに、その予防法にまで検討することは意義あるものと思われる。

### 第2節 脛骨粗面について

脛骨粗面は膝蓋靭帯の線維が埋入されており、それは大腿四頭筋から構成されている。しかしその線維は脛骨粗面の一部にのみ埋入されている。発育期の脛骨粗面は膝蓋靭帯の線維が埋入されている表層と、硝子軟骨で構成された深層に分類される 7)。表層に埋入されている線維は発育に伴い石灰化度が高まるが、深層の硝子軟骨は発育期以降、順次骨組織に置換される。現在までに、このような組織学的な所見が得られているが、その詳細なメカニズムに触れた研究は未だ報告されていない

### 第3節 オスグッド病の病態（の概要）

硬組織に筋腱線維が埋入する部位は「**Enthesis**」と呼ばれており 8)、その部位に発生するスポーツ障害を「**Enthesopathy**」と称されている 9)。脛骨粗面にも大腿四頭筋の線維が埋入していることから、オスグッド病は **Enthesopathy** のひと

つであるとして考えられている。

Ehrenborg と Largergren は、ヒト脛骨粗面の X 線画像を用いてオスグッド病の病態を、Cartilaginous (0 から 11 歳)、Apophyseal (11 から 14)、Epiphyseal (14 から 18 歳)、Bony (18 歳以降) の 4 つの段階に分類している。臨床現場におけるほとんどの症例は Apophyseal stage であるされている (10)。この理由は、Apophyseal stage では脛骨の二次骨化中心と脛骨粗面内の骨端核の石灰化状態が一体化せず、それらの間に軟骨が介在している。そのためこの stage では、膝蓋靱帯を介する大腿四頭筋からの牽引力は、脛骨粗面の骨端核のみを強く牽引し、これがオスグッド病を誘発する一つの要因として考えられる (11)。

このように、X 線解析によって脛骨粗面の構造が明らかにされてきたが、組織学的な手法による詳細な解析がなされていないため、オスグッド病の病態は完全に解明されていない。

オスグッド病は前述のごとく、スポーツ障害であり (11)、特に男児に多い。その症状は脛骨粗面が前方に隆起するだけでなく、その部位に強烈な炎症や疼痛が出現する (12)。一方、オスグッド病は発育障害という一面があることから、その症状は骨格の成熟とともに自然に治癒すると考えられているが (13)、完全に運動が再開できるまでに約 10 か月もの長期間を要することもある (6)。

一般的に、オスグッド病は運動活動を活発に行う児童で多発し、オスグッド病患者の 30% は両側に症状が出現する (14)。加えて、オスグッド病は、バスケットボールやバレーボール、サッカーのような着地時の大腿四頭筋の遠心性収縮によって発生することが報告されており (5)、オスグッド病の患者は症状が緩和するまで運動活動を制限することによって症状の改善を図る (13)。しかしながら、オスグッド病の治療期間は長期に及ぶことも少なくないため、発育期の旺盛な運動能力の発達や骨格形成を阻害することが危惧される。

#### 第 4 節 症状

前述に示したように、オスグッド病の主な症状は脛骨粗面の隆起、炎症、疼痛であるがそのほかにも、脛骨粗面局所の圧痛 (15) や腫脹 (16) などが認められている。また、オスグッド病の発症には激しい運動活動が関連するが、大腿四頭筋や大腿二頭筋の過度な筋緊張もまた発症要因のひとつとして報告されている (17)。先行研究によると、オスグッド病の治療を受けていない患者の多くは、正座姿勢のような膝を床に接着させる動作において疼痛などの不快感を訴えることが報告されており (5)、オスグッド病の症状は難治性であることを裏付けられている。以上のことから、オスグッド病は成人期にまで症状が継続する危険性があるため、10 代の間に予防することが重要であると考えられる。

#### 第4節 物理および薬理学的なアプローチ

臨床現場においてオスグッド病の治療の約90%は保存療法が選択される18)。オスグッド病の保存療法は、膝関節の運動制限を目的とした運動休止11)、冷却刺激のような物理刺激を用いた治療や19)、Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (非ステロイド性抗炎症薬、NSAIDs) のような薬学的アプローチもしばしば行われる20)。これらの治療に共通した目的は、症状の緩和であり、その中でも疼痛や炎症の軽減させることである。事実、NSAIDsの薬学的な機能はこの中でも、治療の主役を担うのは「運動活動の休止」であり、この治療にアイシングなどを組み合わせることもしばしば見受けられる。Beyzadeogluらはオスグッド病における最終的な達成点として「脛骨粗面に加わるストレスを減らすこと」として報告している21)。しかしながら、オスグッド病患者は保存療法でも改善が見込まれないことがあり、そのような場合や思春期以降の骨格形成が完了した後に発生した場合に限り、観血的な方法によって治療することがある22)。

以前研究ではオスグッド病にはイブプロフェン、ナプロキセン、ケトプロフェン、フルルビプロフェンなどがNSAIDsとして使用が報告されている23, 24)。事実、NSAIDsによる治療成果に関する研究では、261人のうち237人の患者において良好な効果が認められている25)。このように多くの治療法が施行されてきたが、現在までに確立した治療法や予防法は未だ考案されていない。

#### 第6節

これまでの先行研究から、オスグッド病の発症要因やいくつかの治療法が考案されてきたが、オスグッド病の詳細な組織学的な構造を明らかにした研究は未だない。また、その基盤となり得る脛骨粗面の基本的な構造変化のメカニズムも明らかにされていない。以上のことから、本研究の目的は、脛骨粗面の構造変化に関するメカニズムを解明した後、オスグッド病の組織構造を明らかにすることを目的とする。また本研究はそれらの情報を理解した後、オスグッド病の予防法考案に役立てるための基礎研究を行うことを目的とした。

• 引用文献

- 1) Osgood RB. Lesions of the tibial tubercle occurring during adolescence. *Boston Med Surg J* 1903; 148:114–117
- 2) Schlatter C. Verletzungen des schnabelformigen Fortsatzes der oberen Tibiaepiphyse. *Beitr Klin Chir* 1903; 38:874–887
- 3) Valovich McLeod, T.C., Decoster, L.C., Loud, K.J. et al. (2011) National Athletic Trainers' Association position statement: prevention of pediatric overuse injuries. *Journal of Athletic Training*, 46(2), 206–220
- 4) Blankstein J, Cohen I, Heim M, et al. Ultrasonography as a diagnostic modality in Osgood–Schlatter disease: a clinical study and review of the literature. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; 121:536–539
- 5) Flowers MJ, Bhadreshwar DR. Tibial tuberosity excision for symptomatic Osgood–Schlatter disease. *J Pediatr Orthop* 1995; 15:292–297
- 6) Kujala UM, Kvist M, Heinonen O. Osgood–Schlatter's disease in adolescent athletes. Retrospective study of incidence and duration. *Am J Sports Med* 1985; 13:236–241
- 7) Hirai S, Zeng X, et al. Structural changes in attaching sites of tendon of femoral quadriceps muscle in growing rats. *Toyo Univ. Grad. Sch. Bull.* 2021; 57:185-195
- 8) Apostolakos J, Durant TJ, et al. The enthesis: a review of the tendon-to-bone insertion. *Mus. Liga. Ten. J.* 2014; 4:333–342
- 9) Ferreira CR, Ansh AJ, et al. Musculoskeletal comorbidities and quality of life in ENPP1-deficient adults and the response of enthesopathy to enzyme replacement therapy in murine models. *J. Bone Mineral Res.* 2022; 37:494–504
- 10) Ehrenborg G, Lagergren C. Roentgenologic changes in the Osgood–Schlatter lesion. *Acta Chir Scand* 1961; 121:315–327
- 11) Mital MA.: Osgood-Schlatter disease. The painful puzzler, *Phys Sportmed* 1977; 5; 60–73.
- 12) Grimm NL, Weiss JM, et al.: Osteochondritis dissecans of the knee: pathoanatomy, epidemiology, and diagnosis. *Clin Sports Med.* 2014, 33(2):181-188
- 13) Purushottam AG, David MS, et al: Osgood-Schlatter syndrome: Literature Review in *Current Opinion in Pediatrics* 2007; 19: 44-50
- 14) Marx JA, Hockberger RS, Walls RM, Adams J. *Rosen's emergency medicine: concepts and clinical practice.* 5th ed. St Louis, MO: Mosby; 2002.
- 15) Bloom OJ, Mackler L, et al. What is the best treatment for Osgood-schlatter disease? *J. Fam. Prac.* 2004; 53:1-4
- 16) Atanda A, Shah SA, et al. Osteochondrosis -common causes of pain in growing bones. *Am. Fam. Phy.* 2011; 83:285–291

- 17) Witrouw E et al: Intrinsic risk factors for the development of patella tendinitis in an athletic population a toe-year prospective study. *Am J Sports Med*, 2001, 29(2):190-195
- 18) Ross MD, Villard D. Disability levels of college-aged men with a history of Osgood-Schlatter disease. *J Strength Cond Res* 2003; 17:659–663
- 19) Herrero JD, Fernández GN, et al. Enfermedad de Osgood-Schlatter en un adolescente deportista. *Caso Clín Arch Argent Pediatr* 2017; 115:445–448
- 20) Sauraj A, Jarrod Y. Apophysitis and Osteochondrosis: Common Causes of Pain in Growing Bones. *Am. Fam. Phy.* 2019; 99:610–618
- 21) Bezuglov EN, Tikhonova AA, et al. Conservative treatment of Osgood-Schlatter disease among young professional soccer players. *Int. Ortho.* 2020; 44:1737-1743
- 22) Tun HL. Endoscopic Management of Osgood-Schlatter Disease. *Arth. Tech.* 2016; 5:121-125
- 23) Circi E, Atalay Y, et al. Treatment of Osgood-Schlatter disease: Review of the literature. *Musculoskelet. Surg.* 2017; 101:195–200
- 24) Morris E. Acupuncture in Osgood-Schlatter disease. *BMJ Case Rep.* 2016; 8: bcr2015214129
- 25) Hussain A, Hagroo GA. Osgood-Schlatter disease. *Sports Exer Injury* 1996; 2:202–206

## 第2章

### ラット脛骨粗面の石灰化と骨化には ENPP1 のダウンレギュレーションと FGF23 のアップレギュレーションが関与する

#### 要約

発育期の脛骨粗面には表層（膝蓋靭帯の線維が埋入されている）と深層（硝子軟骨で構成されている）が観察されるが、深層は発育期を過ぎると骨組織が形成されるため、観察できない。生体内での石灰化は、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ／ホスホジエステラーゼ-1（ENPP1）によって抑制されるが、Tissue non-specific alkaline phosphatase（TNAP）によって促進されることが知られている。したがって、脛骨粗面は ENPP1 のダウンレギュレーションと TNAP のアップレギュレーションを介して成長すると思われるが、これらのプロセスの理解は未だ得られていない。そこで本研究では、ラット脛骨粗面が発育に伴いどのように構造を変化させ、その背景にある遺伝子発現の変化を解明することを目的とした。wistar 雄性ラットを3群（3週齢、7週齢、13週齢；各8匹）に分けた。3週齢と7週齢では脛骨粗面の表層と深層が明瞭に観察されたが、13週齢のラットでは深層が認められなかった。また、肥大軟骨細胞の軟骨基質は石灰化していた。また、Fibroblast growth factor 23（FGF23）は筋腱埋入部の骨化を促進する。本研究では、FGF23 の遺伝子発現が13Wで急激に増加した。さらに、ENPP1 の発現は3週齢ラットで最も高く、成長とともに減少した。TNAP の遺伝子発現は群間で有意差はなかった。深部部分の面積は3週齢より7週齢において有意に低かった。一般に、未熟な軟骨細胞の細胞外マトリックスは石灰化しない。したがって、脛骨粗面深層の軟骨組織は成長とともに石灰化、骨化すると推測された。また、ENPP1 の発現は成長とともに減少したが、TNAP の発現は変化しなかった。したがって、脛骨粗面は成長とともに石灰化および骨化し、この過程には ENPP1 のダウンレギュレーションと FGF23 のアップレギュレーションが関与していると推測される。オスグッド・シュラッター病は脛骨粗面に発症するスポーツ障害であることから、これらの所見は本病態の解明に役立つと考えられる。

## 背景

脛骨近位骨端には脛骨粗面が存在し、その部位には大腿四頭筋の線維が埋入されている。それゆえ、膝関節の伸展時における大腿四頭筋の収縮は脛骨粗面を上方へ強く牽引する。Ogden と Southwick はヒト発育初期の脛骨粗面はすべて軟骨組織で形成されており、それは加齢とともに骨端部から骨化していくことを報告している (Ogden & Southwick, 1976)。一方で、執筆者はラット脛骨粗面の発育変化を組織学的に明らかにしている (Suito et al., 2021)。その研究では、発育期までの脛骨粗面は膝蓋靭帯の線維が埋入されている“表層”と、硝子軟骨で構成された“深層”の 2 つに分類でき、深層の軟骨組織は発育に伴い石灰化および骨化することを報告している。この構造変化に着目すると、脛骨粗面と骨端板の形成過程は非常に類似していることが推測できる。事実、骨端板は硝子軟骨で構成されており、それは休止層、増殖層、肥大層の大きく 3 つに分類される (Komori, 2018)。中でも、基質の石灰化状態に着目すると、休止層と増殖層の軟骨基質は未石灰化状態であるが、肥大細胞層の基質は石灰化している (Ebisawa et al., 2004; Odgren et al., 2016; Song & Park, 2020)。その後、骨組織は軟骨組織内に血管が侵入することで形成される (Michael, 2021)。すなわち、脛骨粗面の基質は発育に伴い石灰化することが組織学的に理解されていると考えられる。しかしながら、その変化に関連するタンパク質の局在や遺伝子発現は解析されていない。

腱や靭帯は線維芽細胞で形成され (Blitz et al., 2013; Brent et al., 2003)、それらの線維が硬組織内に埋入される部位は“enthesis”と称されている (Apostolakos et al., 2014)。enthesis は組織学的な特徴から“fibrous”と fibrocartilaginous”の 2 つに分類されている。fibrous タイプは骨幹部に認められ、その部位には石灰化したシャープピー線維が埋入されている (Lu & Thomopoulos, 2013)。その一方で、fibrocartilaginous タイプは骨端部に存在し、埋入する前に線維軟骨を介在することが特徴であり、このタイプは fibrous タイプと比べ強い牽引力が生じる部位として知られている。このように enthesis は 2 つのタイプが確認されているが、脛骨粗面がどちらのタイプに当てはまるかについて組織学的に解析した報告は未だない。

Collagen type 2 (Col2) は軟骨細胞周囲の基質に局在し (Hosseini ら, 2013)、それはアグリカンやヒアルロン酸のような無定形基質と結合している。軟骨基質中の無定形基質には機械的刺激を緩衝するために多くの水分が保有されている (Scott & Stockwell, 2006)。また、石灰化軟骨基質には Collagen type 10 (Col10) が局在することが広く知られている (Zhang ら, 2021)。事実、骨端板における肥大細胞層の基質は石灰化しており、そこには Col10 が局在を示される (Ağırdil, 2020)。一方で、硝子軟骨の石灰化は ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) と tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) によって制御されてい

る Anderson ら, 2004; Roberts ら, 2019)。Ciimpean らは、ENPP1 が細胞外に存在する ATP に働き、AMP とピロリン酸に分解することを明らかにしている (Ciimpean ら, 2004)。ピロリン酸はハイドロキシアパタイトの沈着や形成を阻害することが知られており、関節軟骨には ENPP1 が発現されている (Bertrand ら, 2012; Nam ら, 2017)。しかしながら、軟骨組織に炎症が生じた時、ENPP1 は軟骨組織から消失し、その代わりに TNAP が合成される。TNAP はピロリン酸を無機リン酸へと変化させる。無機リン酸はピロリン酸とは対照的にハイドロキシアパタイトの形成や沈着を促進するため、TNAP の過剰発現は生体内の組織の石灰化を促進することが知られている。事実として、軟骨組織の石灰化が促進される変形性関節症では、ENPP1 の合成が低下し、TNAP の合成が上昇することが示されている。事実、ENPP1 の欠乏は生体組織の石灰化を促進することが報告されている (Babij et al., 2009; Zhang et al., 2016)。組織のまた、enthesis における石灰化の促進にも ENPP1 や TNAP の因子が関与しており、線維芽細胞増殖因子 23 (fibroblast growth factor 23, FGF23) は ENPP1 の欠乏によって enthesis 内に発現されることで、局所の石灰化を促進することが示されている (Ferreira ら, 2022; Zhang ら, 2016)。以上のことから、脛骨粗面の形成と石灰化との間には密接な関係性があると思われることに加え、脛骨粗面内のコラーゲンタイプもまた発育に伴い変化すると考えられるが、それらを示した研究は未だない。そこで本研究は、脛骨粗面が発育に伴いどのような構造変化を示すかについて組織学的に明らかにし、その背景にある遺伝子発現を明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

### 1. 動物

本研究では、3 週齢(3W, n=8)、7 週齢(7W, n=8)、13 週齢(13W, n=8)のウィスター系雄性ラット(日本生物材料センター、東京、日本)を使用した。すべてのラットは Specific pathogen-free の状態で搬入された。ラットは 1 ケージ 4 頭まで収容し、水と餌は自由に摂取できる環境において 2 日間飼育した。ラットは炭酸ガス吸引によって安楽死させた後、右脚は遺伝子発現解析(n=3)および GMA 樹脂包埋薄切標本 (086-04385, 富士フイルム, 大阪, 日本)を用いた骨形態計測用標本(n=5)による定量的な評価方法に加え、左脚は非脱灰リゴラック樹脂包埋研磨標本(3801TB12T, 日新 EM, 東京, 日本)と脱灰パラフィン切片(415-25791, 富士フイルム)による定性的な解析を行った。すべての薄切標本は矢状断面で作成し、脛骨粗面の最も突出した部分を観察するため、脛骨の前十字靱帯を指標とし、脛骨中央部を特定した。(No.2021-08)

### 2. 非脱灰リゴラック樹脂研磨標本

脛骨粗面の石灰化状態を組織学的に観察するため、非脱灰標本はリゴラック

樹脂に包埋した。その後、リゴラック包埋標本は砥石を用いて厚さ 100 $\mu$ m にまで薄くし、トルイジンブルーで染色した。

### 3.脱灰パラフィン切片

初めに、脛骨は 8%エチレンジアミン四酢酸(349-0186、DOJINDO、熊本、日本)溶液で 3 週間脱灰した。その後、エタノールで脱水したのち、パラフィンに浸漬および包埋をした。その後、パラフィン包埋は REM-710(Yamato、埼玉、日本)を用いて厚さ 4 $\mu$ m に薄切した。

### 4.免疫組織化学

初めに、パラフィン切片を湿箱内において 37 度で 1 時間加温した後、キシレンを用いて脱パラフィンを行った。次に、標本はヒアルロニダーゼ(18240-36、ナカライテスク、京都、日本)を用いてヒアルロン酸を除去し、軟骨組織のマスキング因子を排除し、3%牛血性アルブミンで 40 分ブロッキングした。その後、200 倍に希釈した collagen type 2(Col2、Ma5-12789、Invitrogen、ウォルサム、アメリカ)と 300 倍に希釈した collagen type 10(Col10、ab150116、abcam、ケンブリッジ、イギリス)を 4°C で一晩反応させた。反応完了後、標本には Alexa Fluor 488(ab150077、アブカム)と Alexa Fluor 594(ab150116、abcam)をそれぞれ 200 倍に希釈し、室温で 40 分反応させた。最後に、4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI、ab1041639、abcam)を用いて核染色を行った。

### 5.定量的リアルタイム PCR

CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて、脛骨粗面における遺伝子発現量を算出した。まず、TRIzol (15596026, Thermo Fisher Scientific, Japan)を用いて脛骨粗面の total RNA を抽出した。この total RNA を iScript gDNA Clear Synthesis kit (172530, Bio-Rad)を用いて cDNA に変換した。その後、TaqMan probe assay (Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA を解析した。ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を採用した。統計解析は、一元配置分散分析、Tukey の検定を行った ( $p > 0.05$ )。本実験では、TaqMan プローブを使用した。

### 6.脛骨粗面の形態計測

GMA 樹脂に包埋した試料を厚さ 6 $\mu$ m にスライスした。その後、スライスした標本をトルイジンブルーで染色した。結果は、Tukey's test あるいは t-test により解析し、有意水準は 5%未満とした ( $p > 0.05$ )。また、本研究における統計処理はすべて SPSS ver. 26 を解析に使用した。

### 7.統計処理

GMA 樹脂に包埋した標本を 6 $\mu$ m の厚さにスライスした。その後、トルイジンブルーで染色した。面積と厚さの測定は WinROOF 7.4.0 (三谷商事、東京、日本)を用いて行った。結果は一元配置分散分析、Tukey の検定または t 検定 ( $p > 0.05$ )を用いて分析した。すべての統計解析には SPSS ver. 26 を用いた (International

Business Machines Co.)。

## 結果

実験動物の週齢、微生物学的状態、体重を ARRIVE チェックリストに従って記録した（表 1）。

### 3.1 脛骨粗面の組織学的特徴

脛骨粗面は軟骨組織の有無により表層と深層に分けられた（図 1）。3W および 7W では、深層に軟骨組織が観察された。しかし、13W では深層が観察されず、代わりに骨組織が置換されていた。さらに、各群の表層は組織学的に線維軟骨部、膝蓋腱部、石灰化部の 3 層が観察された。線維軟骨部は脛骨粗面の上部を石灰化した線維軟骨によって形成されていた。石灰化部は、膝蓋靭帯の線維が石灰化されていた。膝蓋靭帯部は、石灰化部の前方に存在し、石灰化部に埋入されていた線維とは異なり、未石灰化の線維でのみ構成されていた。7W の深層における面積は 3W よりも高い値が示されていた。3W の表層における線維軟骨部は上下的に薄く、前後的に短く観察されたがそれは発育に伴い厚く長く形成されていた。さらに、3W の表層部の面積は 7W よりも低い値が示されていた（図 2a、 $p=0.008$ ）。しかし、3W の深層における面積は、7W よりも有意に高く示されていた（図 2b、 $p=0.009$ ）。加えて、各群間での膝蓋腱部の面積に有意な差は認められなかったが、石灰化部と線維軟骨部の面積、骨膜の厚さは成長とともに増加した（図 2c-f）。これらの結果から、表層の線維軟骨部の面積は唯一発育の影響を受けないことが確認された。次に、各群の表層を形成する 3 部位の割合を比較した。その結果、膝蓋腱部の面積比は発育に伴い減少し、対照的に石灰化部は増加していた（図 3）。

### 3.2 脛骨粗面深層における軟骨細胞の特徴

深層における 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)陽性細胞数は、3W より 7W で多かった（図 4a および 4d）。さらに、3W の深層は Col2 および Col10 が観察された（図 4b および 4c）。しかし、7W では深層は Col2 とは反応せず、Col10 との免疫反応が深層全体で観察された（図 4e および 4f）。

Col2a の遺伝子発現は 3W で最も高く、それは発育とともに減少していた（図 5b）。Col10a の遺伝子発現は 3W で最も高く、発育とともに減少していた（図 5c）。対照的に、Colla の遺伝子発現は 3W で最も低く、発育とともに増加していた（図 5a）。さらに、3W の ENPP1 の遺伝子発現は有意に高いスコアを示したが、7W および 13W の群間に有意な差は認められなかった（図 5d）。また、Alpl（組織非特異的アルカリホスファターゼをコーディングする遺伝子）の発現は、どの群間においても有意な差は認められなかった（図 5e）。最後に FGF23 の遺伝子発現は 3W で最も少なかったが、発育とともに増加し、7W と 13W の間に有意な差が認められた（図 5f）。

## 考察

3W と 7W では、明瞭に表層と深層が観察されていた。対照的に、13W では、深層に軟骨組織が観察できず、代わりに骨組織が形成されていた。一般的に筋腱埋入部の線維軟骨の機能は、その部分に生じる機械的応力を分散させることが知られている (Benjamin ら、2002)。また、Badi の理論によれば、膝蓋靭帯付着部である脛骨粗面には線維軟骨が観察される (Badi, 1972)。一方で筋腱埋入部には、Fibrous タイプと Fibrocartilaginous タイプの 2 つが確認されている。特に後者は石灰化した線維軟骨が特徴である (Ogden & Southwick, 1976; Roffino ら、2021)。また、Fibrocartilaginous タイプは、組織内に埋入された線維が石灰化していることが報告されている (Turcotte ら、2021)。本研究において、脛骨粗面には、線維軟骨や石灰化した埋入線維が認められることから、脛骨粗面は Fibrocartilaginous type に該当すると考えられる。

先行研究によると、筋腱埋入部の成熟には荷重力が不可欠であるという仮説が立てられている (Saito ら、2022)。さらに、Schwartz らは、機械的刺激が骨格組織の成長に起因することを報告している (Schwartz, 2013)。本研究において、線維軟骨の面積は 3W で最も小さく、成長とともに増加していた。また、線維軟骨部の組織学的外観は、3W で薄く短かった。7W の線維軟骨部は 3W より長く観察されたが、厚さはほとんど変化していなかったが、13W の線維軟骨部は成長とともに厚く長くなっていた。これらの所見から、線維軟骨部の形成には、最初に前後的な成長が促された後、上下的な形成が成されると推測される。また、先行研究によると、ヒト思春期の脛骨粗面は脛骨骨端の骨化中心を基盤に形成されることが報告されている (Flowers and Bhadreshwar, 1995)。本研究における 7W の脛骨粗面は石灰化 (表層) と未石灰化部位 (深層) が明瞭に観察されたが、13W では深層が骨化していた。したがって、我々は 7W の脛骨結節が少なくともヒトの青年期の組織学的構造と類似していると推測した。この仮説は、脛骨粗面への機械的刺激が関与するため、これを完全に証明するためには、関節固定や荷重軽減による機械的刺激の低減実験が必要であるが、今回の実験には組み込まれていないため、我々はこの問題点の解明を今後の研究課題としている。

Col2 は軟骨基質中の特異的なコラーゲン線維として合成されている (Eyre, 1991)。特に、Col2 は硝子軟骨 (関節軟骨や成長板など) に存在することが知られている (Alini ら、1992 ; Eyre, 1991)。一方で、変形性関節症の関節軟骨では、Col2 分解後に骨組織を形成するため、従来の軟骨代謝が破綻される。また、骨長軸への成長は、成長板の増殖層における軟骨細胞の増殖によって達成される。しかし、増殖層の軟骨細胞が分化すると、軟骨細胞が肥大化し、その細胞外基質は石灰化する。従って、脛骨結節の成長には分化度の低い軟骨細胞とその基質が未石灰化の状態であることが重要であり、深層は脛骨粗面の重要な成長因子で

あると推測される。さらに、Col10 は成長板の肥大層で局在していることが報告されている (Kwan ら、1989)。肥大化した軟骨細胞は軟骨細胞分化の終末期に存在し、軟骨基質が石灰化する。その後、骨端板の肥大した軟骨細胞は Col1 から合成される骨組織に置換される (Broess ら、1995)。従って、骨端板における軟骨細胞の分化に伴い、骨端板のコラーゲン線維は Col2、Col10、Col1 の順に発現されると考えられる。本研究では、3W の脛骨粗面深層では Col2 が広く局在し、Col10 は深層後方部にのみ免疫反応が認められた。さらに 7W では Col 免疫反応が弱く示されていたが、Col10 は脛骨で広範囲に発現を示した。対照的に、Col2 の免疫反応が低下した一方で、Col10 の局在は後方のみならず前方にまで観察された。さらに遺伝子発現レベルで解析すると、Col2a の発現は 3W で最も高く発育に伴い有意に減少していた。また、Col10a の遺伝子発現レベルは、3W から 7W にかけて有意に低下していたが、7W と 13W の間には有意な差は認められなかった。加えて、Colla の発現は 7W から 13W にかけて急激に増加していた。この研究における免疫染色と遺伝子発現の結果は一致していないと考えられる。我々は、この違いが "タンパク質" と "遺伝子" レベルの特徴に依存していると考えている。免疫染色は今まさに分泌されているコラーゲンの状態を組織学的に反映したものであり、遺伝子発現は今後合成および分泌されるタンパク質の能力を示す。すなわち、脛骨粗面が Col10 を分泌する能力は 7 週齢を過ぎると低下し、代わりに Col1 が分泌されると考えられる。この問題を考える一方で、各タイプの遺伝子発現がどのグループで最も高い値を示したかに注目することも重要である。注目すべきは、Colla と FGF23 の発現レベルが 13W 系ラットで最も高いことであり、これは FGF23 と Colla 遺伝子発現の間に潜在的な関係があることを示している。このことは、FGF23 の発現が Colla の遺伝子発現に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。Col10a と ENPP1 の遺伝子発現は、3W ラットと 7W ラットの間で急激な減少を示したが、7W ラットと 13W ラットの間ではほとんど差が見られなかった。先行研究では、ENPP1 の欠損が関節軟骨における Col10 の発現を増加させることが報告されている (Jin ら、2018) その理由は、解析部位の違いにあるかもしれない。硝子軟骨のみからなる関節軟骨とは異なり、脛骨粗面には硝子軟骨と靱帯および骨組織が複合的に存在しており (Suito ら、2021)、その特徴が他の組織とは異なる結果を導いたと思われる。つまり、脛骨粗面は他の組織とは比較できない唯一無二の人体組織であると考えられる。

脛骨粗面表層の面積は成長とともに増加したが、深層の面積は減少していた。我々の以前の研究では、表層は膝蓋靱帯が埋入されており、深層には軟骨組織が構成されていた (Suito ら、2021)。したがって、表層は膝蓋靱帯に作用する収縮力によって生じ、深層は脛骨粗面の成熟に起因することが推測された。実際、筋

腱埋入部の発達には力学的ストレスが必要である (Schwartz ら、2013 年)。本研究において、表層のうち線維軟骨部の相対値は各群間にほとんど差が見られなかった。しかし、面積の数値のみを比較すると、膝蓋靭帯部は減少し、石灰化部は増加していた。したがって、表層部分の発達には、石灰化部と膝蓋腱部の面積が変動することで成長するが、その相対的な割合は変化しないと考えられる。一方、3W では 7W に比べ、深部の面積が広いことに加え、DAPI 陽性細胞の数が多く観察された。先述したように、Col10 は肥大軟骨細胞の細胞外基質に出現する。一方で、肥大軟骨細胞は増殖能が乏しく、核濃縮 (Huang ら、2019 ; Yilmaz ら、2017) の後にアポトーシス (Aizawa ら、1997 ; Li ら、2021) を引き起こすことが知られている。DAPI は DNA 中のアデニンおよびチミン上の結合部位と特異的に反応し、発光する。DAPI は核が濃縮された細胞には反応しないため、Col10 の陽性部位における軟骨細胞には、DAPI 陽性細胞は観察されなかった。したがって、3W ラットでより多くの DAPI 陽性細胞が観察されたことは、少なくとも活性の低い軟骨細胞が多いことを示している。これらの所見から、深層の役割は、軟骨細胞の増殖を誘導させることによって脛骨粗面を成長させることが考えられる。

本研究で同定された様々な石灰化関連遺伝子は、脛骨粗面のスポーツ関連疾患であるオスグッド・シュラッター病の病態解明に役立つ可能性がある。オスグッド・シュラッター病は、脛骨結節の石灰化の遅れによって引き起こされることが示されたが、その主な機序はまだ不明である (Suito ら、2023)。本研究では、脛骨粗面の石灰化には ENPP1 のダウンレギュレーションと FGF23 のアップレギュレーションが関与している可能性が示唆された。しかし、軟骨基質におけるコラーゲンタイプの免疫局在と遺伝子発現との関係は一致していなかった。しかし我々は、その問題がタンパクおよび遺伝子レベルでの特徴にあると考えている。今後の研究では、深部に存在するマイナーなコラーゲンタイプについても検討する予定である。

結論として、脛骨粗面の深層は脛骨粗面全域の発育に関与し、表層は膝蓋靭帯の収縮力に対し、埋入線維を石灰化させることで、その機械的刺激に抵抗していることが明らかにされた。さらに、脛骨粗面の成長過程にはいくつかの石灰化因子の遺伝子発現が関与していると推測されたが、本研究では Col2 と Col10 は脛骨結節の成長過程には深く関与していなかった。オスグッド・シュラッター病はスポーツ障害として発育期に発症し、その症状は激しい痛みと炎症である。我々は、オスグッド・シュラッター病において、脛骨粗面に石灰化の遅延が生じることを明らかにしてきた (Suito ら、2023) しかし、オスグッド・シュラッター病の詳細な石灰化機序は不明のままである。本研究は、脛骨粗面の石灰化に関する基礎的研究であり、オスグッド・シュラッター病のメカニズム解明に寄与するも

のと考えられる。

この研究内容は、Journal of Anatomy (Impact factor : 2.4) へ掲載された。

DOI : 10.1111/joa.13958

| Age (weeks) | Microbiological status | Weight $\pm$ SD  |
|-------------|------------------------|------------------|
| 3           | Specific-pathogen free | 41.8 $\pm$ 1.91  |
| 7           | Specific-pathogen free | 207.5 $\pm$ 13.6 |
| 13          | Specific-pathogen free | 516.7 $\pm$ 34.8 |

表 1. ラットの特性

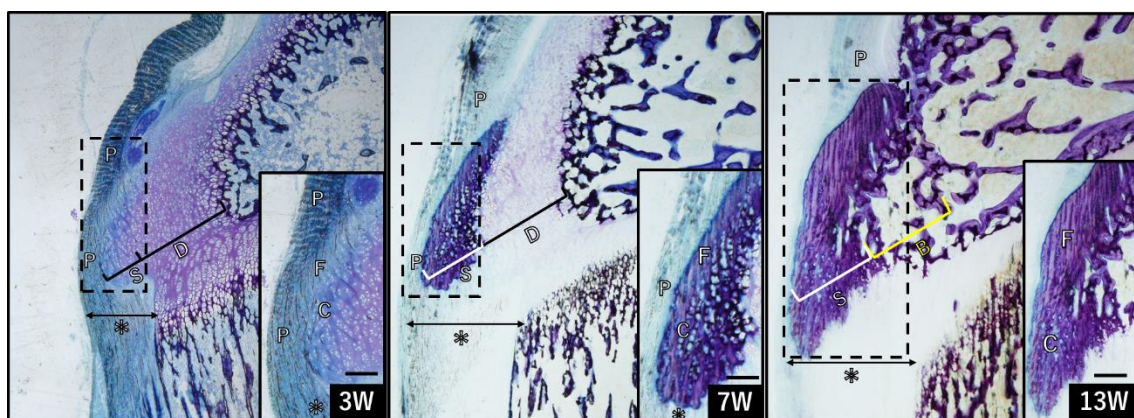


図 1. 発育に伴う脛骨粗面の構造変化

(bar = 200  $\mu$ m, 非脱灰リゴラック樹脂研磨標本, トルイジンブルー染色)

3 週齢 (3W), 7 週齢 (7W), 13 週齢 (13W)

S : 表層、D : 深層、\* : 骨膜、F : 線維軟骨部、C : 石灰化部、P : 膝蓋靱帯部

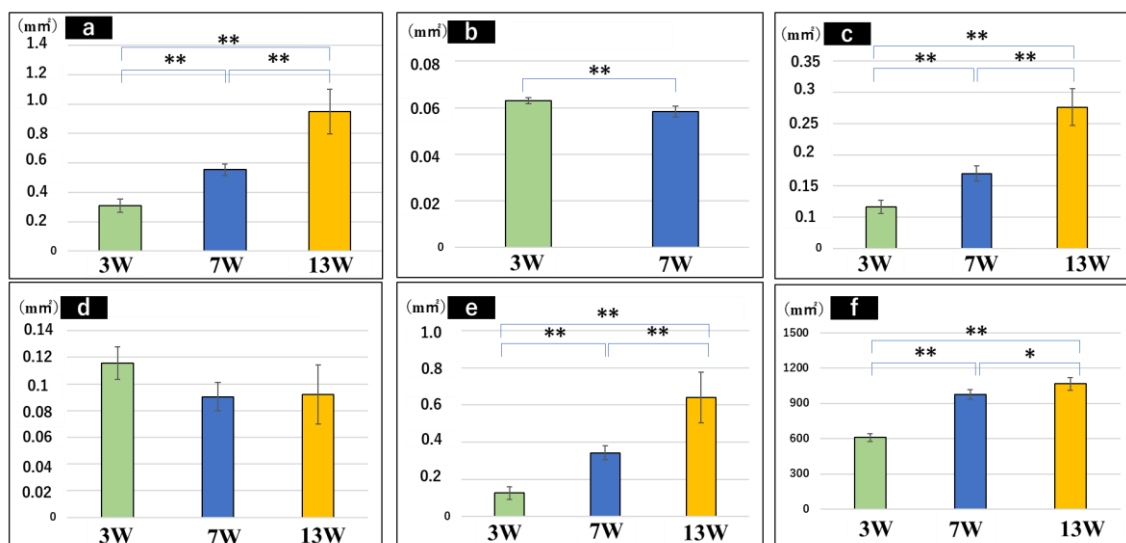


図 2. 脛骨粗面の形態計測

(GMA 樹脂薄切標本, トルイジンブルー染色)

3 週齢 (3W), 7 週齢 (7W), 13 週齢 (13W)

a : 表層の面積、b : 深層の面積、c : 線維軟骨部の面積、d : 膝蓋靱帯部の面積、  
e : 石灰化部の面積、f : 骨膜の厚さ

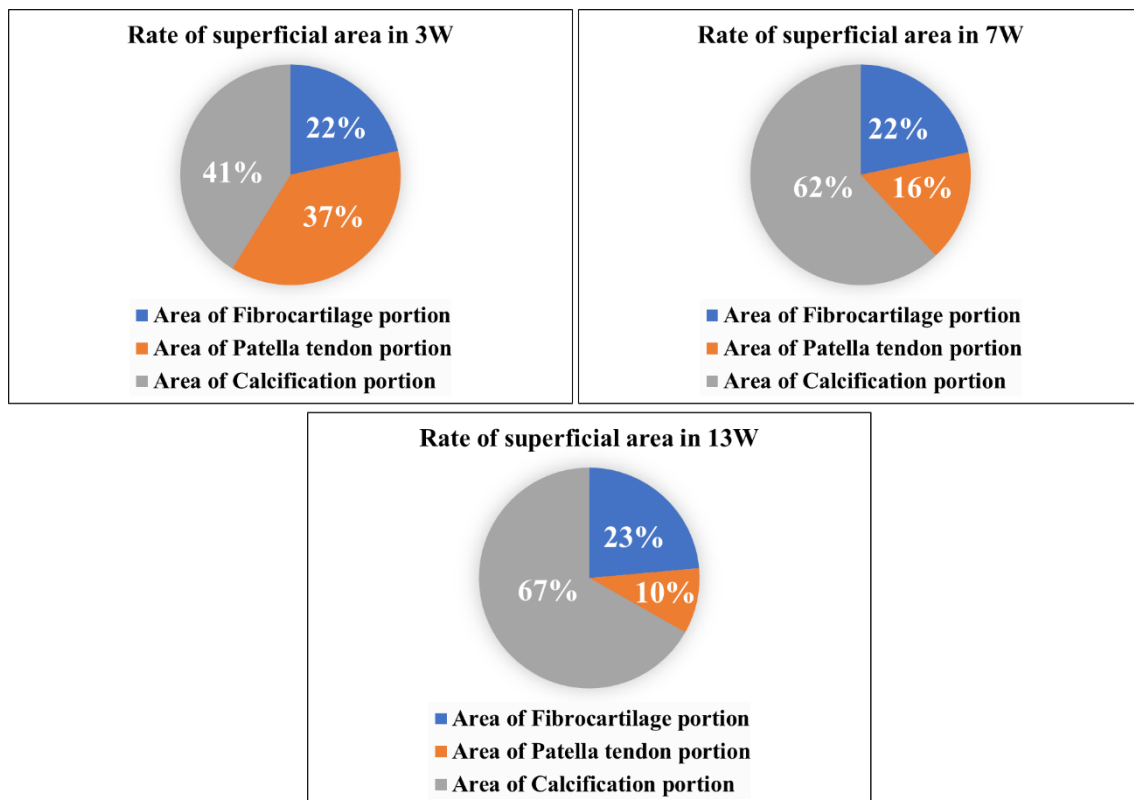


図 3.形態計測における表層部分の変化率

3 週齢 (3W), 7 週齢 (7W), 13 週齢 (13W)

青色：線維軟骨部、オレンジ：膝蓋靱帯部、グレー：石灰化部

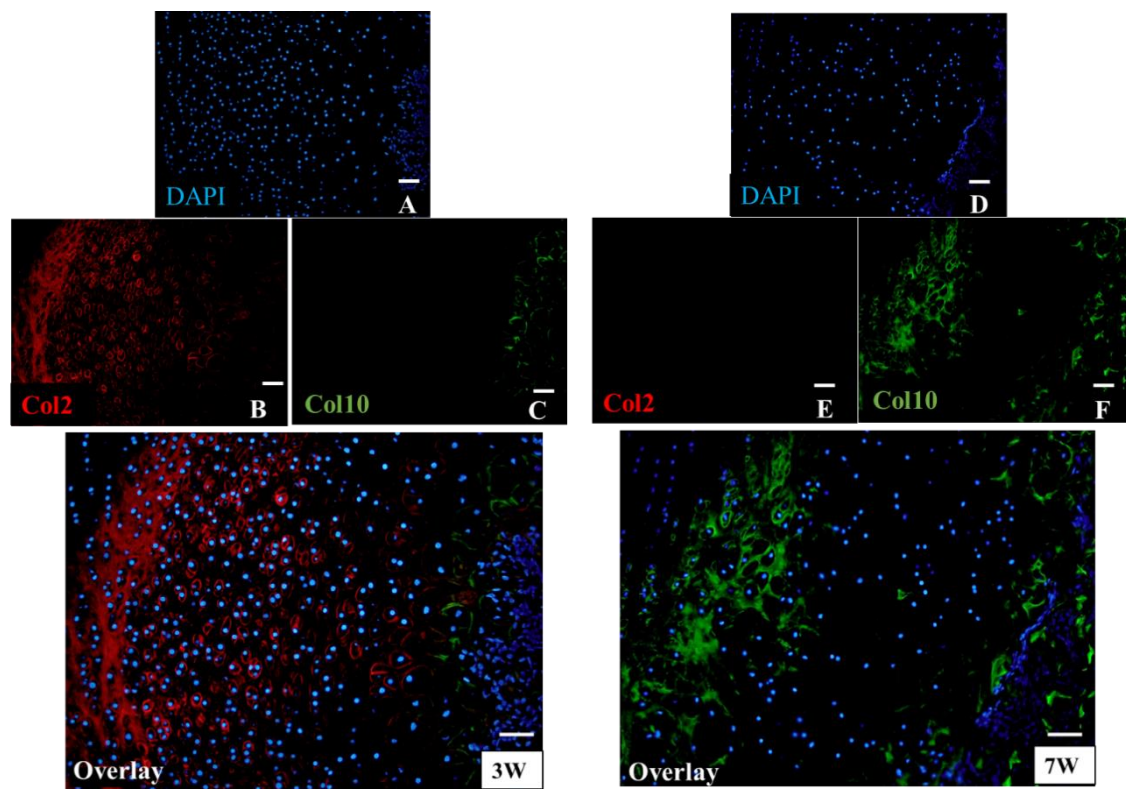


図 4.深層軟骨組織におけるコラーゲンの免疫局在

3 週齢 (3W), 7 週齢 (7W)

(bar=50 $\mu$ m, 脱灰パラフィン切片, 赤=Col2、緑=Col10、青=DAPI)

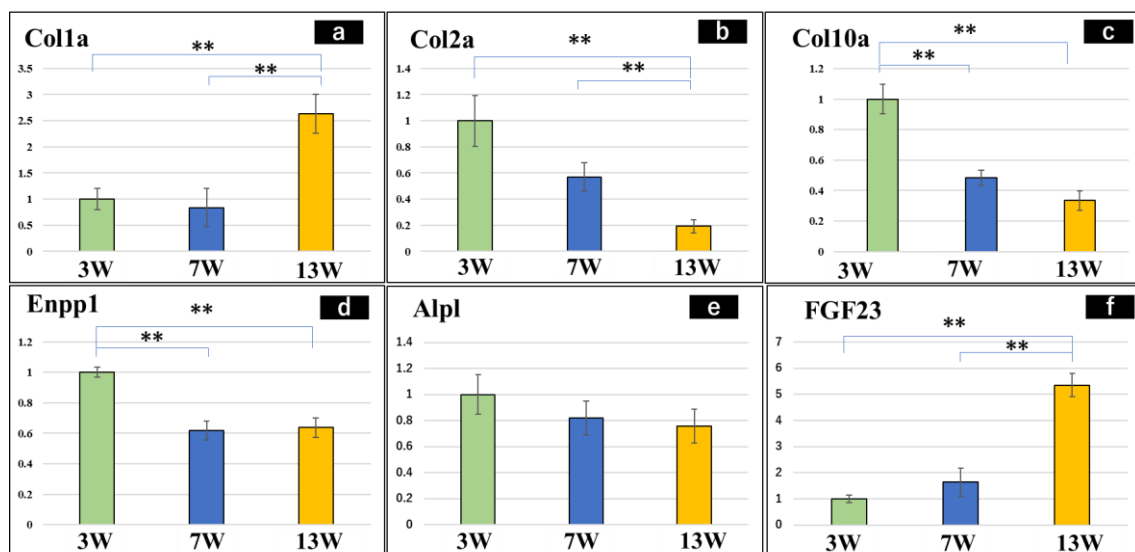


図 5.脛骨粗面における遺伝子発現解析  
 3 週齢 (3W), 7 週齢 (7W), 13 週齢 (13W)  
 (housekeeping gene=GAPDH)

## 引用文献

Ağırdil, Y. (2020) The growth plate: a physiologic overview. *EFORT Open Reviews*, 5(8), 498–507. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.5.190088>.

Aizawa, T., Kokubun, S. & Tanaka, Y. (1997) Apoptosis and proliferation of growth plate chondrocytes in rabbits. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*, 79(3), 483–486. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.79b3.7221>.

Alini, M., Matsui, Y., Dodge, G.R. & Poole, A.R. (1992) The extracellular matrix of cartilage in the growth plate before and during calcification: changes in composition and degradation of type II collagen. *Calcified Tissue International*, 50(4), 327–335. <https://doi.org/10.1007/BF00301630>.

Anderson, H.C., Sipe, J.B., Hessle, L. et al. (2004) Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *The American Journal of Pathology*, 164(3), 841–847. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63172-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63172-0).

Apostolakos, J., Durant, T.J.S., Dwyer, C.R., Russell, R.P., Weinreb, J.H. & Rodeo, S.A. (2014) The enthesis: a review of the tendon-to-bone insertion. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 4(3), 333–342. <http://www.mltj.online/the-enthesis-a-review-of-the-tendon-to-bone-insertion/>

Babij, P., Mathews, S., Liu, Y. et al. (2009) New variants in the ENPP1 and PTPN6 genes cause low BMD, crystal-related arthropathy, and vascular calcification. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(9), 1552–1564. <https://doi.org/10.1359/jbmr.090417>.

Badi, M.H. (1972) Calcification and ossification of fibrocartilage in the attachment of the patellar ligament in the rat. *Journal of Anatomy*, 112(Pt 3), 415–421.

Benjamin, M., Kaiser, E. & Milz, S. (2002) The skeletal attachment of tendons—tendon ‘entheses’. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(4), 931–945. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00138-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00138-1).

Bertrand, J., Lesimple, P., Ducamp, S. et al. (2012) Decreased levels of nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 are associated with cartilage calcification in osteoarthritis and trigger osteoarthritic changes in mice. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(7), 1249–1253. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200892>.

Blitz, E., Sharir, A., Akiyama, H. & Zelzer, E. (2013) Tendon-bone attachment unit is formed modularly by a distinct pool of Scx- and Sox9-positive progenitors. *Development*, 140(13), 2680–2690. <https://doi.org/10.1242/dev.093906>.

Brent, A.E., Schweitzer, R. & Tabin, C.J. (2003) A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell*, 113(2), 235–248. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00268-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00268-x).

Broess, M., Riva, A. & Gerstenfeld, L.C. (1995) Inhibitory effects of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> on collagen type I, osteopontin, and osteocalcin gene expression in chicken osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 57(3), 440–451. <https://doi.org/10.1002/jcb.240570310>.

Cimpean, A., Stefan, C., Gijsbers, R., Stalmans, W. & Bollen, M. (2004) Substrate-specifying determinants of the nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases NPP1 and NPP2. *Biochemical Journal*, 381(1), 71–77. <https://doi.org/10.1042/BJ20040465>.

Ebisawa, K., Hata, K., Okada, K. et al. (2004) Ultrasound enhances transforming growth factor beta-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, 10(5-6), 921–929.

<https://doi.org/10.1089/1076327041348437>.

Eyre, D.R. (1991) The collagens of articular cartilage. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 21(Suppl 2), 2–11. [https://doi.org/10.1016/0049-0172\(91\)90035-x](https://doi.org/10.1016/0049-0172(91)90035-x).

Ferreira, C.R., Ansh, A.J., Nester, C. et al. (2022) Musculoskeletal comorbidities and quality of life in ENPP1-deficient adults and the response of enthesopathy to enzyme replacement therapy in murine models. *Journal of Bone and Mineral Research*, 37(3), 494–504. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4487>.

Flowers, M.J. & Bhadreshwar D.R. (1995) Tibial tuberosity excision for symptomatic Osgood–Schlatter disease. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 15(3), 292–297. <https://doi.org/10.1097/01241398-199505000-00005>.

Hosseini, S.M., Veldink, M.B., Ito, K. & van Donkelaar, C.C. (2013) Is collagen fiber damage the cause of early softening in articular cartilage? *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(1), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.09.002>.

Huang, S.C., Li, L., Rehman, M.U., et al. (2019) Tibial growth plate vascularization is inhibited by the dithiocarbamate pesticide thiram in chickens: potential relationship to peripheral platelet counts alteration. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(36), 36322–36332. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06664-z>.

Jin, Y., Cong, Q., Gvozdenovic-Jeremic, J. et al. (2018) Enpp1 inhibits ectopic joint

calcification and maintains articular chondrocytes by repressing hedgehog signaling.

*Development*, 145(18), dev164830. <https://doi.org/10.1242/dev.164848>.

Komori, T.K. (2018) Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation.

*Histochemistry and Cell Biology*, 149(4), 313–323. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1640-6>.

Kwan, A.P.L., Dickson, I.R., Freemont, A.J. & Grant, M.E. (1989) Comparative studies of type X collagen expression in normal and rachitic chicken epiphyseal cartilage. *Journal of Cell Biology*, 109(4 Pt 1), 1849–1856. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.4.1849>.

Li, B., Guan, G., Mei, L., Jiao, K. & Li, H. (2021) Pathological mechanism of chondrocytes and the surrounding environment during osteoarthritis of temporomandibular joint. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(11), 4902–4911. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16514>.

Lu, H.H. & Thomopoulos, S. (2013) Functional attachment of soft tissues to bone: development, healing, and tissue engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15, 201–226. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124656>.

Michael, J.F. (2021) Bone tissue and histological and molecular events during development of the long bones. *Annals of Anatomy*, 235, 151704.

Nam, H.K., Sharma, M., Liu, J. and Hatch, N.E. (2017) Tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) regulates cranial base growth and synchondrosis maturation. *Frontiers in Physiology*, 8, 161. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00161>.

Odgren, P.R., Witwicksa, H. and Reyes-Gutierrez, P. (2016) The cast of clasts:

catabolism and vascular invasion during bone growth, repair, and disease by osteoclasts, chondroclasts, and septoclasts. *Connective Tissue Research*, 57(3), 161–174.

<https://doi.org/10.3109/03008207.2016.1140752>.

Ogden, J.A. & Southwick, W.O. (1976) Osgood–Schlatter’s disease and tibial tuberosity development. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (116), 180–189.

<https://doi.org/10.1097/00003086-197605000-00032>.

Roberts, F., Zhu, D., Farquharson, C. & Macrae, V.E. (2019) ENPP1 in the regulation of mineralization and beyond. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(7), 616–628.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.01.010>.

Roffino, S., Camy, C., Foucault-Bertaud, A. et al. (2021) Negative impact of disuse and unloading on tendon enthesis structure and function. *Life Sciences in Space Research*, 29,

46–52. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2021.03.001>.

Saito, T., Nakamichi, R., Yoshida, A. et al. (2022) The effect of mechanical stress on enthesis homeostasis in a rat Achilles enthesis organ culture model. *Journal of Orthopaedic Research*, 40(8), 1872–1882. <https://doi.org/10.1002/jor.25210>.

Schwartz, A.G., Lipner, J.H., Pasteris, J.D., Genin, G.M. & Thomopoulos, S. (2013) Muscle loading is necessary for the formation of a functional tendon enthesis. *Bone*, 55(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.03.010>.

Scott, J.E. & Stockwell, R.A. (2006) Cartilage elasticity resides in shape module decoran and aggrecan sumps of damping fluid: implications in osteoarthritis. *Journal of Physiology*, 574(Pt 3), 643–650. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.108100>.

- Song, H. & Park, K.H. (2020) Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration. *Seminars in Cancer Biology*, 67(Pt 1), 12–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.04.008>.
- Suito, H., Zheng, X., Minamizono, W. & Ohsako, M. (2021) Structural changes in attaching sites of tendon of femoral quadriceps muscle in growing rats. *Toyo University Graduate School Bulletin*, 57, 185–195.
- Suito, H., Zeng, X., Minamizono, W., Yang, C., Yashima N., Ohsako, M. (2022) The histological influence to periosteum under the tibial tuberosity by increase of mechanical load with aging in rats. *Bulletin of the Toyo University Graduate School*, 58, 263–270.
- Suito, H., Fujikawa, K., Ohsako M. Eccentric contractions during downhill running induce Osgood–Schlatter disease in the tibial tuberosity in rats: a focus on histological structures. *Scientific Reports*, 13, 9863.
- Turcotte CM, Rabey KN, Green DJ, McFarlin SC (2021) Muscle attachment sites and behavioral reconstruction: an experimental test of muscle-bone structural response to habitual activity. *Am J Biol Anthropol*.
- Yılmaz, V., Karadaş, Ö., Dandinoğlu, T., Umay, E., Çakıcı, A. & Tan, A.K. (2017) Efficacy of extracorporeal shockwave therapy and low-intensity pulsed ultrasound in a rat knee osteoarthritis model: A randomized controlled trial. *European Journal of Rheumatology*, 4(2), 104–108. <https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2017.160089>.
- Zhang, J., Dymment, N.A., Rowe, D.W. et al. (2016) Ectopic mineralization of cartilage

and collagen-rich tendons and ligaments in ENPP1 asj-2J mice. *Oncotarget*, 7(11), 12000–12009. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7455>.

Zhang, T., Tian, Y., Wang, Q., Fu, M., Xue, C., & Wang, J. (2021) Comparative study of DHA with different molecular forms for ameliorating osteoporosis by promoting chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in the growth plate of ovariectomized mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(36), 10562–10571. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03228>.

### 第3章

脛骨粗面の形成には Chondromodulin-1 の発現衰退が関連する — 深層軟骨組織の構造に着目して —

#### 要約

脛骨粗面には膝関節の伸展筋である大腿四頭筋が停止しており、同筋の収縮は、脛骨粗面へ伝達される。また、過剰な機械的刺激はオスグッド病を引き起こすことが知られている。脛骨粗面は硝子軟骨で構成された深層と膝蓋靭帯の線維が埋入される表層に大別される。発育初期の脛骨粗面は深層で構成されているが、その組織は発育に伴い徐々に石灰化および骨化する。従って、脛骨粗面は軟骨内骨化によって骨組織が形成される。一方で、軟骨内骨化は軟骨組織への血管侵入が生じるが、それは Chondromodulin-1 (Chm-1) によって制御されている。Chm-1 は血管侵入を抑制する因子であり、その合成量は発育に伴い減少する。以上のことから、脛骨粗面の骨形成には Chm-1 の合成状態が関与すると思われるが、それは明らかにされていない。本研究において発育初期の脛骨粗面には Chm-1 が深層全体に局在していたが、それは発育に伴い消失していた。また、アルシアンブルーPAS 染色における PAS 反応は発育に伴い広く観察されるのみならず、その反応は Chm-1 の局在と類似していた。一般的に、アルシアンブルー染色は酸性、PAS 反応は中性に染色性が示される。これらの事実から、脛骨粗面の発育に伴う成熟には、Chm-1 の消失が関与し、それは基質中の水酸化イオン濃度が関連することが示唆された。

## 背景

オスグッド病は脛骨近位前方に位置する脛骨粗面に発生するスポーツ障害である 1)。また、脛骨粗面には膝蓋靱帯の線維が埋入されており 2)、膝蓋靱帯が大腿四頭筋と脛骨粗面の間に介在することで、同筋の収縮力は脛骨粗面に伝達され、膝関節が伸展する。しかしながら、脛骨粗面全体に膝蓋靱帯の線維が埋入されているわけではない。2021 年に初めて、脛骨粗面は膝蓋靱帯の線維が埋入されている表層と硝子軟骨で構成された深層に分類された 3)。その報告によれば、表層は石灰化線維軟骨の層が形成されている”線維軟骨部”，膝蓋靱帯の線維が埋入されている”石灰化部”，脛骨粗面の最前方に位置し、未石灰化線維が埋入されている”膝蓋靱帯部”によって構成されている。一方で、非脱灰の薄切標本において、発育初期の脛骨粗面深層には未成熟な軟骨細胞が多く存在することや、発育後期には深層の軟骨組織が骨組織に置換されることが初めて報告された 4)。

軟骨内骨化は長管骨の形成過程に必須であり、その実態は軟骨組織内に血管が侵入することで、軟骨組織が骨へと置換される過程である 5)。事実、軟骨内骨化が生じる骨端板にはその組織内に血管が侵入する **erosion zone** と呼ばれる部位が存在する。つまり、骨端板もまた血管が侵入することで、軟骨組織が成熟するため、軟骨内骨化が生じると考えられる。すなわち、脛骨粗面深層の骨置換もまた同様の過程が認められると考えられる。一方で、正常な生体では **Chondromodulin** ファミリーの中でも、**Chondromodulin-1 (Chm-1)** が軟骨組織内への血管侵入を抑制しており、それは骨端板の休止層から前肥大軟骨細胞に局在している 6)。Chm-1 は骨端板肥大軟骨細胞層にほとんど観察されないことから、その部位は血管侵入抑制の機能が消失していると考えられている。

軟骨細胞周囲には軟骨基質が局在し、そこにはコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸のような酸性物質が多く含有されている。これらの無定形基質は正常な軟骨基質に多く含有されているが、軟骨組織病変の代表である変形性関節症では、病変あるいは病気の進行に伴い無定形基質が分解された後 7)、関節軟骨の組織内へ血管侵入が誘導され、骨組織が形成される。つまり、軟骨組織内への血管侵入には、無定形基質の消失が関与すると思われ、その消失は必然的に関節軟骨の pH の上昇が誘導される。事実、軟骨基質を破壊する **Matrix Metallo Proteinases** は中性環境下で活性し 8)、それは変形性関節症が進行する要因として知られている。以上のことから、軟骨内への血管侵入は、軟骨組織の pH 環境に依存すると考えられる。

前述の如く、脛骨粗面深層には軟骨組織が存在し、それは発育に伴い石灰化および骨化するが、それらの過程と脛骨粗面深層における基質中の性質を報告は未だない。そこで本研究は脛骨粗面深層の発育に伴う軟骨内骨化に軟骨基質の

水素イオン濃度と Chm-1 の局在がどのように関与するかを組織学的に明らかにすることを目的とした。この問題点の解明は、柔道整復師の領域におけるオスグッド病の治療法開発に貢献できると考えている。

## 材料および方法

### 1.動物

3, 7, 10 週齢（それぞれ  $n=4$ , 以下 3W, 7W, 10W）ウィスター系雄性ラット各 4 頭を特異的病原体なしの状態で搬入した（日本生物材料センター，東京，日本）。搬入後，CO<sub>2</sub> ガス吸引によって安楽死させた後，種々の標本を作製した。なお，本研究は東洋大学大学院ライフデザイン学研究科動物実験委員会の承認を経て実施した（No. 2021-08）。

### 2.脱灰パラフィン切片

各群の近位脛骨は屠殺後ただちに 4%パラフォルムアルデヒドによって浸漬固定した後，8%EDTA（349-01863，DOJINDO，熊本，日本）溶液で 3 週間脱灰した。その後，標本を段階的にエタノールで脱水し，パラフィンに包埋した。薄片の厚さは 4 $\mu$ m で統一し，アルシアンブルーPAS の重染色と Chm-1 免疫染色を行った。

### 3.免疫組織化学

免疫染色は標本内のパラフィンを取り除いた後，内因性ペルオキシダーゼ除去のため，メタノール内に 0.3%に調整した過酸化水素の中に浸漬させた。その後，軟骨組織のマスキング因子であるヒアルロン酸は 1%ヒアルノニダーゼを 37 度で 2 時間の処理を行い，除去した。さらに，3%ウシ血清アルブミンでブロッキング処理を行い，Chm-1（300 倍，abcam）の一次抗体を標本に滴下し，4°Cで一晩反応させた後，二次抗体を 30 分反応させ，最後に DAB で発色させた。

## 結果

### 1. 脛骨粗面深層の基質は発育に伴い酸性から中性へ移行する

アルシアンブルーはアグリカンのような酸性軟骨基質に染色性を示し、PAS 反応は中性多糖類のグリコーゲンに反応する。前者の染色性は青色、後者はピンク色に反応する。全群においてアルシアンブルーの染色性は骨端板および脛骨粗面深層に認められ、10W には脛骨粗面内に骨組織が形成されていた (図 1a-c)。また、3W では深層全体がアルシアンブルーに染色されていたが、脛骨粗面深層の後方では PAS 反応が弱く観察された (図 1d)。7W および 10W では前方に PAS 反応も強く検出された (図 1e, f)。さらに、3W の深層前方には小型な軟骨細胞が多く存在し、その周囲の基質はアルシアンブルーに染まっていた (図 1g)。また、7W および 10W の脛骨粗面前方では肥大軟骨細胞が多く存在していただけでなく、PAS 反応もまた 3W より強く認められた (図 1h, i)。一方、深層の後方における PAS 反応は、3W では弱く示されていたが (図 1j)、それは発育に伴い強く染色されていた (図 1k, l)。これらの結果は脛骨粗面深層が発育に伴い順次酸性から中性へ移行することが示されている。

### 2. Chm-1 の免疫局在は酸性基質上に存在する

全ての群の脛骨粗面では Chm-1 のネガティブコントロールに反応が示されなかった (not shown data)。3W おける Chm-1 の免疫局在は、深層全範囲に認められた (図 2a)。しかしながら、7W における Chm-1 の反応は脛骨粗面下方に強く認められた (図 2b)。その一方で、10W の脛骨粗面深層には Chm-1 の軟骨基質上に免疫反応はほとんど確認されなかったが、脛骨粗面下方に多くの陽性細胞が観察された (図 2c)。また、脛骨粗面下方における Chm-1 の免疫反応はアルシアンブルーの染色結果と類似していた (図 2d-f)。これらの結果は、Chm-1 の局在はアルシアンブルーの染色領域と類似しており、軟骨基質の酸性環境下において Chm-1 が合成されることが示されている。

## 考察

発育初期の脛骨粗面深層は未成熟な軟骨細胞で形成されるが、それは発育に伴い肥大軟骨細胞へと分化する 3)。その後、深層には軟骨組織が観察されず、その部位に骨組織が形成される 4)。つまり、脛骨粗面は軟骨組織が骨組織に置換されることから、軟骨内骨化を経て成熟すると思われる。軟骨内骨化とは軟骨組織内に血管が侵入し、破軟骨細胞が軟骨組織を破壊した後、骨組織を形成する過程である 9, 10)。従って、脛骨粗面内の骨形成には、深層の軟骨組織内に血管が侵入することで発生する。本研究において全群の脛骨粗面深層後方には骨端の骨髄が接していた。脛骨粗面は軟骨内骨化を経て形成されることから、脛骨粗面の軟骨内骨化は深層後方から軟骨組織内に血管が侵入することで生じると考えられる。

アルシアンブルーPAS 染色は酸性多糖類と中性多糖類を染め分けることができる染色法である。軟骨組織では、コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸などが酸性多糖類 11)、グリコゲンなどが中性多糖類に相当する 12)。また、前者はアルシアンブルーに染まり、後者は PAS 反応が陽性となる。本研究において、3W の脛骨粗面深層における PAS 反応は 7W と比べて非常に弱く観察された。対照的に、3W におけるアルシアンブルーの染色性は深層全体に認められたが、7W および 10W ではほとんど観察することができず、PAS 反応が強く検出された。加えて、3W の深層前方部では未成熟な軟骨細胞が多く観察された。さらに、アルシアンブルーの染色性が深層の軟骨基質に認められたが、PAS 反応が弱く示されていた。3W の脛骨粗面の後方部には肥大軟骨細胞が局在しており、PAS 反応が強く観察された。これらの結果から、発育初期の脛骨粗面における酸性物質は深層前方部に多く、中性物質は後方部に形成されることが推測され、未成熟な軟骨細胞周囲の基質は酸性、肥大軟骨細胞周囲の基質は中性物質が多いことを裏付けている。一般的に、未成熟な軟骨細胞は小型であり、それは分化に伴い細胞が肥大化することが知られており 13)、3W の脛骨粗面深層には同様に小型の細胞が、7W の深層には肥大軟骨細胞が存在する 3)。これらの事実から、分化度の低い軟骨細胞周囲は酸性、肥大軟骨細胞周囲の基質は中性環境下にあることが推測される。

Chm-1 は軟骨組織への血管侵入を抑制するタンパク質であり、それは骨端板のみならず、関節軟骨にも局在が認められている 6)。Chm-1 は血管侵入に対し抑制的に機能することで、それは軟骨内骨化の制御に重要な役割を担っている 14)。本研究において Chm-1 の局在は、3W および 7W に認められたが、10W では軟骨基質上に認められなかったことから、Chm-1 の合成は発育に伴い、衰退すると思われる。一方で、脛骨粗面は骨端骨髄側から石灰化および骨化することが知られている。以上のことから、脛骨粗面深層における形成過程には、Chm-1 の

発現抑制によって生じるものと思われる。

本研究は脛骨粗面の構造を組織学的な解析によって明らかにすることを目的とし、Chm-1 と深層内の軟骨基質の酸性や中性などの水素イオン濃度に焦点を当てて脛骨粗面の形成過程を明らかにした。しかしながら、本研究はアルシアンブルーPAS 染色による定性的な評価に基づき、結果を示したため、正確な水素イオン濃度を測定するに至らなかった。今後は水素イオン濃度の異なる培地を用い、脛骨粗面の器官培養実験によってこれらの問題点を解決することを考えている。

## 5. 結語

組織学的な検討に基づき、ラット脛骨粗面の発育過程には Chm1 の消失と pH の上昇が関与することが示唆された。

## 6. 倫理審査

本研究は東洋大学動物実験委員会の審査により承認された (No.2021-08)。

## 8. 引用文献

- 1) Ogden JA, Southwick WO. Osgood-Schlatter's disease and tibial tuberosity development. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1976, 116, 180-189.
- 2) Hirai S, Kaoru F, Masafumi O. Eccentric contractions during downhill running induce Osgood-Schlatter disease in the tibial tuberosity in rats: a focus on histological structures. *Scientific Reports*. 2023, 13, 9863.
- 3) Hirai S, Xueqian Z, Wataru M, Masafumi O. Structural changes in attaching sites of tendon of femoral quadriceps muscle in growing rats. *Bulletin of the Graduate School Toyo University*. 2021, 57, 185-195.
- 4) Hirai S, Xueqian Z, Wataru M, Chuwei Y, Nao Y, et al. The histological influence to periosteum under the tibial tuberosity by increase of mechanical load with aging in rats. *Bulletin of the Graduate School Toyo University*. 2022, 58, 263-270.
- 5) Michael JF. Bone tissue and histological and molecular events during development of the long bones. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. 2021, 235, 151704.
- 6) Hiroshi K, Tadashi H, Kunihiro T, Naoto E, Funaki H, et al. Chondromodulin-1 in rat articular cartilage. *Archives of Histology and Cytology*. 2003, 66, 221-228.
- 7) Jennifer E, Woodell M, Sven DS. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*. 2019, 38, 253-257.
- 8) Yasuo Y, Harumoto Y. Matrix metalloproteinases and cartilage matrix degradation in

rheumatoid arthritis. *Clinical Calcium*. 2007, 4, 500-508.

9) Harunur R, Haiyan C, Amjad J. Runx2 is required for hypertrophic chondrocyte mediated degradation of cartilage matrix during endochondral ossification. *Matrix Biology Plus*. 2021, 12, 100088.

10) Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalki J, Werb Z, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*. 1999, 5, 623-628.

11) Takuo N, Anchalee S, Lech O. Extraction of Aggrecan-Peptide from Cartilage by Tissue Autolysis. *Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture*. 2014, 6, 54-59.

12) Judith MH and Zeng L. The Emerging Role of Glucose Metabolism in Cartilage Development. *Current Osteoporosis Reports*. 2019, 17, 56-69.

13) Toshihisa K. Whole Aspect of Runx2 Functions in Skeletal Development. *International Journal of Molecular Science*. 2022, 23, 5776.

14) Patricia K, Cordula SS, Matthias B, Bernd SJ, Jorg HD, et al. Chondromodulin 1 stabilizes the chondrocyte phenotype and inhibits endochondral ossification of porcine cartilage repair tissue. *American College of Rheumatology*. 2011, 63, 2721-2731.

この研究内容は、日本柔道整復接骨医学会誌へ投稿中である（000251、原著23007E）。

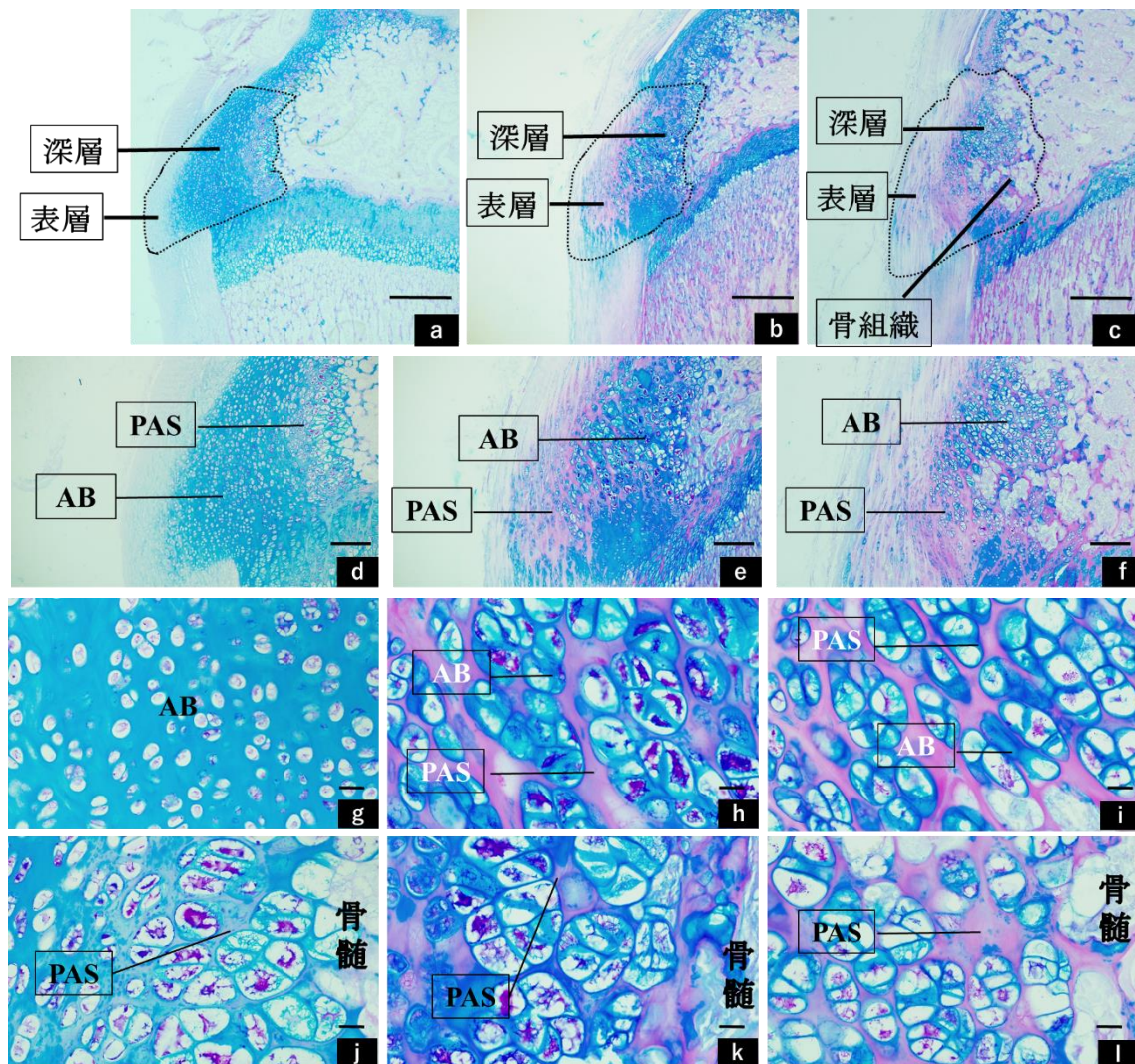


図 1. 脛骨粗面における軟骨基質の pH の状態 (脱灰パラフィン切片, bar=a-c: 500 $\mu$ m, d-f: 200 $\mu$ m, g-l: 20 $\mu$ m)

左: 前方, 右: 後方, 左列: 3 週齢 (3W), 中列: 7 週齢 (7W), 右列: 10 週齢 (10W),  
最上段: 脛骨粗面の弱拡大像, 2 段目: 中拡大像, 3 段落目: 深層前方の強拡大,  
4 段目: 深層後方の強拡大

3W の脛骨粗面深層は全体的にアルシアンブルー (青) に染められていたが, 後方部には PAS 反応 (ピンク色) が認められた. 7W および 10W では PAS 反応が強く出現し, 後方のみならず前方にまでその反応が認められた.

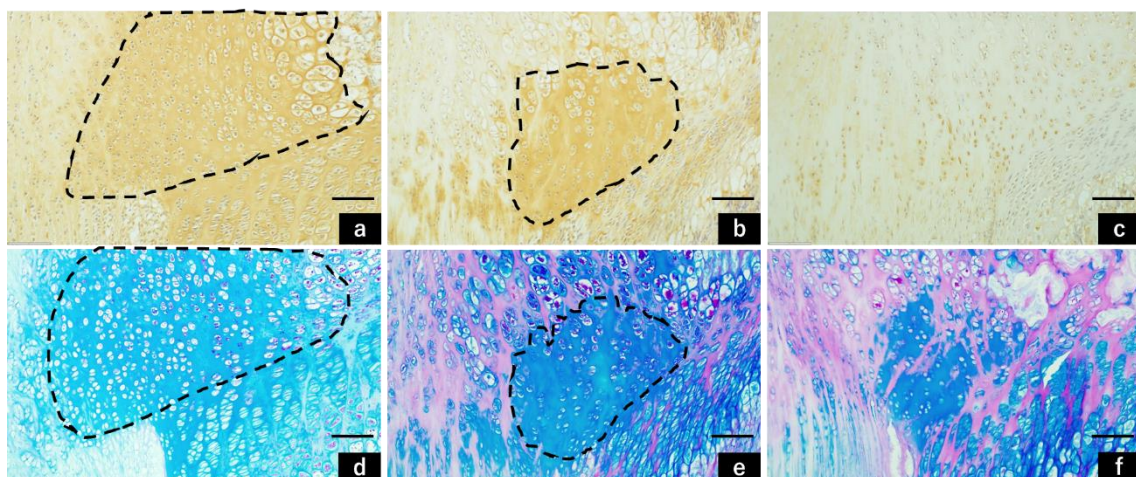


図 2. Chm-1 とアルシアンブルー染色の組織学的な関係（脱灰パラフィン切片，  
bar=100 $\mu$ m）

3 週齢 (3W): 左段, 7 週齢 (7W): 中段, 10 週齢(10W): 右段

3W における Chm-1 の免疫反応は深層内の軟骨基質全体で観察されたが, 7W では脛骨粗面深層下方に Chm-1 の免疫局在が認められた. 一方, 10W では深層の基質にその反応は基質上に認められなかったが, 深層下方には Chm-1 の陽性細胞が多く観察された. また, 3W における深層下方のアルシアンブルーPAS の染色性は, アルシアンブルーが強く観察されたが, それは発育に伴い衰退し, PAS 反応が強くなっていた.

## 第4章

### 下り走運動はラット脛骨粗面にオスグッド病を発症させる

#### 要約

オスグッド・シュラッター病 (OSD) は思春期に発症する疾患で、脛骨粗面に炎症、疼痛、隆起を引き起こす。OSD は大腿四頭筋の遠心性収縮が原因であることが示唆されている。そこで本研究は、24 匹のラットを下り走運動によって大腿四頭筋の遠心性収縮をシミュレートした (DR) と対照群 (CO) の 2 群に分け、実験を行った。DR には 1 週間の予備的ランニングプログラムを行い、その後 3 週間の本番ランニングプログラムを行った。その結果、DR では、脛骨粗面の深層が CO よりも大きくなり、遺伝子発現に関与する炎症性サイトカインが DR で上昇した。また、DR の前方関節軟骨と深部領域はサブスタンス P に対して免疫反応性を示した。さらに、DR の深層に存在する軟骨細胞は CO に比べて小さなサイズの軟骨細胞が観察された。この要因には二つの原因が考えられる。一つ目は運動に伴い基質が太く形成されたことであり、軟骨細胞のサイズが小型化したと考えられる。このように、DR では、二つ目は炎症性サイトカインの仲間である PGE2 の活性化によって軟骨細胞の分化が抑制されたことである。これらの所見は、大腿四頭筋のエキセントリック収縮が OSD の発症に関与している可能性を示唆している。この疾患の病態原理をよりよく理解し、効果的な治療法を開発するためには、さらなる研究が必要である。

## 背景

オスグッド・シュラッター病 (OSD) は一般的に膝関節に発症し [1]、その症状には脛骨粗面の隆起、疼痛、炎症が含まれる [2]。先行研究では、この病的状態は思春期の男児において長期間持続する可能性があり [3]、運動制限や日常生活動作に大きな影響を及ぼすことが報告されている [4]。大腿四頭筋は脛骨粗面に埋入されており、同筋が収縮することで膝関節を伸展させる。また、OSD は大腿四頭筋の反復的な偏心性収縮によって脛骨粗面に発症し、それは頻回なキック動作や着地動作によって OSD を誘発することが明らかになっています [5, 6]。そのため、OSD は特に活動的な思春期の男子に多くみられます。さらに、大腿四頭筋と上腕三頭筋の柔軟性の低下も OSD の原因となり、脛骨結節の緊張が高まり、強い収縮を引き起こすことが知られている [2]。一方で、腱や靭帯が骨に付着する箇所は *enthesis* と呼ばれ、脛骨粗面もその 1 つであり、その部位には線維軟骨が観察される [2, 7]。一般に、スポーツによる関節包の損傷は、*enthesopathy* と呼ばれる [8]。棘上筋の挿入部位の炎症も、大結節で起こる *enthesopathy* の一例であり、これは線維軟骨部の増加につながることもある [9]。また、OSD における脛骨粗面の組織学的所見は、ほとんどが肉眼的な所見に基づいて報告されている [10, 11]。

執筆者はラットの脛骨粗面の組織学的構造を観察し、表層と深層に分類した [8]。簡単に説明すると、表層部は膝蓋靭帯の線維が包埋されており、その部位は発育とともに石灰化が進む。一般的に *enthesis* は、腱、非石灰化線維軟骨、石灰化線維軟骨、骨の 4 つのゾーンに分けられる [12]。先行研究によると、偏心性収縮を伴うオーバーユース活動により、関節包内の線維軟骨の部分が増加する。大腿四頭筋では、下り走運動の際に遠心性収縮が起こり、求心性収縮時に比べて脛骨粗面が強く引っ張られる [13]。対照的に、脛骨粗面の深層は未石灰化の硝子軟骨で構成されている。成長初期の深層は未熟な軟骨細胞が観察され、成長期になると、肥大化した軟骨細胞が観察される [14]。発育後期の深層では硝子軟骨が観察されなくなるが、その部位には骨組織が形成される。一方で、骨端板は深層と類似した構造をしており、活性の高い軟骨細胞が存在する部位は静止層と増殖層と呼ばれる。骨端板の軟骨細胞は、増殖層で細胞の増殖を通じて骨格の成長を遂げる [15, 16]。したがって、脛骨粗面の特徴を理解するためには、深層の軟骨細胞を調べることが重要である。

軟骨組織は、インターロイキン-6 (IL-6) の発現に関与する炎症性因子とともに、過度の機械的ストレスによる炎症時に発達する [9]。先行研究では、プロスタグランジン E2 (PGE2) が炎症性サイトカインの発現によって誘導され、合成される [16, 17]。その機序として、最初にシクロオキシゲナーゼ 2 (Cox2) が、炎症時にアラキドン酸をプロスタグランジン H2 (PGH2) に変換し、PGH2 は

Ptges によって PGE2 に合成する [16]。一般に、軟骨細胞の成熟は、未熟な軟骨細胞の肥大に由来している [18-20]。しかし、PGE2 は軟骨マトリックスの石灰化と同様に軟骨細胞の分化を抑制することが示されている [21]。これらの事実から、OSD は炎症性サイトカインと PGE2 合成を誘導し、これが脛骨粗面の分化と石灰化に影響していると推測される。しかし、この仮説は、OSD の組織学的構造が不明なため、まだ立証されていない。この問題は、OSD の動物モデルを作れば解決できるが、そのようなモデルはまだ開発されていない。

本研究では、ラットの大腿四頭筋の遠心性収縮と OSD の病態の観点から、OSD の構造を再現することを目的とした。また、OSD における脛骨粗面の隆起には、深層の軟骨細胞の増殖に起因するという仮説を立て、それを証明する。

#### 材料および方法

##### ARRIVE guidelines

本試験は、ARRIVE ガイドライン 2.0 の Essential 10 に従って実施した。各項目の詳細を以下に示す。また、すべての実験が関連するガイドラインや規則に従って行われたことを確認した。

##### Study design, sample size, and outcome measures

本研究は、ダウンヒルランニング運動を用いて OSD の組織学的構造を再現することを目的とし、ダウンヒルランニング群とコントロール群の 2 群に分けて解析した。さらに、動物種、各群の頭数、1 ケージでの飼育頭数を「実験デザイン」の項に記載した。本研究の目的は、動物の尊厳と研究結果の信頼性を確保することである。実験計画書は、東洋大学大学院ライフデザイン研究科動物実験・研究倫理委員会の承認を得た（承認番号：2019-04）。

##### Inclusion and exclusion criteria, and randomization

この実験に使用したラットはすべて解析の対象とした。全ラットの右脚を組織学的解析に用い（n=12）、左脚を骨形態計測と遺伝子発現解析に用いた

（n=6）。さらに、この研究のグループ分けは、1 から 24 までの数字が不規則に並んだカードを引いて、各グループに 12 枚ずつ割り当てるという無作為化法を用いた。その後、ラットをカードの番号に従って並べ替えた。

##### Blinding

実験と結果の初期評価は平井翠人が行い、その結果はグループ名を伏せたまま藤川薫と大迫正史と共有された。

##### Statistical measures

本研究における統計分析は、IBM SPSS Statistics ver.26 で行った。また、2 群間の検定に対応関係のない t 検定を採用した。そのため、両群の n 数は検定時にすべて統一した。

## Experimental procedures

雄の Wistar 系統ラットを用い、ヒトの思春期に相当することから 6 週齢のラットを本研究に用いた。ラットは病原体のない状態で日本バイオサプライセンターから搬入されたが、運動実験用に遺伝子組換えはしていない。体重は実験終了時に測定し、SD とともに表 1 に示した。表 1

## Experimental animals

室町機械株式会社製のトレッドミル (MK-690) を用いてランニング運動実験を行った。詳細なプロトコールおよび参考文献として用いた報告書は「実験デザイン」の項に記載した。実験手順の簡略模式図を図 1 に示す。また、実験は海拔約 7 メートルの東洋大学朝霞キャンパスで行った。さらに、すべての統計分析には p 値が含まれている。

## Experimental design

合計 24 匹のラット (6 週齢、Wistar 系統、雄) を、下り坂トレッドミル走行 (DR) 群 (n = 12) と対照 (CO) 群 (n = 12) (日本バイオサプライセンター、東京、日本) に無作為に分けた。ラットは 1 ケージ 4 匹まで飼育し、水と餌を自由に与えた (オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本)。本研究で用いた走行プロトコールは、Soslowsky らの実験プロトコール[22]に基づいている。本研究の目的は、OSD の過使用ラットモデルを開発することであった。DR プロトコールは、1 週間の予備走行と 3 週間の本走行プログラムで構成された。予備走の条件は、速度：10m/分、角度：-10°、時間：1 回 30 分、頻度：5 日/週であった。メインランニングの条件は、速度 17m/分、角度-15°、時間 60 分 (1 回)、頻度 5 日/週であった。実験期間終了後、すべてのラットを炭酸ガスで安楽死させ、脛骨近位部を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、各種標本の矢状断面を観察した。

## Non-decalcification specimens

非脱灰標本は、石灰化状態を観察するためにリゴラック樹脂 (日新 EM、東京、日本) に包埋し、トルイジンブルーで染色した[23]。形態計測は 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (GMA) 樹脂標本で行い、矢状面上で 4 $\mu$ m で切片化した。

## Paraffin-embedded sections and general stain

標本はエチレンジアミン四酢酸溶液を用いて 3 週間脱灰した。その後、標本をパラフィンに包埋した。サフラニン O [24] で染色後、パラフィン包埋切片を光学顕微鏡で観察した。

## Immunohistochemistry staining

まず、ウェットボックス内でキシレンに 1 時間浸漬してパラフィンを除去した。次に、内因性ペルオキシダーゼをメタノール中 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 15 分間除去し、標本上のヒアルロン酸をヒアルロニダーゼで処理した (37°C、2 時間)。さらに、切片を 3%ウシ血清アルブミンで 30 分間ブロックした。Substance P (Abcam, Cambridge, UK) (300 倍)を 0.3 % proteinase K で 15 分間処理して免疫反応を行い、一次抗体を標本上で 4°Cで一晩インキュベートした。標本を光学顕微鏡で免疫反応性を観察した。

#### Morphometry in the tibial tuberosity

脛骨結節の形態計測は、トルイジンブルー染色後の GMA 標本の矢状面断面で行った [25]。本研究では、全体、表層部、深層部、および骨膜の厚さを測定した。さらに、表層部は組織学的に膝蓋腱、線維軟骨、石灰化の 3 つの部分に分類した。すべての検体は脛骨の中心から測定し、前十字靱帯が巨視的に確認でき、骨端板の軟骨柱の構造に違いがないことを組織学的に確認してから測定を行った。本研究における形態計測は、WinROOF Version7.4.0 (三谷商事株式会社、福井県)を用いて、脛骨結節の「面積」、「厚さ」、「細胞数」を計測した。

#### Quantitative real-time polymerase chain reaction

まず、脛骨結節を TRIzol (Thermo Fisher Scientific、東京、日本)を用いて全 RNA 抽出した。他の組織の total RNA との混合を避けるため、脛骨結節下の骨膜に切り込みを入れ、脛骨結節のみを取り出した。cDNA は iScript gDNA Clear Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて合成した。Real-time PCR は、CFX96 Real-Time System (Bio-Rad)を用い、TaqMan プローブ (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。PCR 条件は以下の通りであった：95 °C で 20 秒間の初期変性、95 °C で 15 秒間の変性を 40 サイクル、60 °C で 1 分間の最終伸長。GAPDH mRNA レベルは内部コントロールとして定量した。相対発現レベルは、 $\Delta$  ( $\Delta$ CT) 法を用いて算出した[26]。

#### Statistical analyses

すべてのデータは平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。統計解析は t 検定を用いて行った。p 値<0.05 を統計的に有意とみなした。さらに、すべての統計解析は IBM SPSS Statistics ver.26 を用いて行った。

## 結果

### 脛骨結節の各部位の組織学的特徴

脛骨結節は前方骨端上脛骨に存在し、DR の脛骨結節は CO よりも大きく観察された (図 2)。

両群の脛骨結節は、トルイジンブルー染色により深部と表層の 2 つの領域に分けられた。深部領域は軟骨細胞と軟骨基質から構成されていた。一方、表層部は、トルイジンブルーによる染色に基づいて組織学的に 3 層に分類された。膝蓋靱帯部は、トルイジンブルーで染色されなかった膝蓋靱帯のみで構成されていた。線維軟骨部は膝蓋靱帯の挿入部位であり、トルイジンブルーで薄く染色されていた。石灰化部は石灰化が強く、トルイジンブルーでは染色されなかった (図 3)。対照群 (CO) の線維軟骨部は滑らかで薄いのに対し、DR のそれは粗く厚く、線維軟骨部の前方部分が最も顕著であることが観察された。形態計測の結果、線維軟骨部分の面積やその他の形態計測値において、CO 群と DR 群の間に有意差が認められた (図 4)。

さらに、脛骨結節の隆起は DR 群で CO 群より高く、脛骨粗面直下の骨膜は厚かった。軟骨観察のために行ったサフラニン O 染色では、各群とも深部は染まっていたが、表層部は染められていなかった。サフラニン O 染色における深層前方部で比較すると、CO では肥大化した軟骨細胞が多く観察されたが、DR ではほとんどが小型の軟骨細胞であった (図 5)。

CO の深部領域の軟骨細胞の大きさは DR より有意に大きかったが

( $p=0.000009$ )、CO の深部領域の軟骨細胞数は DR より有意に少なかった ( $p=0.05$ )。 (図 6)。

### 脛骨結節の形態計測結果

DR の脛骨結節における全体 ( $p=0.005$ )、表層部 ( $p=0.037$ )、深層部 ( $p=0.04$ ) の面積は、CO に比べて有意に高かった (図 4)。また、線維軟骨部分は DR と CO で有意差があったが ( $p\leq 0.0001$ )、石灰化部分 ( $p=0.577$ ) と膝蓋腱部分 ( $p=0.057$ ) は差がなかった。さらに、DR は CO よりも骨膜が有意に厚かった ( $p=0.013$ )。

### 痛みの免疫局在と遺伝子発現解析

侵害受容線維の同定にはサブスタンス P が用いられた。DR 群では、脛骨結節上の関節軟骨がサブスタンス P に強く免疫反応した。一方、CO 群では、同じ部位の免疫反応性は弱かった (図 7a および b)。サブスタンス P に対する免疫反応性は両群とも深部に認められたが、DR 群ではより顕著であった (図 7c と d)。

Ptges ( $p=0.033$ ) と Ptgs2 ( $p=0.028$ 、PGE2 合成に関与) の遺伝子発現は、CO 群よりも DR 群で有意に上昇した。また、炎症性サイトカインの遺伝子発現は DR 群で顕著であった ( $p \leq 0.001$ 、図 8)。

## 考察

筋、腱、靱帯から骨や軟骨組織への挿入部位は、関節包と呼ばれる。骨と軟骨の挿入部位では、関節包のタイプが異なり、「線維性」と「線維軟骨性」に分類されることがよく知られている [12]。線維軟骨型は、線維軟骨を介して骨に埋め込まれている [27]。これらの報告は、挿入部位の組織学的観察が、関節包の構造的特徴を理解するために不可欠であることを示唆しており、特に線維軟骨型については、脛骨粗面の挿入部位における線維軟骨部分の理解に役立つ。内反骨に関する以前の研究では、使いすぎや誤った使用活動（偏心性収縮）によって線維軟骨の数が増加することが明らかにされている [9]。DR 群における脛骨粗面の表層部および深層部の面積は、CO 群よりも有意に高かった。このことから、大腿四頭筋の収縮が脛骨結節に与える影響は、線維軟骨部分に現れている。脛骨結節は間接型であることが確認され、DR 時の収縮は脛骨結節全体の組織構造に影響を与えると推測された。大腿四頭筋の収縮力の初期は線維軟骨部に伝達され、発育期に体重負荷が大きくなるにつれて伝達される力は増加する [23]。関節包は収縮力を分散させるだけでなく、腱や筋線維と骨との間の移行帯として機能し、直接付着するのを防いでいる [23, 28]。CO 群の線維軟骨の組織学的構造は薄く滑らかであったが、DR 群のそれは厚く、前方部分が最も顕著であった。これらの結果から、前方の線維軟骨部分は、膝蓋腱の強い収縮、DR 荷重と大腿四頭筋の収縮による機械的ストレスに抵抗できると推測される。従って、大腿四頭筋の脛骨結節に対する収縮力が、収縮の強さに応じて線維軟骨部の構造変化を誘発したものと推測された (図 9a)。さらに、DR 群の骨膜の厚さは、CO 群に比べ有意に厚かった。膝蓋腱は脛骨結節を貫通して骨膜に接続するため、DR 群では骨膜の厚さ、表層の面積がそれぞれ CO 群より有意に高かった。したがって、表層領域が大きくなると、骨膜が厚くなるだけでなく、脛骨の粗面全体も大きくなることが推察される。

成長初期は脛骨結節全体に未熟な軟骨細胞が存在し、マトリックス周辺では非石灰化の状態が維持されていた。成長期の脛骨結節は、石灰化状態とは異なる表層部と深層部が観察され、成長後期には脛骨結節全体が骨化していた。したがって、成長期における脛骨結節の構造変化は、非石灰化軟骨の正常な骨化過程として理解できる。一方、PGE2 は炎症性サイトカインと考えられており [29]、軟骨細胞の分化を阻害することが報告されている [30]。さらに、軟骨細胞の分化は PI3K/Akt シグナル伝達経路によって制御されている [31]。一般に、軟骨細胞の分化過程は、間葉系幹細胞が未熟な軟骨細胞（小軟骨細胞）に変化することから始まり [32]、未熟な軟骨細胞が成熟して肥大化した後、その周囲の軟骨基質が石灰化する [33, 34]。しかし、PKA/PKC シグナル伝達経路は、PGE 合成によって制御される軟骨細胞の分化を阻害する [21]。つまり、PGE2 は軟骨細胞の分化

と軟骨組織の石灰化を抑制することができる。本研究では、safranin O 染色の結果、各群で深部領域が確認され、DR では CO とは対照的に小さな軟骨細胞が複数観察された。したがって、DR では脛骨結節が石灰化と軟骨細胞の分化を抑制していると推測される。このことは、深部領域における遺伝子発現と形態計測に大きなばらつきがあることから支持される。深部領域は、CO よりも DR で有意に高かった。したがって、DR の脛骨結節は軟骨組織として残っており、石灰化しない状態にあると推測される。さらに、PGE2 合成に関与する Cox2 と Ptges の遺伝子[35, 36]が、DR で有意に発現していた。前述のように、PGE2 は軟骨組織の石灰化を抑制する。したがって、大腿四頭筋の偏心性収縮によって深部の軟骨細胞の分化が抑制され、その結果、脛骨結節が成長すると推測される。この過程には PGE2 合成が関与していると考えられている。

DR では、脛骨結節に有意なレベルの IL-6 が発現していた。IL-6 は炎症性サイトカインとして広く知られており、内果の炎症に関与している [9, 37]。したがって、この DR プロトコルは、脛骨結節に炎症性サイトカインを誘導すると考えられる。さらに、DR を行った脛骨結節では、自由神経終末から伝達される痛み物質として広く認識されているサブスタンス P の強い免疫局在が認められた [38]。PGE2 の主な機能は、軟骨細胞の分化抑制だけでなく、疼痛閾値のダウンレギュレーションである[38-40]。したがって、DR における脛骨結節は、OSD と同様に、炎症、疼痛、隆起によって引き起こされたと思われる。さらに、DR における深部領域と関節軟骨のサブスタンス P の強い反応には、関節包の力学的機能が関与していると考えられる。関節包の線維軟骨は機械的応力によって変動し、線維軟骨は引張、せん断、圧縮力から関節包を保護することが知られている[15, 41]。我々は、膝蓋腱の収縮力には線維軟骨の構造変化が関与していると考えた。深部は軟骨組織のみで構成されており、膝蓋腱は埋没していなかった。この点から、この部位には収縮力の代わりに剪断力が作用していると推測された (図 9b)。遺伝子発現から、大腿四頭筋のエキセントリック収縮により、炎症性サイトカインと Ptges (石灰化の抑制に関与) の発現が上昇することが明らかになった。さらに、DR では膝蓋腱後方の関節軟骨がサブスタンス P と反応することが示された。したがって、大腿四頭筋の収縮により膝蓋腱が後方に圧迫されることで、前方の関節軟骨に摩擦が生じたと考えられる。しかし、機械的ストレスを軽減する環境は、軟骨の石灰化を促進する[42, 43]。OSD の症状は、深部の石灰化を抑制し、線維軟骨部分の石灰化を促進することに関与していると考えられている。

OSD の治療法や予防法はまだ確立されていないが、反復的な偏心性収縮によって脛骨結節に OSD が誘発されることは明らかである。以前の研究では、ラットの DR 中に偏心性収縮が起こることが報告されており、今回の研究でもそれが

実施された。本研究は、OSD 構造の解明に貢献し、OSD の治療と予防に道を開くことを目的とする。とはいえ、この研究にはいくつかの限界がある。OSD は特に活動的な思春期の男児によく見られるが、本研究ではラットしか使用していない。脛骨結節 DR の構造はヒトとラットで比較的類似しているが、回復過程が同じかどうかは不明である。この疑問を解決するためには、さらなる研究が必要である。

## REFERENCES

- [1]. Watanabe, H. *et al.* Pathogenic factors associated with Osgood-Schlatter disease in adolescent male soccer players: a prospective cohort study. *Orthop. J. Sports Med.* 6, 2325967118792192 (2018).
- [2]. Gholve, P. A., Scher, D. M., Khakharia, S., Widmann, R. F. & Green, D. W. Osgood Schlatter syndrome. *Curr. Opin. Pediatr.* 19, 44–50 (2007).
- [3]. Kaya, D. O., Toprak, U., Baltaci, G., Yosmaoglu, B. & Ozer, H. Long-term functional and sonographic outcomes in Osgood-Schlatter disease. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 21, 1131–1139 (2013).
- [4]. Narayan, N., Mitchell, P. D. & Latimer, M. D. Complete resolution of the symptoms of refractory Osgood-Schlatter disease following percutaneous fixation of the tibial tuberosity. *BMJ Case Rep.* 2015, bcr2014206734–bcr2014206734 (2015).
- [5]. Gawel, E. & Zwierzchowska, A. Therapeutic interventions in Osgood-Schlatter disease: a case report. *Med. (Baltim.)* 100, e28257 (2021).
- [6]. Ladenhauf, H. N., Seitzlinger, G. & Green, D. W. Osgood-Schlatter disease: a 2020 update of a common knee condition in children. *Curr. Opin. Pediatr.* 32, 107–112 (2020).
- [7]. Falciglia, F., Giordano, M., Aulisa, A. G., Poggiani, A. & Guzzanti, V. Osgood Schlatter lesion: histologic features of slipped anterior tibial tubercle. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 24 Supplement 2, 25–28 (2011).
- [8]. Sudoł-Szopińska, I., Kwiatkowska, B., Prochorec-Sobieszek, M. & Maśliński, W. Enthesopathies and enthesitis. Part 1. Etiopathogenesis. *J. Ultrason.* 15, 72–84 (2015).

- [9]. Ozone, K. *et al.* Structural and pathological changes in the enthesis are influenced by the muscle contraction type during exercise. *J. Orthop. Res.* 40, 2076–2088 (2022).
- [10]. Lui, T. H. Endoscopic management of Osgood-Schlatter disease. *Arthrosc. Tech.* 5, e121–e125 (2016).
- [11]. Vaishya, R., Azizi, A. T., Agarwal, A. K. & Vijay, V. Apophysitis of the tibial tuberosity (Osgood-Schlatter disease): a review. *Cureus* 8, e780 (2016).
- [12]. Apostolakos, J. *et al.* The enthesis: a review of the tendon-to-bone insertion. *Muscles Ligaments Tendons J.* 4, 333–342 (2014).
- [13]. Isner-Horobeti, M. E. *et al.* Effect of eccentric versus concentric exercise training on mitochondrial function. *Muscle Nerve* 50, 803–811 (2014).
- [14]. Komori, T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem. Cell Biol.* 149, 313–323 (2018).
- [15]. Roffino, S. *et al.* Negative impact of disuse and unloading on tendon enthesis structure and function. *Life Sci. Space Res. (Amst)* 29, 46–52 (2021).
- [16]. Li, X. *et al.* Prostaglandin E2 and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 513–523 (2009).
- [17]. Smith, W. L., Garavito, R. M. & DeWitt, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271, 33157–33160 (1996).
- [18]. Ebisawa, K. *et al.* Ultrasound enhances transforming growth factor beta-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 10, 921–929 (2004).

- [19]. Odgren, P. R., Witwicks, H. & Reyes-Gutierrez, P. The cast of clasts: catabolism and vascular invasion during bone growth, repair, and disease by osteoclasts, chondroclasts, and septoclasts. *Connect. Tissue Res.* 57, 161–174 (2016).
- [20]. Song, H. & Park, K. H. Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration. *Semin. Cancer Biol.* 67, 12–23 (2020).
- [21]. Li, T. F. *et al.* PGE2 inhibits chondrocyte differentiation through PKA and PKC signaling. *Exp. Cell Res.* 300, 159–169 (2004).
- [22]. Soslowky, L. J. *et al.* Neer award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. *J. Shoulder Elbow Surg.* 9, 79–84 (2000).
- [23]. Suito, H., Zheng, X., Minamizono, W. *et al.* Structural changes in attaching sites of tendon of femoral quadriceps muscle in growing rats. *Toyo Univ. Acad. Resour.* 57, 185–195 (2021).
- [24]. Kiviranta I., Jurvefin J., Tammi M., *et al.* Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry* 82, 249–255 (1985).
- [25]. Suito, H., Zeng, X., Minamizono, W. *et al.* The histological influence to periosteum under the tibial tuberosity by increase of mechanical load with aging in rats. *Toyo Univ. Acad. Resour.* 58, 263–270 (2022).
- [26]. Livak K & Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) method. *National Library of Medicine* 25, 402–408 (2001)

- [27].Lu, H. H. & Thomopoulos, S. Functional attachment of soft tissues to bone: development, healing, and tissue engineering. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 15, 201–226 (2013).
- [28].Benjamin, M. *et al.* The skeletal attachment of tendons--tendon "entheses". *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 133, 931–945 (2002).
- [29].Livshits, G. & Kalinkovich, A. Hierarchical, imbalanced pro-inflammatory cytokine networks govern the pathogenesis of chronic arthropathies. *Osteoarthr. Cartil.* 26, 7–17 (2018).
- [30].Clark, C. A. *et al.* Prostaglandin E2 inhibits BMP signaling and delays chondrocyte maturation. *J. Orthop. Res.* 27, 785–792 (2009).
- [31].Henrotin, Y. E., Bruckner, P. & Pujol, J. P. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 11, 747–755 (2003).
- [32].Lefebvre, V. & Smits, P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 75, 200–212 (2005).
- [33].Alini, M., Kofsky, Y., Wu, W., Pidoux, I. & Poole, A. R. In serum-free culture thyroid hormones can induce full expression of chondrocyte hypertrophy leading to matrix calcification. *J. Bone Miner. Res.* 11, 105–113 (1996).
- [34].Stanton, L. A., Sabari, S., Sampaio, A. V., Underhill, T. M. & Beier, F. p38 MAP kinase signalling is required for hypertrophic chondrocyte differentiation. *Biochem. J.* 378, 53–62 (2004).
- [35].Hu, H. *et al.* Emodin protects knee joint cartilage in rats through anti-matrix degradation pathway: an in vitro and in vivo study. *Life Sci.* 269, 119001 (2021).

- [36]. Tong, D. *et al.* The roles of the COX2/PGE2/EP axis in therapeutic resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 37, 355–368 (2018).
- [37]. Watad, A., Cuthbert, R. J., Amital, H. & McGonagle, D. Enthesitis: much more than focal insertion point inflammation. *Curr. Rheumatol. Rep.* 20, 41 (2018).
- [38]. Zhang, R. Y. *et al.* Electroacupuncture alleviates inflammatory pain via adenosine suppression and its mediated substance P expression. *Arg. Neuro Psiquiatr.* 78, 617–623 (2020).
- [39]. Kawabata, A. Prostaglandin E2 and pain--an update. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1170–1173 (2011).
- [40]. Samad, T. A., Sapirstein, A. & Woolf, C. J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends Mol. Med.* 8, 390–396 (2002).
- [41]. Shaw, H. M. & Benjamin, M. Structure-function relationships of entheses in relation to mechanical load and exercise. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 17, 303–315 (2007).
- [42]. Zeng, X., Suito, H., Minamizono, W. *et al.* Effects of different forms of exercise on structures of tibial articular cartilage in rats. *Bulletin of the Graduate School (Toyo Univ., 2021)* 57:197–209.
- [43]. Kita, K., Kimura, T., Nakamura, N., Yoshikawa, H. & Nakano, T. PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation. *Genes Cells* 13, 839–850 (2008).

## 7. 謝辞

謝辞 本稿は、東洋大学学術論文投稿助成事業の助成を受けた。

この研究内容は **Scientific reports** において既に掲載されている (IF : 4.996)。

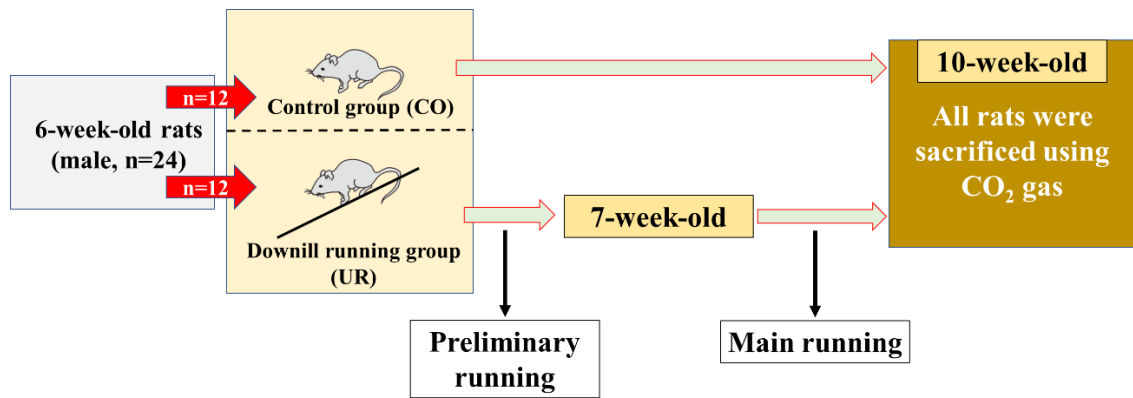


図 1.簡略化した模式図

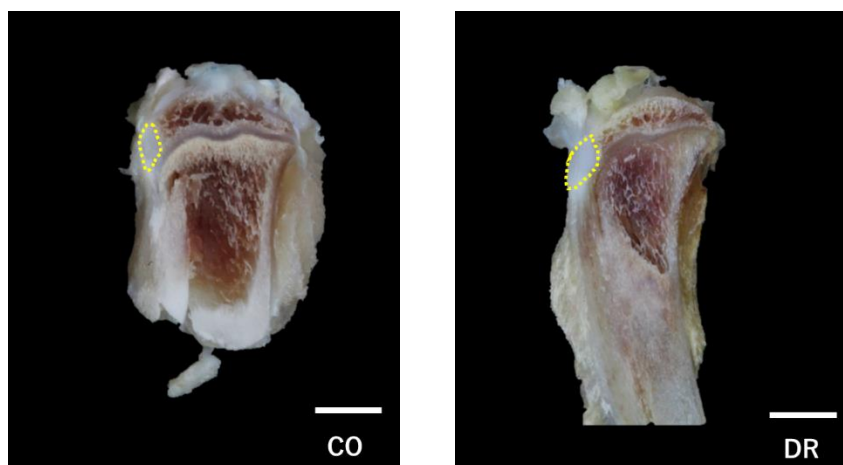


図 2.脛骨粗面の肉眼解剖 (bar=3mm, 肉眼解剖標本)

黄色枠内：脛骨粗面

a-d; Control (CO), e-h; Downhill Running (DR)

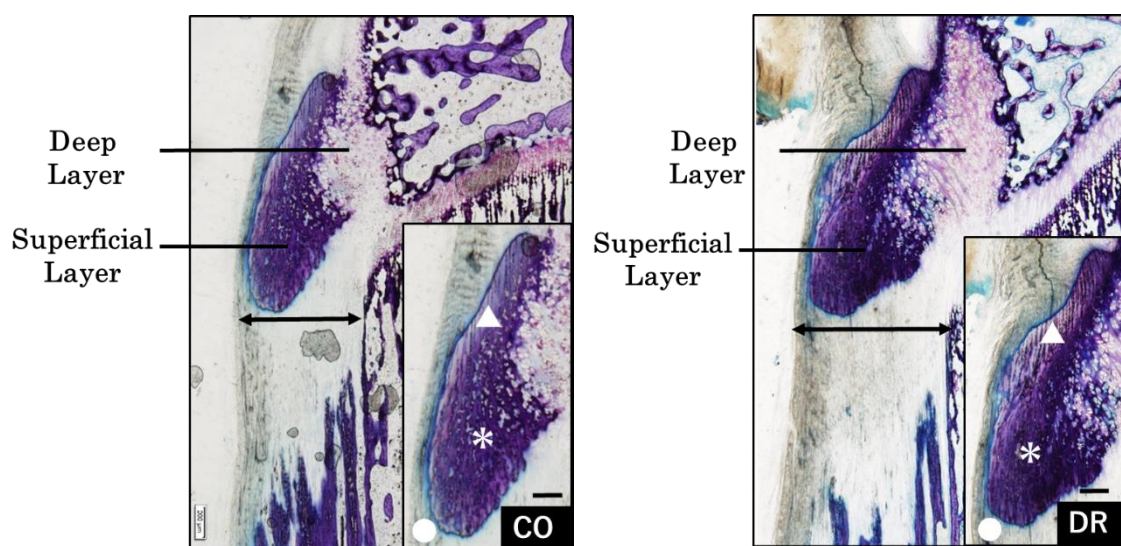


図 3.脛骨粗面の基本構造 (bar=100 $\mu$ m, 非脱灰リゴラック樹脂研磨標本, トルイジンブルー染色)

▲＝線維軟骨部、＊＝石灰化部、○＝骨膜

a-d; Control (CO), e-h; Downhill Running (DR)

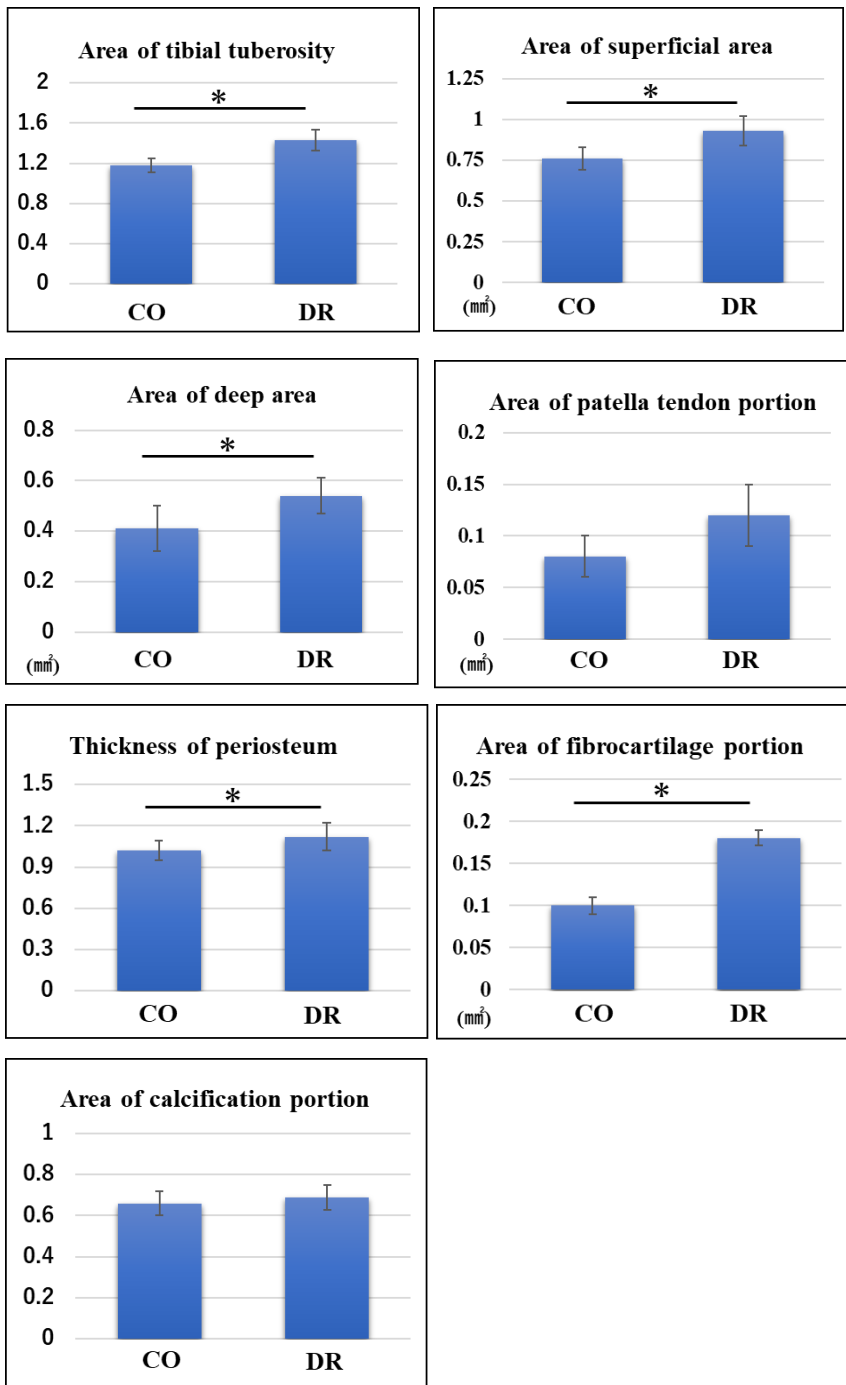


図 4.脛骨粗面における形態計測

\* :  $p < 0.05$

a-d; Control (CO), e-h; Downhill Running (DR)

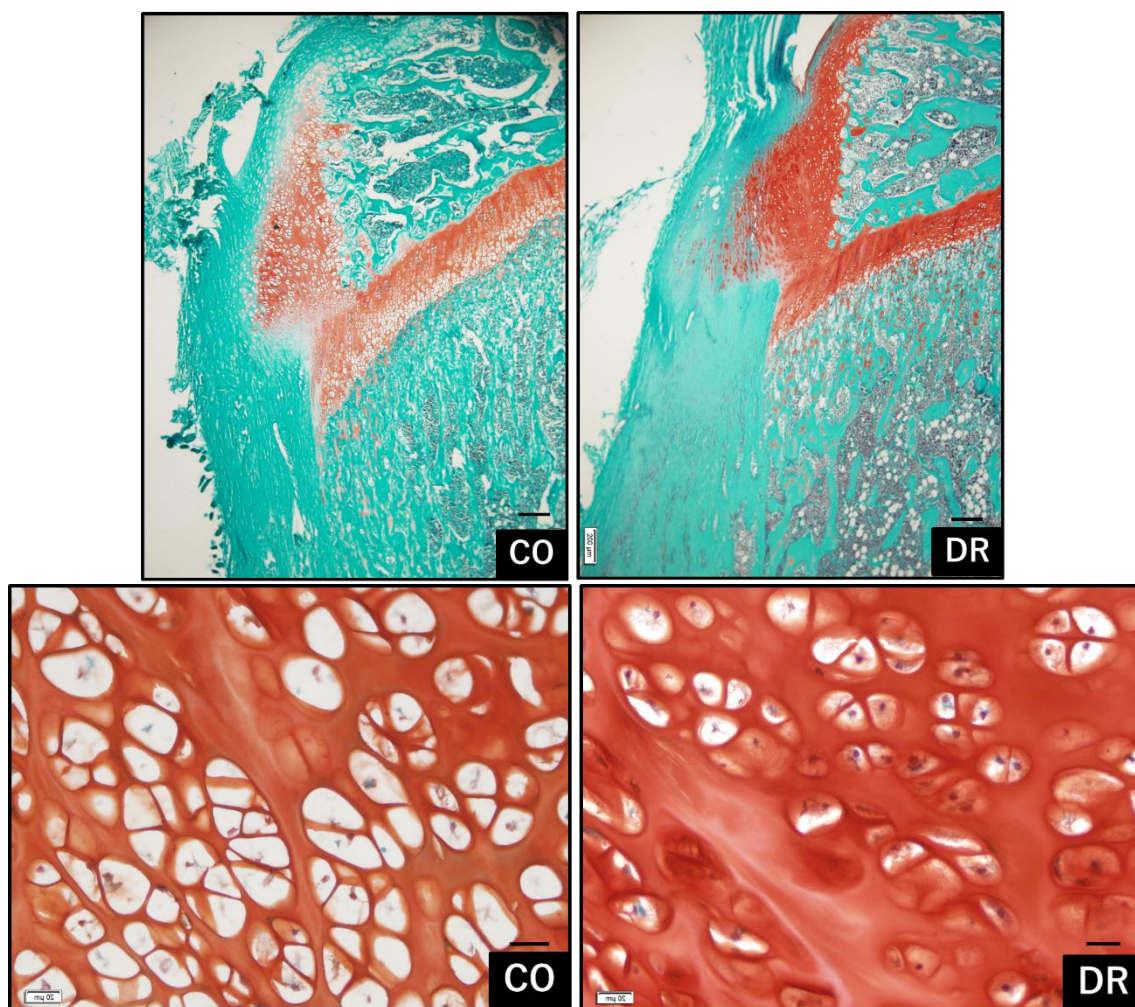


図 5.深層内の軟骨細胞の比較 (bar=上段 200 $\mu$ m, 下段 20 $\mu$ m, 脱灰パラフィン切片, サフラニン O 染色)

a-d; Control (CO), e-h; Downhill Running (DR)

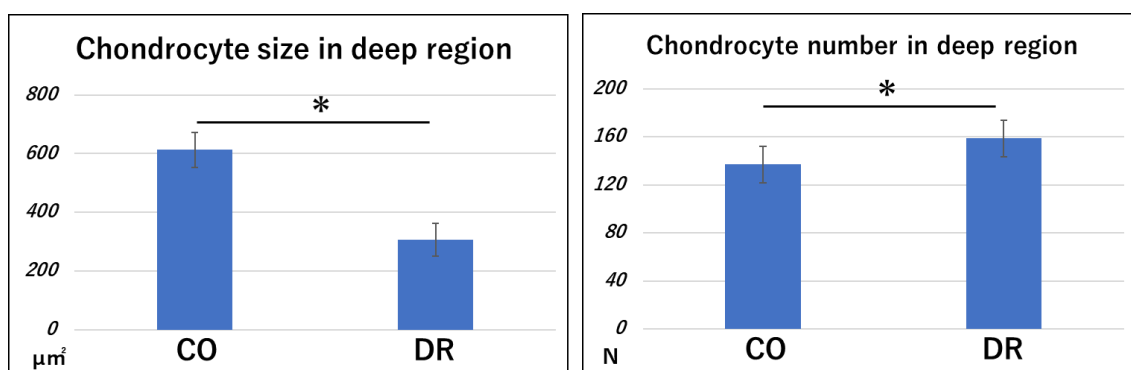


図 6.深層軟骨細胞の形態計測

a-d; Control (CO), e-h; Downhill Running (DR)

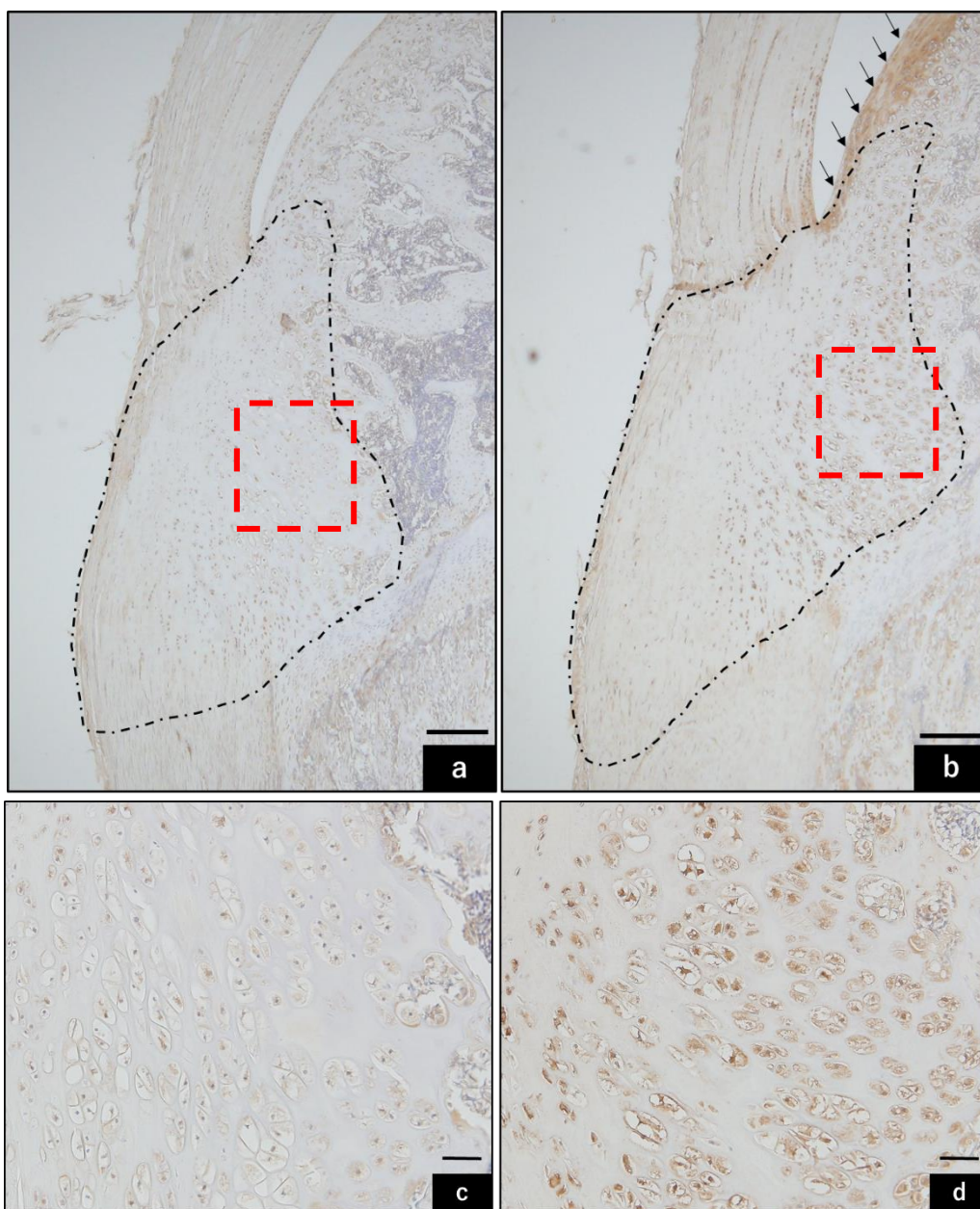


図 7. 疼痛物質の免疫局在 (bar=200 $\mu$ m 上段, 50 $\mu$ m, a and c=CO, b and d=DR)  
a, c; Control (CO), b, d; Downhill Running (DR)

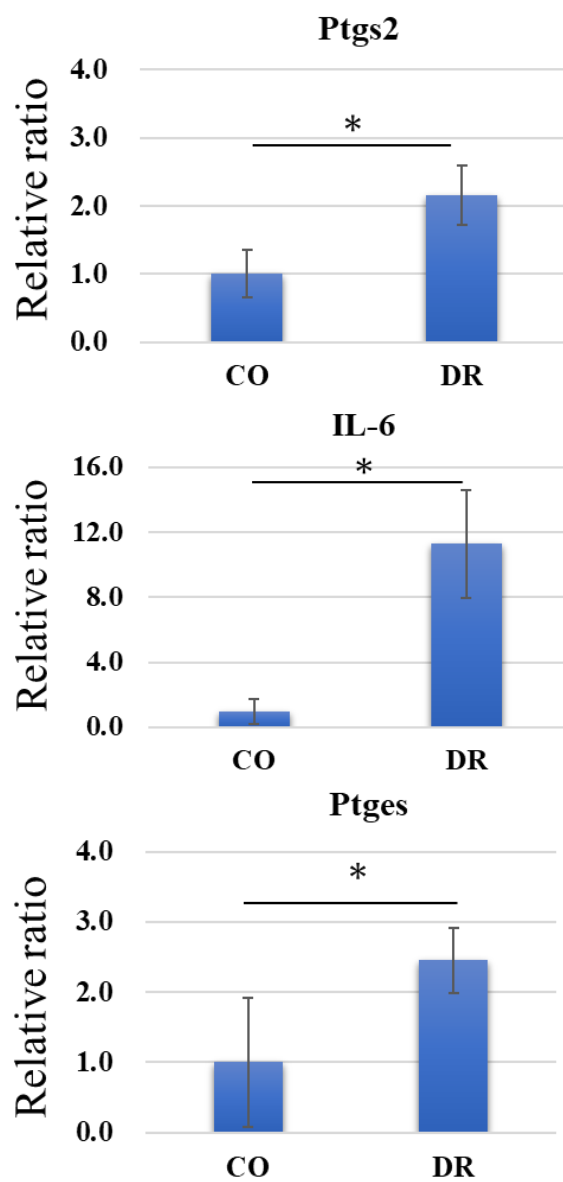


図 8.脛骨粗面における遺伝子発現解析

P=<0.05

a-d; Control (CO), e-h; Downhill Running (DR)

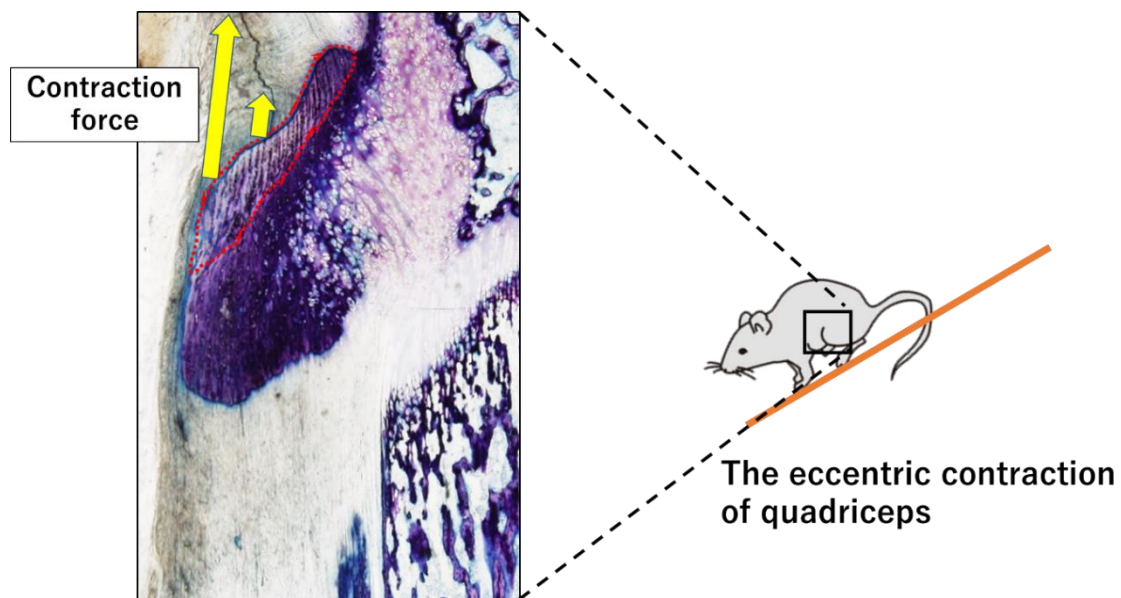


図 9a.線維軟骨部の構造からみる機械的刺激の伝達力の違い

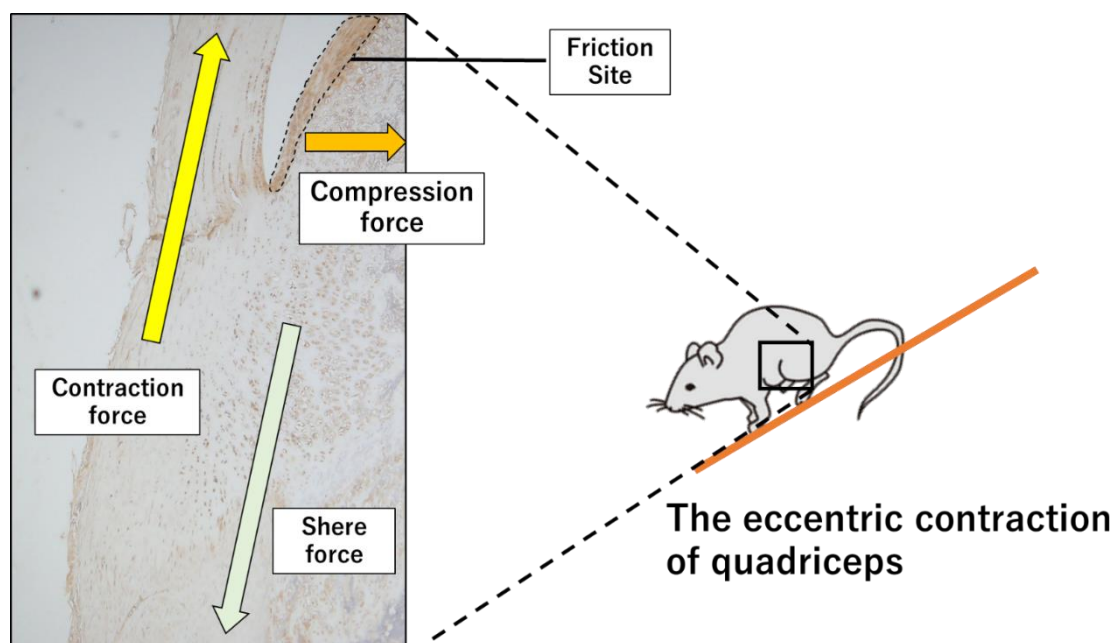


図 9b.疼痛物質の局在からみた力学的ストレスの概念図

## 第5章

### ラット脛骨粗面の石灰化に及ぼす荷重軽減の影響

#### 要約

脛骨粗面には、膝蓋靱帯が埋入された表層と未石灰化軟骨が形成されている深層が存在する。オスグッド・シュラッター病は、脛骨粗面の石灰化が抑制されるために発症する。また、脛骨粗面は加齢とともに石灰化する。一方で、荷重の減少は軟骨マトリックスを分解し、石灰化を促進することから、脛骨粗面への機械的刺激が減少することで石灰化が促進されると思われる。しかし、この仮説はまだ証明されていない。そこで我々は、機械的刺激軽減が脛骨粗面の組織構造と石灰化メカニズムに及ぼす影響を調べることを目的とした。7週齢のWistar系雄性ラット20匹を後肢懸垂群(HS、 $n=10$ )と対照群(CO、 $n=10$ )に分け、荷重軽減が脛骨粗面の石灰化に及ぼす影響を調べた。両群で脛骨粗面の表層と深層が観察観察された。HSの脛骨粗面はCOに比べて深層の領域が狭く( $p=0.000539$ )、HSでは軟骨組織に加えて未熟な骨組織も観察された。さらに、Enpp1の発現は群間で有意な差は認められなかったが( $p=0.804$ )、HSではAlpl( $p=0.001$ )とMmp3( $p=0.006$ )の発現が増加した。その一方で、Timp3の遺伝子発現は減少していた( $p=0.002$ )。この遺伝子発現の傾向は、関節軟骨の石灰化と骨化を伴う変形性関節症モデルラットにおけるものと類似していた。また、HSの脛骨粗面には未熟な骨組織が認められた。この研究の結論として、機械的刺激の減少は脛骨粗面の異常な石灰化による病理学的な変化を引き起こしたと考えられた。これらの所見は、機械的刺激の減少が脛骨粗面病理学的構造変化を導くため、適度な運動が重要であることを強調している。

## 背景

脛骨粗面は、膝蓋靭帯を介して大腿四頭筋の線維内に埋め込まれている(Suito et al., 2022)。硬組織における靭帯線維の埋入部位は「*enthesis*」と呼ばれ、主に線維軟骨、線維芽細胞、コラーゲン線維によって構成されている(Apostolakos ら、2014)。組織学的には、脛骨粗面は表層（膝蓋腱の線維が埋まっている）と深層（硝子軟骨で形成されている）から構成されている(Suito et al., 2021)。成長初期の脛骨粗面深層は未熟な軟骨細胞から形成され、深層の軟骨基質は非石灰化であるが(Suito et al. 2021)、その部位は最終的に骨化する。これらの事実から、加齢に伴う機械的ストレスの増加が、脛骨粗面の発達に関与していると推測される。

オスグッド・シュラッター病 (OSD) は、脛骨粗面のスポーツ障害として広く認知されており(渡辺ら、2018)、隆起、炎症、疼痛を特徴とする(Gholve ら、2007)。OSD の治療には、アイシング、ギプスによる膝関節固定、運動制限、非ステロイド性抗炎症薬による炎症抑制などがあり、なかでも運動制限と膝関節固定は他よりも使用頻度が高い(Smith & Varacallo, 2019)。しかし、思春期の旺盛な骨格成長は運動制限によって損なわれるため、OSD の発症は予防すべきである。近年、ラットダウンヒルランニング実験後の脛骨粗面が OSD の脛骨粗面の状態と類似していることが報告された(Suito ら、2023)。その実験において、OSD は深層の石灰化が抑制されることにより、脛骨粗面全体の過剰な形成と関連していた。加えて、下り坂のランニングは、脛骨粗面の線維軟骨部(表層上部)の石灰化面積を増加させていた。我々は、脛骨粗面における機械的ストレスの増大が、線維軟骨部と深層部の組織学的構造に影響を与えると結論づけた。対照的に、別の研究では、機械的応力が減少すると、深部の関節(ヒアリン)軟骨マトリックスが分解されると報告している(Zeng ら、2022 年)。さらに、OA では軟骨マトリックスの分解後に関節軟骨が骨化することが知られている(Fang ら、2018)。したがって、機械的ストレスが減少すると、ヒアルロン酸軟骨が骨組織に置き換わると推測される。

硝子軟骨の基質は、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) と組織メタロプロテアーゼ阻害タンパク (TIMPs) の活性のバランスによって維持されており、MMP 活性の上昇や TIMP 活性の低下によって軟骨基質は破壊される(Chubinskaya ら、1999 ; Hemmati-Sadeghi ら、2018)。対照的に、硝子軟骨の石灰化は、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ-1 (ENPP1) と組織非特異的アルカリホスファターゼ (TNAP) によって制御されている。生体内の軟骨マトリックスの石灰化は、ENPP1 によって常に抑制されている(Jin et al.) ENPP1 は ATP からピロリン酸 (PPi) と AMP を生成する(Maulding ら、2021) ; PPi はアパタイト形成を抑制する。しかし、ENPP1 が変

異すると (Zhang ら、2007 年)、TNAP が活性化され、PPi を無機リン酸 (Pi) に変換する。Pi はアパタイトを形成し、in vivo での組織石灰化を促進することが知られている (Anderson ら、2004 ; Darrieutort-Laffite ら、2023)。一方で、軟骨細胞のメカノセンサーは、Piezo1 と transient receptor potential subfamily vanilloid member 4 (TRPV4) を発現している (Ren ら、2022 ; Xu ら、2019)。先行研究では、Piezo1 と TRPV4 は OA 発症において発現が低下すると報告されている (Lawhorn ら、2020 ; Wang ら、2022)。これらの研究は、脛骨粗面への機械的刺激を変化させることで、脛骨粗面の石灰化に影響を及ぼすことが推測される。しかし、この過程における遺伝子発現の変化は、依然として不明である。

そこで本研究では、機械的刺激の減少が脛骨粗面の組織構造に及ぼす影響を明らかにし、石灰化の基礎となるメカニズムを解明することを目的とした。

## 材料および方法

### ARRIVE guidelines

本試験は、ARRIVE2.0 ガイドラインの Essential 10 に従って実施した。各項目の詳細を以下に示す。

### Animals

本研究では、ヒトの思春期に相当する Wistar 系雄性ラット (7 週齢) を用いた。7 週齢のラットの脛骨粗面は未熟であり、この年齢のラットは OSD のモデルに用いられている (Suito ら、2023)。ラットは日本バイオサプライセンタ (東京、日本) から特定の病原体フリー条件下で調達し、運動実験用に遺伝子組換えをしなかった。実験終了時に測定した体重を標準偏差とともに表 1 に示す。20 匹のラットを後肢懸垂群 (HS ; n=10) と対照群 (CO ; n=10) に分けた。ケージあたり 2 匹までのラットを収容し、水と餌 (オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本) を自由に摂取できるようにした。HS 群のラットは後肢が床に触れないようにクリップで尾を天井から吊るした。ただし、餌と水は床に触れることなく自由に摂取できるようにした。後肢の懸垂中に過度の虚血を防ぐために綿を使用した。3 週間の実験期間終了後、すべてのラットを炭酸ガスで犠牲にした (図 1)。実験は東洋大学朝霞キャンパス (海拔約 7m) で行い、東洋大学大学院ヒューマンライフデザイン研究科動物実験・研究倫理委員会 (東京都、第 2022-06 号) の承認を得た。

### Inclusion and exclusion criteria and randomization

本実験で使用したすべてのラットを解析対象とした。すべてのラットの右肢を組織学的解析に用い (n = 10)、左肢を骨形態計測と遺伝子発現解析に用いた

(各  $n = 5$ )。さらに、1~20 の数字が不規則に並んだ抽選カードと各群 10 枚の選別カードを用いて動物の選別を行った。さらに、カードの番号に従ってラットを選別した。

実験と結果の初期評価は平井翠人が行い、藤川薫と大迫正史と結果を共有したが、グループ名は明らかにされなかった。

#### Non-decalcified specimens

非脱灰標本は、リゴラック樹脂 (3801TB12T ; 日新 EM、東京) に包埋後、薄く粉砕し、1% トルイジンブルー染色で 45 秒間定性観察した。形態計測は、GMA 樹脂 (086-04385 ; 富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本) 中の標本切片に用い、全自動回転式ミクロトーム (RM2255 ; Leica、Nussloch、ドイツ) を用いて矢状面に沿って切片化した (厚さは  $4\mu\text{m}$ )。組織形態計測法を用いて、前後方向の線維軟骨部分の面積と長さを測定した。その後、石灰化した線維軟骨部分の面積を測定した。さらに、脛骨結節を骨膜の厚さ、深部と表層の 3 つの位置で測定した (各群で測定、 $n=5$ )。

#### Decalcification of sections

パラフィン (415-25791 ; 富士フイルム和光純薬) に包埋し、切片化する 3 週間前に、8% EDTA (349-01863 ; 同仁堂、熊本、日本) を用いて標本を脱灰した。脱灰した標本は、REM-710 レトラトーム (ヤマト、埼玉県) を用いて矢状面に沿って  $4\mu\text{m}$  で切片化した。切片は、サフラニン O 染色を 5 分間行った後、光学顕微鏡 (BX53 ; OLYMPUS、東京、日本) で観察した。

#### Immunohistochemistry

まず、パラフィン切片を、キシレンを用いて脱パラフィンした。その後、Collagen type 10 および TNAP (両者ともに 300 倍) に、ヒアルロニダーゼ (18240-36; Nacalai Tesque, Inc. 反応終了後、Alexa Fluor 488 (ab150077; Abcam) を用いて  $25^{\circ}\text{C}$  で 30 分間処理した。最後に、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, ab104139; Abcam) を用いて核染色を行った。

#### Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR)

まず、TRIzol 試薬 (15596026; Thermo Fisher Scientific, Chiba, Japan) を用いて脛骨結節から全 RNA を抽出した。cDNA は、iScript gDNA Clear synthesis kit (172530; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて、260/280 nm の励起/発光における吸光度を確認した後、製造者の指示に従って合成した。RT-qPCR は、CFX96 リアルタイムシステム (Bio-Rad Laboratories) を用い、TaqMan プ

ローブ (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。PCR 条件は以下の通り：95 °C で 20 秒間の初期変性、95 °C で 15 秒間の変性、60 °C で 1 分間の最終伸長を 40 サイクル行った。Rn45S mRNA を内部コントロールとして用いた。相対発現量は  $\Delta\Delta\text{CT}$  法 (Livak & Schmittgen, 2001) を用いて算出した。

#### Statistical analysis

統計解析は SPSS version 26 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)を用いて行った。2 群間の検定に対応のない t 検定を行った。さらに、ピアソン積率相関係数を用いた相関分析を行った。結果は  $p<0.05$  で統計的に有意とみなされた。

## 結果

実験動物の微生物学的状態と体重を ARRIVE チェックリストに従って記録した (表 1)。CO 群および HS 群の動物の平均体重は、それぞれ  $292.3 \pm 4.5\text{g}$  および  $273 \pm 12.5\text{g}$  であった。

### Comparison of tibial tuberosity histology

両群の脛骨粗面では表層と深層が観察された (図 2)。表層の上部には両群とも石灰化した線維軟骨部が形成されていた。一方、CO の深層は、HS よりも広い非石灰化軟骨を示し、後者における深層の組織学的観察では未石灰化軟骨と未熟な骨組織の両方が認められた (図 2)。HS の線維軟骨と骨膜は CO 群のよりも薄かった。トルイジンブルー染色では、CO の脛骨粗面深層は軟骨基質にメタクロマシアを認めたが HS では認められなかった。サフラニン O は両群の深層に染色されたが、HS ではその染色領域が狭く観察された (図 3)。

### Load reduction promotes ossification in the tibial tuberosity

HS の脛骨粗面全体と深層の面積は CO より有意に小さかった ( $p = 0.000539$ ) が、表層の面積は有意に変化しなかった ( $p = 0.469$ ) (図 4a-c)。注目すべきは、脛骨粗面全体において、CO における深層の面積が 38% を占めていたのに対し、HS 群では 11% に減少していたことである (図 4d)。さらに、HS の骨膜の厚さは CO のそれよりも有意に薄く ( $p \leq 0.01$ ) (図 4e)、脛骨粗面全体の面積と正の相関を示した ( $r = 0.982$ )。線維軟骨部の長さは、HS において面積が減少したが ( $p = 0.028$ )、有意な変化はなかった ( $p = 0.866$ ) (図 4f, g)。特筆すべきことに、CO と HS 群では、脛骨結節全体と深部の面積の間に正の相関が観察された ( $r = 0.902$ )。

### Matrix degradation and promotion of calcification in the tibial tuberosity

CO における脛骨粗面の深層および線維軟骨部には TNAP 免疫反応性は認められなかった (図 5a-c、および g-i)。一方、HS では、深層および線維軟骨部に TNAP の免疫局在が観察された (図 5d-f, j, l)。HS における Enpp1 の発現は、いずれの群においても有意な変化は認められなかった (図 6a)。しかし、HS における Alpl (TNAP をコードする) と FGF23 の発現レベルは CO 群よりも高かった (図 6b と c)。Enpp1 と Alpl の発現レベルには相関はなかった ( $r = 0.111$ ,  $p = 0.76$ )。対照的に、HS では CO に比べ、Mmp3 の発現量が増加し、Timp3 の発現量が減少していた (図 6d および e)。前述の相関とは異なり、Mmp3 と Timp3 の発現は負の相関を示した ( $r = -0.830$ ,  $p = 0.003$ )。さらに、Trpv4 発現はいずれの群でも有意な変化はなかった (図 6f,  $p = 0.435$ )。しかし、Piezo1 の発現は HS で有意に増加した (図 6g,  $p = 0.001$ )。さらに、Piezo1

と Trpv4 発現は有意な相関を示さなかった ( $r = 0.507$ ,  $p = 0.134$ )。さらに、各遺伝子の発現量間の相関係数を算出した (図 7)。Enpp1 の発現量は、Alpl を含む他の遺伝子の発現量と有意な差はなかった。しかし、Alpl の発現は、Mmp3 ( $r = 0.876$ ,  $p = 0.001$ ) や Timp3 ( $r = -0.758$ ,  $p = 0.011$ ) といった軟骨マトリックスの分解に関与する因子の発現 ( $p = 0.001$ ) と有意な相関を示した。Alpl と Piezo1 の発現量にも有意な正の相関が認められた ( $r = 0.917$ ,  $p = 0.0002$ ) が、Alpl と Trpv4 の発現量には有意な相関は認められなかった ( $r = 0.419$ ,  $p = 0.229$ )。メカノセンシングと基質分解に関与する遺伝子の発現量の相関については、Piezo1 は Mmp3 の発現量と有意な正の相関 ( $r = 0.769$ ,  $p = 0.009$ ) を示し、Timp3 の発現量とは有意な負の相関 ( $r = -0.783$ ,  $p = 0.007$ ) を示した。さらに、Alpl ( $r = 0.639$ ,  $p = 0.047$ )、Mmp3 ( $r = 0.871$ ,  $p = 0.001$ )、Piezo1 ( $r = 0.672$ ,  $p = 0.033$ ) の発現レベルは、Fgf23 の発現レベルと正の相関を示した。

## 考察

本研究における HS は、未成熟な骨組織を形成していた。entheses は組織学的構造の違いから線維性と線維軟骨性に分類される。線維性タイプでは、コラーゲン線維は骨幹部の骨膜に埋め込まれているのに対し、線維軟骨性タイプでは、コラーゲン線維は骨端に埋め込まれている。特に線維軟骨型は、組織への機械的ストレスの影響を反映し、線維軟骨の石灰化として現れる(Apostolakos et al., 2014)。脛骨粗面に埋め込まれた膝蓋靱帯の線維は、石灰化した線維軟骨として現れる。したがって、脛骨粗面は機械的ストレスに対して過敏であり、後肢懸垂中の機械的ストレスの低下は、脛骨粗面の組織学的構造に影響を及ぼすと推定される。脛骨粗面の深層は、加齢とともに骨組織に置換される。注目すべきは、以前の研究で、OSD のラットモデルでは、前方の線維軟骨部が厚く観察されたことである。(Suito ら、2023)。我々は、この構造が大腿四頭筋の収縮力や運動強度に関連していると仮定した。そのため、機械的ストレスを変動させることで、深層および線維軟骨部の構造への影響を解析することができた。この仮説と一致して、HS では CO と比較して、深層と線維軟骨部に有意差が認められた。これまでの研究で、負の負荷は腱の弾性を低下させることが示されている(Almeida-Silveira et al., 2000)。さらに、この状態は、entheses にかかる機械的ストレスを減少させることが知られている(de Boer et al., 2007)。これらの結果から、荷重軽減は脛骨粗面の組織学的構造に影響を与え、石灰化を促進させることが示唆された。OSD 患者は脛骨粗面への負荷を軽減するために、安静治療がしばしば用いられている (Harold & Nathan, 2018)。これらの知見は、荷重軽減が脛骨粗面の石灰化に影響を与え、OSD 治療を助けるという観察を支持するものである。我々の研究では、OSD が深部の石灰化を抑制することが示された。しかし、HS において脛骨粗面に未熟な骨組織が観察された事実は無視できない。OSD は過度の運動によって引き起こされるため (Gawel & Zwierzchowska, 2021)、治療後、患者は徐々に運動活動に参加するようになると推測される (Guldhammer et al.) これらの事実から、OSD における機械的刺激を減らした治療は、未熟な骨組織を作るため、運動量の多いアスリートには不向きであると考えられる。

脛骨粗面の大きさは深層の面積に依存し、深層の石灰化が抑制されると脛骨粗面が大きく形成される。典型的な例が OSD であり、脛骨粗面の石灰化に関する研究は、その病態を理解する上で重要である。さらに、病的な石灰化、例えば動脈の石灰化にも TNAP 発現の増加が関与している。関節の石灰化も例外ではなく、TNAP は石灰沈着性腱炎の発症と関連している (Gosens & Hofstee, 2009)。このように、TNAP は石灰化を促進するようである。本研究では、TNAP は線維軟骨と深部の周囲に出現した。先に示したように、HS では線維軟

骨部の面積が増加したのに対し、深層の面積は減少した。以上の観察から、HS による荷重軽減が線維軟骨部および深層の石灰化を促進したと推測された。中でも深層の面積は脛骨粗面の成長を左右し、脛骨結節内の深部の割合は将来の大きさを決定する重要な因子である。今回の研究では、脛骨結節内の深部の割合は、CO 群では 38%であったのに対し、HS 群ではわずか 11%に減少した。したがって、荷重軽減により、脛骨結節の発育は予想より早く完了するようである。骨膜の厚さと脛骨結節全体の面積との間にも正の相関が認められた。これらの所見は、骨膜と深部が脛骨結節の成長を決定する重要な因子であることを示唆している。

我々は、基質分解因子のレベルによって示されるように、HS の脛骨粗面は異常で脆弱であるという仮説を立てた。MMP-3 は軟骨マトリックスを分解することが知られており、OA 初期に合成される (Chen ら、2014 ; Shi ら、2016)。しかし、MMP-3 の機能は TIMP-3 によって常に阻害されている (Bhattacharjee & Katti, 2022; Tong et al.) したがって、軟骨基質は、MMP-3 レベルの増加および／または TIMP-3 発現の減少時に分解される。HS の脛骨粗面では、Mmp3 は発現上昇していたが、Timp3 は発現低下していた。さらに、Mmp3 と Timp3 の発現は負の相関を示した。したがって、HS の脛骨粗面の深層では軟骨基質の分解が亢進していると考えられる。さらに、深層の面積が脛骨粗面の成長を決定し、脛骨粗面内の深部の割合が将来の大きさを決定する重要な因子であることから、HS の脛骨粗面は発育を促進していると考えられた。しかし、この過程は OA 発生のそれと似ている。

Alpl の発現と軟骨マトリックスの分解に関与する遺伝子の発現との間に観察された相関関係は、上記の仮説を支持するものである。本研究では、Alpl と Mmp3 の発現の間に有意な正の相関が観察され、Alpl と Timp3 の発現の間には負の相関が観察された。すなわち、脛骨結節では軟骨基質の分解によって石灰化が促進される可能性があり、Mmp3 のアップレギュレーションと Timp3 のダウンレギュレーションは OA などの異常な状態を反映している。したがって、脛骨結節の軟骨基質の分解が、石灰化が促進されている状態を把握することができる。ENPP1 は生体内で石灰化を制御する重要な因子である。ENPP1 は ATP を AMP と PPi に分解し、PPi は石灰化を抑制する。一方、TNAP は PPi を Pi に変換し、後者は石灰化を促進する。これらの知見から、ENPP1 と TNAP の関係は、石灰化の基礎となるプロセスを理解する上で重要であると推測された。さらに、ENPP1 の欠損は、アテローム性動脈硬化症 (Nitschke ら、2011 年)、過剰な骨石灰化、OA (Bertrand ら、2012 年 ; Zhang ら、2016 年) など、さまざまな疾患を引き起こす可能性がある。したがって、ENPP1 の欠損と TNAP の発現は、in vivo での石灰化を促進する可能性がある。対照的に、線維芽細胞増殖

因子 23 (FGF23) は enthesis の形成に関与することが知られている (Ferreira ら、2022)。Alpl と Fgf23 は有意に発現が上昇したが、Enpp1 の発現は 2 群間で差がなかった。さらに、Enpp1 と Alpl の発現の間には相関は認められなかった。したがって、HS における脛骨結節骨化の原因は、Enpp1 の発現状態とは関係なく、むしろ TNAP や FGF23 といった石灰化促進因子の活性化にあるのかもしれない。

前述のように、OA では石灰化が促進される (Fang ら、2018) 近年、Piezo1 と TRPV4 が軟骨のメカノセンサーとして同定された (Gao ら、2022) TRPV4 は軟骨の保護に必須である (O'Connor ら、2014)。TRPV4 の活性化は II 型コラーゲンとグリコサミノグリカンの発現を増加させたが、軟骨細胞を GSK205 (既知の TRPV4 阻害剤) で処理すると、II 型コラーゲンのレベルが有意に低下し、MMP のレベルが上昇した (O'Connor ら、2014 ; Savadipour ら、2022 ; Trompeter ら、2021)。Piezo1 は、軟骨内骨化に必要であることから、「軟骨細胞のメカノセンサー」としても知られている (Hendrickx ら、2021)。これらのメカノセンサーの違いはその感度にあり、Piezo1 は高負荷下で活性化されるのに対し、TRPV4 は低力学的ストレス下で活性化される (Lee ら、2014 ; Nims ら、2021)。このように、TRPV4 と Piezo1 は軟骨細胞においてメカノセンサーとして機能しているが、その機能は異なっている。本研究では、Trpv4 の発現はいずれの群でも有意な変化はなかったが、HS における Piezo1 の発現は CO よりも有意に高かった。さらに、HS では脛骨粗面が骨化していたにもかかわらず、Piezo1 と Trpv4 の発現は有意な相関を示さなかった。Piezo1 と Mmp3 の間には正の相関が、Piezo1 と Timp3 の間には負の相関が観察されたのである。このことから、軟骨内骨化は軟骨基質の分解とともに進行することが示唆された。したがって、脛骨粗面の機械的ストレスが減少すると、軟骨細胞の保護機能には影響がないものの、Piezo1 活性による骨化が生じた。しかし、HS の脛骨粗面の組織学的所見では、未熟な骨組織が形成された。従って、Piezo1 のメカノセンサー活性により未熟な骨組織が形成された推測される。

現在、レクリエーション活動 (ビデオゲームなど) の増加により、日常的な活動は減少している (Valovich McLeod ら、2011) Gholve ら (2007) は、OSD は 12~15 歳で発症すると報告しており、最近では、OSD は 12.1 歳で発症すると報告されている (Gaulrapp & Nührenböcker, 2022)。これらの研究から、OSD の発症年齢は低下していると結論づけられる。本研究における HS の脛骨粗面の組織学的および遺伝子発現解析から、脛骨粗面の外傷リスクが増加していることが明らかになった。これらの事実は、運動量が少ないと OSD を発症するリスクが高くなるため、思春期の子どもたちに警鐘を鳴らすものである。しかし、少年は一般的に完全な成人とはみなされていないため、環境に対する

完全な権限を有しておらず、そのような活動の機会を十分に利用することもできない。したがって、まだ発達途上であり、資本や完全な自由、無制限の機会を利用できない人に、全責任を負わせることはできない。したがって、OSDの予防には、大人（例えば、医師、教師、スポーツ指導者、両親）の援助が必要である。

結論として、後肢の荷重軽減は軟骨基質の分解と深層の石灰化促進をもたらし、脛骨粗面の成長が予想より早く完了したことを示唆した。機械的刺激を減らした際に脛骨粗面の石灰化が促進されたのは、TNAPとFGF23だけでなく、脛骨粗面の骨化に関与するPiezo1メカノセンサーも活性化されたためであった。本研究の結果は、脛骨結節の石灰化がTNAP、FGF23、Piezo1によって促進されることを示している。

#### Ethics approval

動物実験は、東洋大学大学院ヒューマンライフデザイン研究科動物実験・倫理委員会（東京都、第2022-06号）の承認を得た。

東洋大学大学院ヒューマンライフデザイン研究科（日本、東京；No.2022-06）。

#### References

Almeida-Silveira, M.I., Lambertz, D., Pérot, C. & Goubel, F. (2000) Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat Achilles tendon. *European Journal of Applied Physiology*, 81(3), 252–257. Available from:

<https://doi.org/10.1007/s004210050039>

Anderson, H.C., Sipe, J.B., Hessle, L. et al. (2004) Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *American Journal of Pathology*, 164(3), 841–847. Available from:

[https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63172-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63172-0)

Apostolakos J., Durant, T.J., Dwyer, C.R. et al. (2014) The enthesis: a review of the

tendon-to-bone insertion. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 4(3), 333–342.

Bertrand, J., Nitschke, Y., Fuerst, M. et al. (2012) Decreased levels of nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 are associated with cartilage calcification in osteoarthritis and trigger osteoarthritic changes in mice. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(7), 1249–1253. Available from: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200892>

Bhattacharjee, A. & Katti, D.S. (2022) Sulfated carboxymethylcellulose-based scaffold mediated delivery of Timp3 alleviates osteoarthritis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 212, 54–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.093>

Chen, J.J., Huang, J.F., Du, W.X. & Tong, P.J. (2014) Expression and significance of MMP3 in synovium of knee joint at different stage in osteoarthritis patients. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(4), 297–300. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60042-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60042-0)

Chubinskaya, S., Kuettner, K.E. & Cole, A.A. (1999) Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 79(12), 1669–1677.

Darrietort-Laffite, C., Arnolfo, P., Garraud, T. et al. (2019) Rotator cuff tenocytes differentiate into hypertrophic chondrocyte-like cells to produce calcium deposits in an alkaline phosphatase-dependent manner. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10), 1544–1559. Available from: <https://doi.org/10.3390/jcm8101544>

de Boer, M.D., Maganaris, C.N., Seynnes, O.R., Rennie, M.J. & Narici, M.V. (2007) Time course of muscular, neural and tendinous adaptations to 23 day unilateral lower-limb suspension in young men. *Journal of Physiology*, 583(3), 1079–1091. Available from: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.135392>

Fang, H., Huang, L., Welch, I. et al. (2018) Early changes of articular cartilage and subchondral bone in the DMM mouse model of osteoarthritis. *Scientific Reports*, 8(1), 2855. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21184-5>

Ferreira, C.R., Ansh, A.J., Nester, C. et al. (2022) Musculoskeletal comorbidities and quality of life in ENPP1-deficient adults and the response of enthesopathy to enzyme replacement therapy in murine models. *Journal of Bone and Mineral Research*, 37(3), 494–504. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbmr.4487>

Gao, W., Hasan, H., Anderson, D.E. & Lee, W. (2022) The role of mechanically activated ion channels Piezo1, Piezo2, and TRPV4 in chondrocyte mechanotransduction and mechano-therapeutics for osteoarthritis. *Frontiers in Cell*

*and Developmental Biology*, 10, 885224. Available from:

<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.885224>

Gaulrapp, H. & Nührenbörger, C. (2022) The Osgood–Schlatter disease: a large clinical series with evaluation of risk factors, natural course, and outcomes.

*International Orthopaedics*, 46(2), 197–204. Available from:

<https://doi.org/10.1007/s00264-021-05178-z>

Gaweł, E. & Zwierzchowska, A. (2021) Therapeutic interventions in Osgood–Schlatter disease: a case report. *Medicine* 100(50), e28257. Available from:

<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000028257>

Gholve, P.A., Scher, D.M., Khakharia, S., Widmann, R.F. & Green, D.W. (2007) Osgood Schlatter syndrome. *Current Opinion in Pediatrics*, 19(1), 44–50. Available

from: <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e328013dbea>

Gosens, T. & Hofstee, D.J. (2009) Calcifying tendinitis of the shoulder: advances in imaging and management. *Current Rheumatology Reports*, 11(2), 129–134. Available

from: <https://doi.org/10.1007/s11926-009-0018-0>

Guldhammer, C., Rathleff, M.S., Jensen, H.P. & Holden, S. (2019) Long-term prognosis and impact of Osgood–Schlatter disease 4 years after diagnosis: A retrospective study. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 7(10),

2325967119878136. Available from: <https://doi.org/10.1177/2325967119878136>

Harold, M. & Nathan, H. (2018) To rest or not to rest: chiropractic management strategies for juvenile osteochondrosis a case series. *Journal of Contemporary Chiropractic*, 1, 20–25.

Hemmati-Sadeghi, S., Ringe, J., Dehne, T., Haag, R. & Sittinger, M. (2018) Hyaluronic acid influence on normal and osteoarthritic tissue-engineered cartilage. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1519–1532. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms19051519>

Hendrickx, G., Fischer, V., Liedert, A. et al. (2021) Piezo1 inactivation in chondrocytes impairs trabecular bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 36(2), 369–384. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbmr.4198>

Jin, Y., Cong, Q., Gvozdenovic-Jeremic, J. et al. (2018) Enpp1 inhibits ectopic joint calcification and maintains articular chondrocytes by repressing hedgehog signaling. *Development*, 145(18), 164830. Available from: <https://doi.org/10.1242/dev.164830>

Lawhorn, B.G., Brnardic, E.J. & Behm, D.J. (2020) Recent advances in TRPV4 agonists and antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 30(8), 127022. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127022>

Lee, W., Leddy, H.A., Chen, Y. et al. (2014) Synergy between Piezo1 and Piezo2

channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (47), E5114–E5122. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1414298111>

Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*, 25(4), 402–408. Available from: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Maulding, N.D., Kavanagh, D., Zimmerman, K. et al. (2021) Genetic pathways disrupted by ENPP1 deficiency provide insight into mechanisms of osteoporosis, osteomalacia, and paradoxical mineralization. *Bone*, 142, 115656. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115656>

Nims, R.J., Pferdehirt, L., Ho, N.B. et al. (2021) A synthetic mechanogenetic gene circuit for autonomous drug delivery in engineered tissues. *Science Advances*, 7(5), eabd9858. Available from: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd9858>

Nitschke, Y., Weissen-Plenz, G., Terkeltaub, R. & Rutsch, F. (2011) Npp1 promotes atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(11), 2273–2283. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01327.x>

O’Conor, C.J., Leddy, H.A., Benefield, H.C., Liedtke, W.B. & Guilak, F. (2014)

TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1316–1321. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1319569111>

Ren, X., Li, B., Xu, C. et al. (2022) High expression of Piezo1 induces senescence in chondrocytes through calcium ions accumulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 607, 138–145. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.119>

Savadipour, A., Nims, R.J., Katz, D.B. & Guilak, F. (2022) Regulation of chondrocyte biosynthetic activity by dynamic hydrostatic pressure: the role of TRP channels. *Connective Tissue Research*, 63(1), 69–81. Available from: <https://doi.org/10.1080/03008207.2020.1871475>

Shi, J., Zhang, C., Yi, Z. & Lan, C. (2016) Explore the variation of MMP3, JNK, p38 MAPKs, and autophagy at the early stage of osteoarthritis. *IUBMB Life*, 68(4), 293–302. Available from: <https://doi.org/10.1002/iub.1482>

Smith, J.M. & Varacallo, M. (2019) Osgood Schlatter’s disease (tibial tubercle apophysitis). A service of the National Library of Medicine.

Suito, H., Zeng, X., Minamizono, W., Yang, C., Yashima, N. & Ohsako, M. (2022)

The histological influence to periosteum under the tibial tuberosity by increase of mechanical load with aging in rats. *Toyo University Graduate School Bulletin*, 58, 263–270.

Suito, H., Zheng, X., Minamizono, W. & Ohsako, M (2021) Structural changes in attaching sites of tendon of femoral quadriceps muscle in growing rats. *Toyo University Graduate School Bulletin*, 57, 185–195.

Suito, H., Fujikawa, K. & Ohsako, M., (2023) Eccentric contractions during downhill running induce Osgood–Schlatter disease in the tibial tuberosity in rats: a focus on histological structures. *Scientific Reports*, 13(1), 9863. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36914-7>

Tong, Z., Liu, Y., Chen, B., Yan, L. & Hao, D. (2017) Association between MMP3 and TIMP3 polymorphisms and risk of osteoarthritis. *Oncotarget*, 8(48), 83563–83569. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18745>

Trompeter, N., Farino, C.J., Griffin, M. et al. (2021) Extracellular matrix stiffness alters TRPV4 regulation in chondrocytes. *bioRxiv*. Available from: <https://doi.org/10.1101/2021.09.14.460172>

Valovich McLeod, T.C., Decoster, L.C., Loud, K.J. et al. (2011) National Athletic Trainers' Association position statement: prevention of pediatric overuse injuries.

*Journal of Athletic Training*, 46(2), 206–220. Available from:

<https://doi.org/10.4085/1062-6050-46.2.206>

Wang, S., Li, W., Zhang, P. et al. (2022) Mechanical overloading induces GPX4-regulated chondrocyte ferroptosis in osteoarthritis via Piezo1 channel facilitated calcium influx. *Journal of Advanced Research*, 41, 63–75. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.01.004>

Watanabe, H., Fujii, M., Yoshimoto, M. et al. (2018) Pathogenic factors associated with Osgood–Schlatter disease in adolescent male soccer players: a prospective cohort study. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 6(8), 2325967118792192.

Available from: <https://doi.org/10.1177/2325967118792192>

Xu, B., Xing, R., Huang, Z. et al. (2019) Excessive mechanical stress induces chondrocyte apoptosis through TRPV4 in an anterior cruciate ligament-transected rat osteoarthritis model. *Life Sciences*, 228, 158–166. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.003>

Zeng, X., Suito, H., Minamizono, W., Yashima, N., Yang, C. & Ohsako, M. (2022) Study in effects of different periods of interventions with electrical stimulation on structural changes of tibial articular cartilage by hind-limb suspension in rats. *Toyo University Graduate School Bulletin*, 58, 271–288.

Zhang, J., Dymment, N.A., Rowe, D.W. et al. (2016) Ectopic mineralization of cartilage and collagen-rich tendons and ligaments in Enpp1asj-2J mice. *Oncotarget*, 7(11), 12000–12009. Available from: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7455>

Zhang, Y., Brown, M.A., Peach, C., Russell, G. & Wordsworth, B.P. (2007) Investigation of the role of ENPP1 and TNAP genes in chondrocalcinosis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 46(4), 586–589. Available from: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel338>

## 7. 謝辞

本稿は、東洋大学学術論文投稿助成事業の助成を受けた。

この研究内容は *Journal of Anatomy* に投稿中である (IF : 2.4)。

Table 1

| Group                | Microbiological status | Weight $\pm$ SD (g) |
|----------------------|------------------------|---------------------|
| Control              | Specific-pathogen free | 292.3 $\pm$ 4.5     |
| Hind-limb suspension | Specific-pathogen free | 273.3 $\pm$ 12.5    |

表 1. ラットの特性

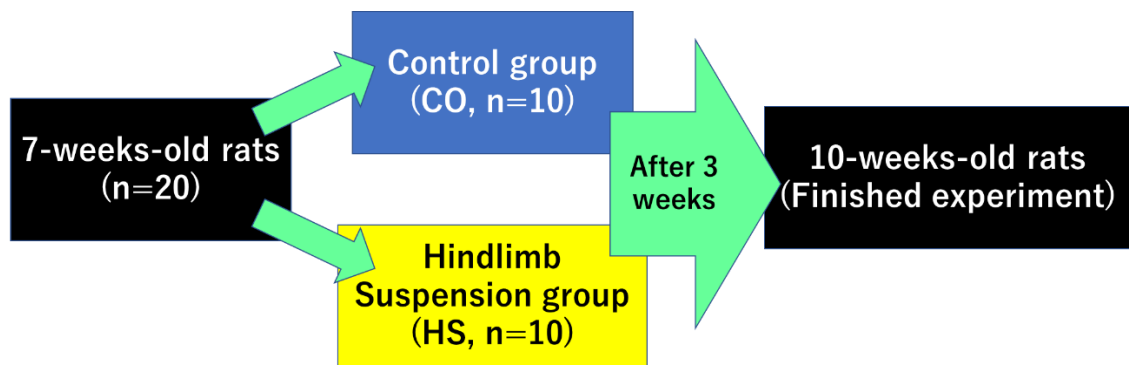


図 1.研究手順

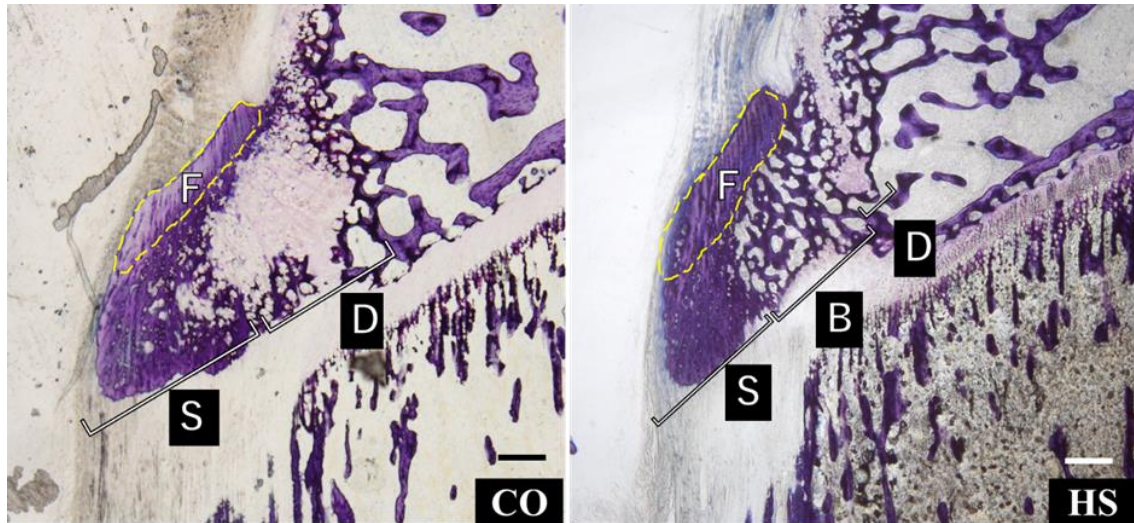


図 2.脛骨粗面の構造の比較

(bar = 200  $\mu$ m, 非脱灰リゴラック樹脂研磨標本, トルイジンブルー染色)

a-d; Control (CO), e-h; Hindlimb Suspension (HS)

S: 表層, D: 深層, F: 線維軟骨部, B; 骨組織

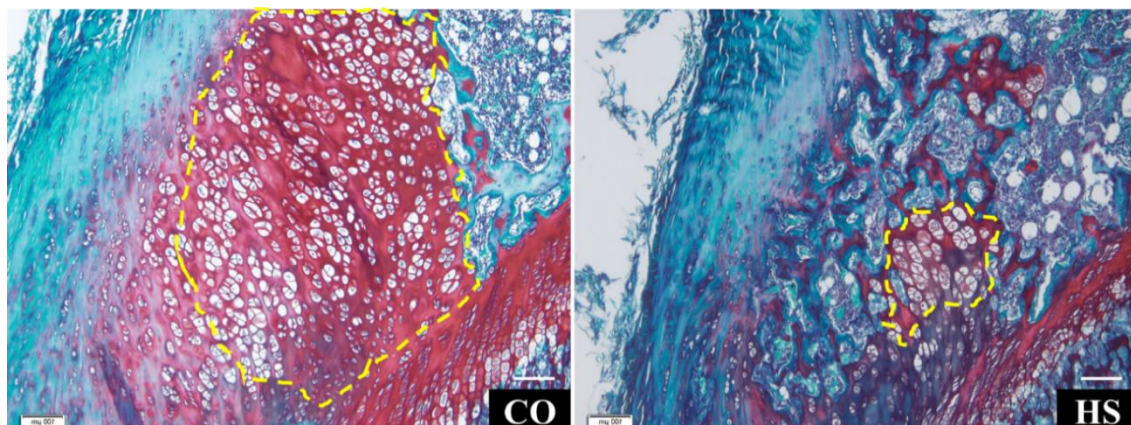


図 3. 深層軟骨組織の構造的特徴

(bar = 200  $\mu$ m, 脱灰パラフィン切片, サフラニン O 染色)

a-d; Control (CO), e-h; Hindlimb Suspension (HS)

黄色枠内; 脛骨粗面内の軟骨組織

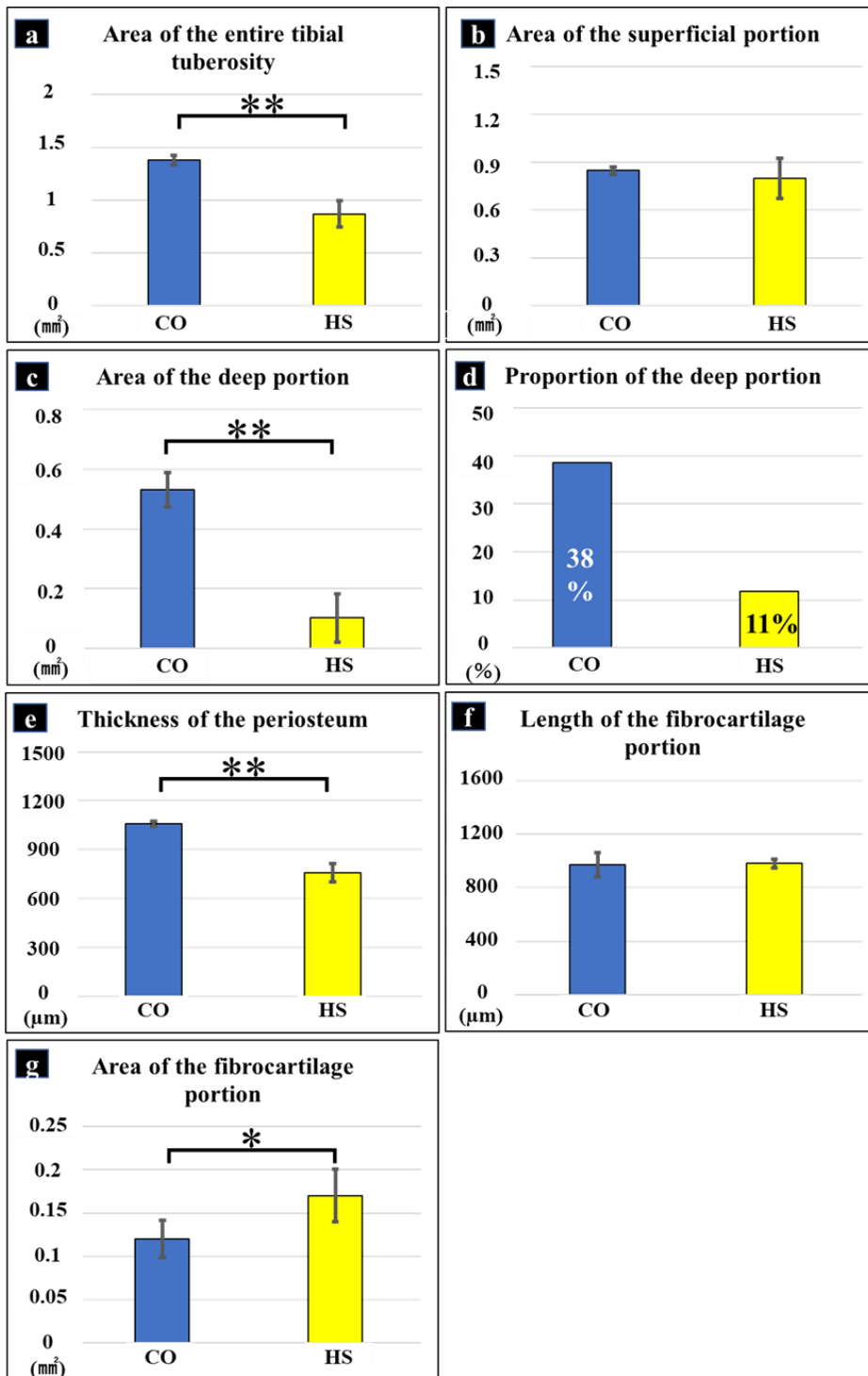


図 4. 荷重低減による脛骨粗面の形態計測結果の比較  
(GMA 樹脂薄切標本, \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .)  
a-d; Control (CO), e-h; Hindlimb Suspension (HS)

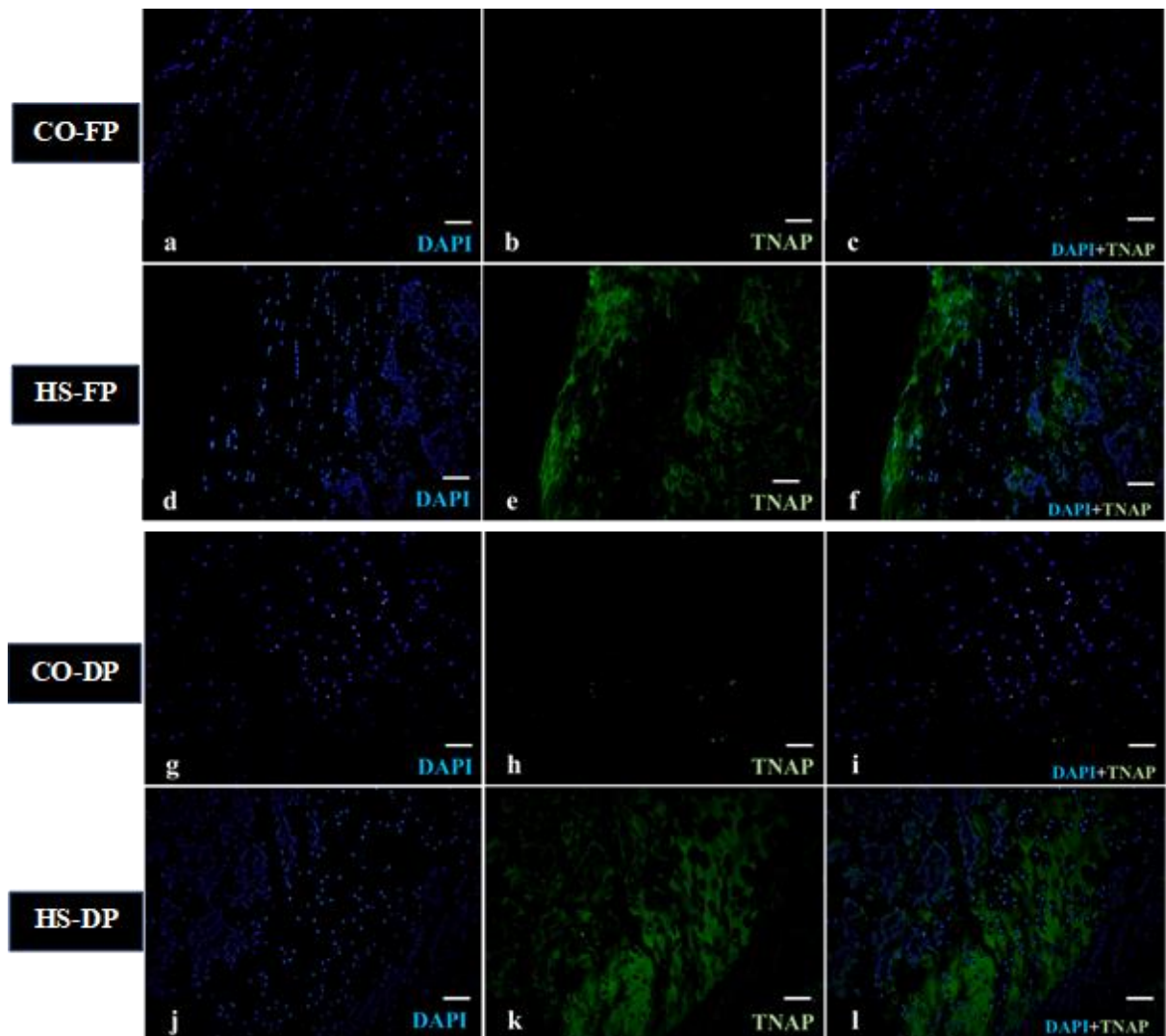


図 5.石灰化促進因子の局在  
(bar=50 $\mu\text{m}$ , 脱灰パラフィン切片, 蛍光免疫染色)  
a-d; Control (CO), e-h; Hindlimb Suspension (HS)  
青; 核, 緑; TNAP

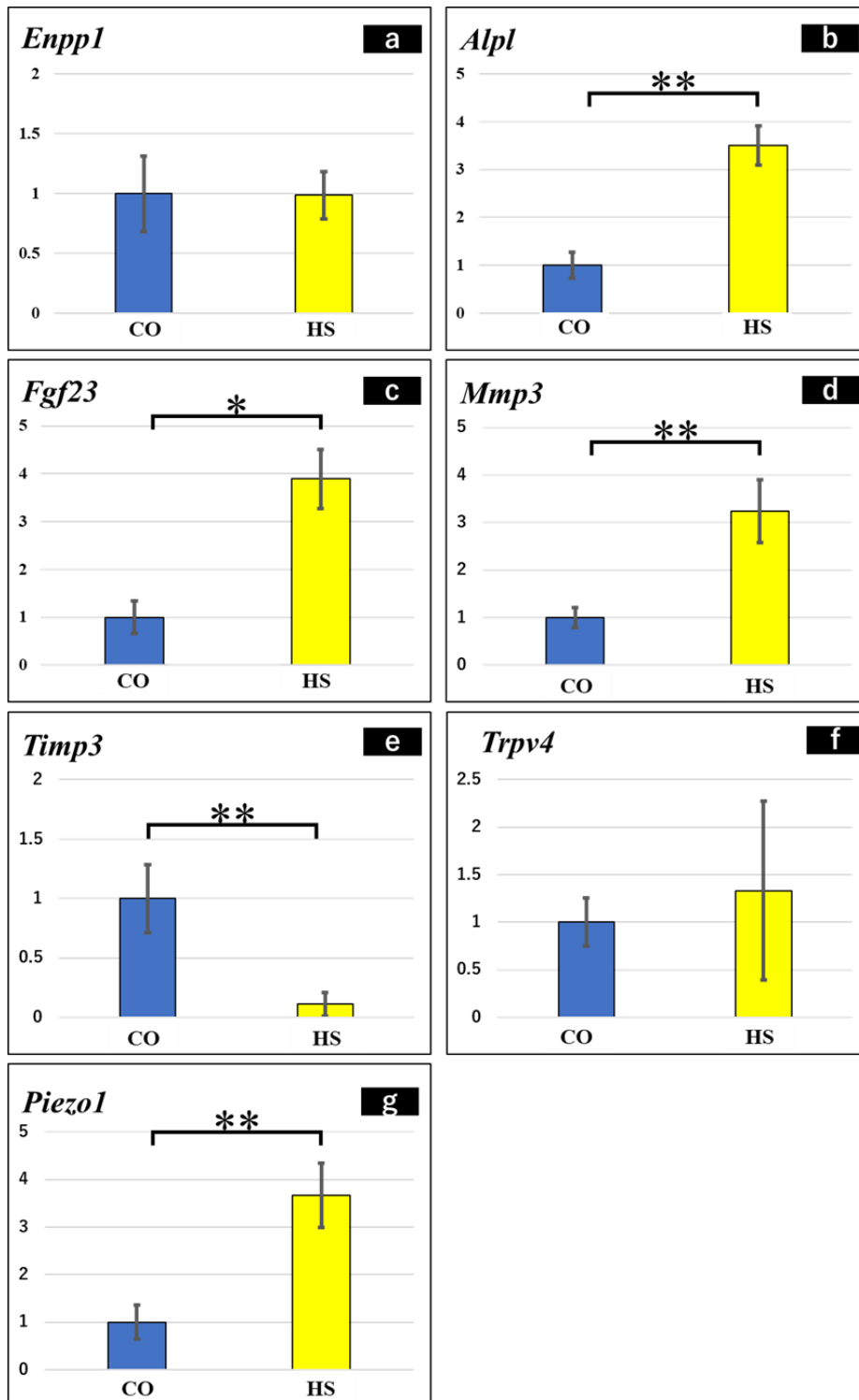


図 6.脛骨粗面内の遺伝子発現解析の結果  
a-d; Control (CO), e-h; Hindlimb Suspension (HS)  
(Housekeeping; *Rn45S*)

|                              | <i>r</i> = | <i>p</i> = |
|------------------------------|------------|------------|
| <i>Enpp1</i> - <i>Alpl</i>   | 0.111      | 0.76       |
| <i>Enpp1</i> - <i>Mmp3</i>   | 0.68       | 0.852      |
| <i>Enpp1</i> - <i>Timp3</i>  | 0.377      | 0.283      |
| <i>Enpp1</i> - <i>Trpv4</i>  | -0.242     | 0.501      |
| <i>Enpp1</i> - <i>Piezo1</i> | -0.74      | 0.838      |
| <i>Alpl</i> - <i>Mmp3</i>    | 0.876      | 0.001      |
| <i>Alpl</i> - <i>Timp3</i>   | -0.758     | 0.011      |
| <i>Alpl</i> - <i>Trpv4</i>   | 0.419      | 0.229      |
| <i>Alpl</i> - <i>Piezo1</i>  | 0.917      | 0.0002     |
| <i>Mmp3</i> - <i>Timp3</i>   | -0.83      | 0.003      |
| <i>Mmp3</i> - <i>Trpv4</i>   | -0.31      | 0.931      |
| <i>Mmp3</i> - <i>Piezo1</i>  | 0.769      | 0.009      |
| <i>Timp3</i> - <i>Trpv4</i>  | -0.211     | 0.558      |
| <i>Timp3</i> - <i>Piezo1</i> | -0.783     | 0.007      |
| <i>Trpv4</i> - <i>Piezo1</i> | 0.507      | 0.134      |
| <i>Fgf23</i> - <i>Enpp1</i>  | 0.266      | 0.458      |
| <i>Fgf23</i> - <i>Alpl</i>   | 0.639      | 0.047      |
| <i>Fgf23</i> - <i>Mmp3</i>   | 0.871      | 0.001      |
| <i>Fgf23</i> - <i>Timp3</i>  | -0.621     | 0.055      |
| <i>Fgf23</i> - <i>Trpv4</i>  | -0.118     | 0.746      |
| <i>Fgf23</i> - <i>Piezo1</i> | 0.672      | 0.033      |

図 7.遺伝子発現解析による群間の相関関係

## 第6章

### ラットの上り走運動は脛骨粗面の石灰化を促進する

#### 要約

脛骨粗面は、組織学的に表層（膝蓋腱を包埋）と深層（硝子軟骨を構成）で観察される。下りランニングでは、脛骨粗面が強く引っ張られるため、深層の石灰化が遅れることが知られている。しかし、上り坂のランニングでは、深層の石灰化への影響は不明である。本研究では、上り走行が脛骨粗面の石灰化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。6週齢のラット（Wistar系、雄、n=24）を用い、2つのタイプに分類した：COとUR。URは予備走行を1週間、本走行を3週間実施した。予備走行の条件は、速度：10m/分、角度：+10°、時間：1回30分、頻度：5日/週とした。本走の条件は、速度17m/分、角度+15°、時間60分（1回）、頻度5日/週であった。両群とも脛骨粗面は表層と深層が観察されたが、URの深層の面積はCOより狭かった。さらに、URにおけるENPP1遺伝子の発現は、COよりも低かったが、Alplは両群とも有意に示さなかった。ENPP1は「石灰化の抑制」として知られているが、TNAP（遺伝子名ALPL）は「石灰化の促進」として報告されている。したがって、上り坂を走ることは脛骨結節の石灰化を促進すると考えられる。この功績により、OSDの予防に貢献できると考えられる。

## 背景

Osgood-Schlatter 病 (OSD) は大腿四頭筋の偏心性収縮により発症することが知られており 1)、隆起、炎症、疼痛を主症状とする 2)。これまでの研究では、思春期の OSD は脛骨骨端部の二次性骨化中心の剥離骨折として知られていた 3)。これまで、OSD における脛骨結節の組織学的観察はほとんど行われていなかった。そのため、OSD における詳細な構造は不明なままであった 4)。近年、我々は OSD 動物モデルを作製し、OSD における脛骨粗面の石灰化が抑制されていることを組織学的に証明した 5)。この所見から、OSD は二次骨化中心の剥離骨折ではなく、過度の機械的ストレスによって脛骨結節の石灰化が抑制される病態であると推測された。一般に、OSD は骨格が大きく変化する思春期に発症することが知られており、その多くは活発な男児である。また、OSD 患者は運動活動を中断しなければならないだけでなく、抗炎症薬や理学療法が思春期に与える負担にも対処しなければならない 6)。したがって、OSD の予防法を確立することは非常に重要であると思われる。OSD の研究者の中には、短期間の膝関節固定は疼痛に対する良い治療法であるが、運動能力の低下につながるため、この治療はできるだけ避けるべきであると考えられている。

脛骨粗面は、発育とともに軟骨組織から骨組織に置き換わることが明らかになっている 7)。脛骨粗面の組織学的構造は、表層（膝蓋腱を包埋）と深層（軟骨組織に構造化）に分けて観察される 8)。発育初期における脛骨粗面では深層が広く認められ、その部分には未熟な軟骨細胞が観察される。その後、軟骨細胞が肥大化し、深層の軟骨組織が骨化する。このように、脛骨粗面の大きさは深層の形成に依存していると推測される。実際、OSD 動物モデルでは深層の石灰化が抑制されることによって、深層の面積が広がる 5)。つまり、脛骨粗面における深層の石灰化促進は、OSD の予防につながる可能性がある。一方、表層の構造は、組織学的に線維軟骨（石灰化線維軟骨の形成）、膝蓋靭帯（非石灰化線維の包埋）、石灰化部（石灰化腱線維の包埋）の 3 つのゾーンに分類されている。中でも、大腿四頭筋の遠心性収縮は、線維軟骨部の形成と面積に影響を与えることが確認された。興味深いことに、機械的ストレスによる表層の構造変化は線維軟骨部にのみ生じ、膝蓋靭帯部や石灰化部の形成には変化が認められなかった。実際、ラットに上り坂や下り坂を走らせると、下り坂では一過性の筋損傷が観察されている 9)。ヒトの筋損傷も遠心性収縮で起こりやすいことから 10)、ラットの下り坂走行時の収縮パターンは遠心性であると推察される。すなわち、この事実は、上り坂走行中の大腿四頭筋の収縮パターンが求心性収縮であることを裏付けている。以上のことから、ラットの下り坂走行時の大腿四頭筋の収縮は、線維軟骨部の形成や深層の石灰化に影響を及ぼすと考えられるが、脛骨粗面の形成に影響を及ぼす求心性収縮については不明な点が多い。

健常人の軟骨組織の石灰化は、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ-1 (ENPP1) によって抑制されることが報告されている (11)。ENPP1 はアデノシン三リン酸からピロリン酸 (PPi) とアデノシン一リン酸 (AMP) に分解し、PPi は石灰化を抑制するアパタイト結晶の形成を抑制する (12)。実際、ENPP1 の欠損は関節軟骨の骨化・石灰化を促進した (13)。一方、組織の非特異的アルカリホスファターゼ (TNAP) は、PPi を無機リン酸 (Pi) に変換し、Pi の働きによりアパタイト結晶の形成を促進することが認識されている (14)。従って、健常な *in vivo* では ENPP1 による PPi 産生は軟骨組織の石灰化を抑制すると思われる。一方、硝子軟骨では II 型コラーゲンや X 型コラーゲンが局在することが報告されている (15)。例えば、成長板は静止層、増殖層、肥大層の 3 層に分けられる。静止層と増殖層では II 型コラーゲンが合成されていたが、肥大層では X 型コラーゲンが合成されていた (16)。また、静止層と増殖層はマトリックス中で未石灰化の状態であったが、肥大層は石灰化していた (17)。すなわち、脛骨粗面深層の石灰化は X 型コラーゲンとして合成されると考えられる。さらに、*enthesis* には線維軟骨が観察され (18)、そこには II 型コラーゲンと X 型コラーゲンが局在している (19)。脛骨粗面は、硝子軟骨と線維軟骨による構造により、関節包の中でも特異的な形成をしている。したがって、脛骨粗面の石灰化は、線維軟骨と深層で理解されるべきである。上述したように、大腿四頭筋の求心性収縮は、線維軟骨部分の面積を増加させるだけでなく、その構造にも影響を及ぼすことが認められている。したがって、線維軟骨部の石灰化促進は、ENPP1 が遺伝子発現を抑制している場合には、FGF23 の発現が上昇すると推測される。しかし、上り坂での大腿四頭筋の収縮が、深層および線維軟骨部の構造に影響を及ぼすことについては不明な点が多い。

この研究では、上り坂のランニングが脛骨粗面の構造を明らかにすることを目的としている。

#### 材料および方法

##### ARRIVE guidelines

本試験は、ARRIVE2.0 ガイドラインの Essential 10 に従って実施した。各項目の詳細を以下に示す。

##### Animals

6 週齢のラット (Wistar 系統、雄、 $n=24$ ) を用い、2 つのタイプに分類した：上り坂トレッドミル走行群 (UR,  $n=12$ ) と対照群 (CO,  $n=12$ ) に分類した (日本バイオサプライセンター、東京、日本)。UR のランニング条件は水戸の方法を参考にした (5)。本実験は、東洋大学大学院ヒューマンライフデザイン研究科動物実験・研究倫理委員会 (東京、日本、No.2019-04) の承認を得た。UR は

予備走行を1週間、本走行を3週間実施した。予備走の条件は、速度10m/分、角度+10°、時間1回30分、頻度5日/週とした。本走行の条件は、速度17m/分、角度+15°、時間60分(1回)、頻度5日/週であった。実験期間終了後、すべてのラットを炭酸ガスで犠牲にし、脛骨近位部を4%パラホルムアルデヒドで固定し、各種標本の矢状断面を観察した。

#### Inclusion and exclusion criteria and randomization

本実験で使用したすべてのラットを解析対象とした。すべてのラットの右肢を組織学的解析に用い(n=12)、左肢を骨形態計測と遺伝子発現解析に用いた(各n=6)。さらに、1~24の数字が不規則に並んだ抽選カードと各群12枚の選別カードを用いて動物の選別を行った。さらに、カードの番号に従ってラットを選別した。

実験と結果の初期評価は平井翠人が行い、藤川薫と大迫正史と結果を共有したが、グループ名は明らかにされなかった。

#### Non-decalcified specimens

脛骨結節は石灰化状態で観察するため、リゴラック樹脂(日新EM、東京、日本)に包埋した。2-ヒドロキシエチルメタクリレート(GMA)樹脂標本は矢状面6μmで切片化し、形態計測を行った。

両標本ともトルイジンブルーで染色した。本研究では、石灰化が関与する深部および線維軟骨部分を測定した。(各群で測定、n=6)。

#### Decalcification of sections

パラフィン(415-25791;富士フイルム和光純薬)に包埋し、切片化する3週間前に、8%EDTA(349-01863;同仁堂、熊本、日本)を用いて標本を脱灰した。脱灰した標本は、REM-710レトラトーム(ヤマト、埼玉県)を用いて矢状面に沿って4μmで切片化した。切片は、サフラニンO染色を5分間行った後、光学顕微鏡(BX53;OLYMPUS、東京、日本)で観察した。

#### Immunohistochemistry

まず、ウェットボックスで1時間温めた後、キシレンを用いてパラフィン切片を除去した。次に、内因性ペルオキシダーゼをメタノール中0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で15分間除去し、標本上のヒアルロン酸をヒアルロニダーゼで処理した(37°C、2時間)。さらに切片を3%ウシ血清アルブミンで30分間ブロックした。標本上のタイプXコラーゲン(Invitrogen, Waltham, United States of America; ×300)とTNAP(ab65834, Abcam, Cambridge, United Kingdom, ×300)の一次抗体を4°Cで

一晩インキュベートした。その後、2次抗体を反応させた。標本の免疫反応性を顕微鏡で観察した。

#### Immunofluorescent staining

まず、ウェットボックスで1時間温めた後、キシレンを用いてパラフィン切片を除去した。次に、内因性ペルオキシダーゼをメタノール中 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で15分間除去し、標本上のヒアルロン酸をヒアルロニダーゼで処理した (37°C、2時間)。さらに切片を3%ウシ血清アルブミンで30分間ブロックした。標本上のタイプXコラーゲン (Invitrogen, Waltham, United States of America; ×300) と TNAP (ab65834, Abcam, Cambridge, United Kingdom, ×300) の一次抗体を4°Cで一晩インキュベートした。その後、2次抗体を反応させた。標本の免疫反応性を光学顕微鏡で観察した。

#### Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR)

まず、TRIzol 試薬 (15596026; Thermo Fisher Scientific, Chiba, Japan) を用いて脛骨結節から全 RNA を抽出した。cDNA は、iScript gDNA Clear synthesis kit (172530; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて、260/280 nm の励起/発光における吸光度を確認した後、製造者の指示に従って合成した。RT-qPCR は、CFX96 リアルタイムシステム (Bio-Rad Laboratories) を用い、TaqMan プローブ (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。PCR 条件は以下の通り：95 °C で 20 秒間の初期変性、95 °C で 15 秒間の変性、60 °C で 1 分間の最終伸長を 40 サイクル行った。Rn45S mRNA を内部コントロールとして用いた。相対発現量は  $\Delta\Delta CT$  法 (Livak & Schmittgen, 2001) を用いて算出した。

#### Statistical analysis

すべてのデータは平均値 $\pm$ SD で表した。統計解析は2群間の比較に用い、統計的有意性は t 検定を用いて決定した。p 値 $<0.05$  を統計的に有意とみなした。また、相関はピアソン積率相関係数で分析した。さらに、すべての静的分析は SPSS ver.26 を使用した。

## 結果

### ・ Concentric contraction of quadriceps is promoted to calcified in deep portion

。UR の深層は CO よりも狭く観察され、その部分は部分的に石灰化していた。これらの組織学的所見は形態計測によって証明された。(図 1) UR の深層の面積は CO より有意に小さかった ( $p=0.01$  以下)。また、線維軟骨部の面積は CO よりも高かった ( $p=0.01$  未満)。これらの結果から、UR では脛骨結節の石灰化が促進されていることが理解された。

### ・ Gene expression and immunolocalization of the calcified factor in the tibial tuberosity

タイプXコラーゲン (軟骨マトリックスの石灰化マーカー) は、UR の深部で強く確認されたが、CO では弱かった (図 2)。さらに、TNAP の局在は脛骨粗面深層後方部に反応したが、CO ではほとんど観察されなかった。(図 3) 次に、遺伝子発現の結果である。(図 4) IL-6 (entheses における炎症性サイトカインファミリーとして知られている) の遺伝子発現は、CO と UR で有意な差は認められなかった。UR の Col10a (X型コラーゲンの遺伝子名) の遺伝子発現は CO より有意に上昇した。一方、CO の ENPP1 の遺伝子発現は UR より有意に低かった。しかし、Alpl (TNAP 遺伝子名として知られる) は CO と UR の間で有意なスコアは確認されなかった。また、ENPP1 と Col10aの間には有意な負の相関 ( $r=-0.668$ ) が認められた。

### ・ Difference of type X collagen and type II collagen immunolocalizations in fibrocartilage portion

線維軟骨部は脛骨粗面と膝蓋靱帯の埋入部に観察される。以上より、CO の線維軟骨部は薄く平滑に観察されたが、UR の線維軟骨部は厚く後方に観察された。そこで、軟骨基質に多く含まれる X 型コラーゲンと II 型コラーゲンに注目した。両群とも線維軟骨細胞に DAPI 陽性反応が観察された。(図 5a および 5e) さらに、X 型コラーゲンは両群とも線維軟骨細胞の周囲に免疫局在していた。(図 5b と 5f) 一方、CO における II 型コラーゲンの免疫反応は、線維軟骨の基質と線維軟骨細胞で観察された。(図 5c) しかし、UR では II 型コラーゲン陽性細胞はほとんど免疫反応を示さず、線維軟骨の基質にも免疫反応は観察されなかった。(図 5g)

## 考察

一般に、脛骨粗面の深層は軟骨組織で構成されているが、その部位は加齢とともに骨化する。また、骨格組織の成熟は、適度な機械的ストレスによって促進されることが明らかになっている (14,23)。一方で、骨端板は長軸方向の成長に不可欠な組織であり、静止層、増殖層、肥大層の3層に分かれている (16,24)。X型コラーゲンは肥大層のマーカーとして知られており、X型コラーゲンの局在は石灰化軟骨マトリックスを示す (25)。したがって、X型コラーゲンの免疫反応性は、軟骨の成熟度と石灰化の状態を示す重要な因子である。本研究の非石灰化標本では、URの深層に石灰化部分が観察された。また、URの脛骨粗面の深層にはX型コラーゲンが局在し、遺伝子発現レベルもCOより高いことが認められた。これらのことから、上り坂のランニングにおける大腿四頭筋の旧背院生収縮は、軟骨細胞の成熟を促進するとともに、軟骨基質の石灰化を促進すると推測される。また、線維軟骨部におけるコラーゲンの免疫局在は、II型コラーゲン陽性細胞が多く観察されただけでなく、マトリックス周囲にも反応を示した。II型コラーゲンは、主に硝子軟骨から細胞外基質へ分泌されるものであり (16)、活性の高い軟骨細胞（成長板の静止層や増殖層など）で合成される (27)。これまでの研究から、URの線維軟骨細胞はCOよりも低活性であると考えられた。一方、X型コラーゲンの免疫局在は両群とも細胞外基質に確認されたが、Coll10a遺伝子の発現は、URで有意に高スコアを示した。これらの差の結果を解釈する上で最も重要なのは、脛骨粗面深層の免疫染色の結果である。脛骨粗面深層の免疫染色では、URでX型コラーゲンの免疫反応が広く認められた。これらの所見から、Coll10aの遺伝子発現は、線維軟骨部の状態よりも深部の結果を反映している可能性が高い。言い換えれば、URにおける脛骨粗面の深層は、石灰化軟骨基質の合成を促す傾向があると思われる。

OSDモデルラットの先行研究では、脛骨粗面の線維軟骨部の面積が増加していた (5)。本研究においてもURの線維軟骨部の面積はCOよりも高いことが示された。したがって、線維軟骨部の定量的な結果は、OSDモデルラットにおいても同様の経過をたどることが理解された。興味深いことに、線維軟骨部分の組織学的構造は全く異なっていた。OSDモデルの線維軟骨部分は、前方に向かって最も厚く観察された。これはOSDモデルラットが下り走運動を行った結果、線維軟骨部前方に強い収縮力が加わり、その機械的刺激に組織学的特性によって抵抗していると推測される。一方、URの線維軟骨部は、後方に向かって最も厚くなっていた。したがって、走運動は線維軟骨部の面積を増加させるが、組織構造は収縮パターンに依存し、上り走行では線維軟骨部後方に強い機械的刺激が生じていると思われる。enthesisは、腱、線維軟骨、骨または軟骨の3つの部分から構成されてる (27)。実際、enthesisにおける石灰化線維軟骨の

面積は、機械的ストレスに依存することが示されていた 5)。なぜならば、線維軟骨の機能は、筋の過度な収縮力を *enthesis* に与えるのを防ぐためである 28,29)。これらの先行研究からも、UR の線維軟骨部分の力学的刺激は後方に伝達され、上り坂走行に伴う大腿四頭筋の同心性収縮の力から脛骨粗面を保護することが示唆される。

ENPP1 は、生体内では石灰化の一因として活発に抑制されている。この過程では、ENPP によって ATP から AMP と PPi に変化することが必須である 120)。PPi はアパタイトの形成機能を阻害する 30)。実際、ENPP1 の欠損は様々な疾患、アテローム性動脈硬化症 31)、変形性関節症 32)、などの高いミネラル化病態を引き起こす。本研究では、UR において ENPP1 の遺伝子発現が低下していた。一方、TNAP は PPi から Pi に変換する酵素である 33,34,35)。Pi における機能はアパタイト形成を促進する 36,37)。本研究では、TNAP の免疫反応は UR で強く出現したが、Alpl の遺伝子発現レベルは UR と CO の間で有意ではなかった。しかし、UR では Alpl の遺伝子発現量が増加傾向を示した。従って、上り坂での同心円性収縮に伴う石灰化促進には、Alpl のアップレギュレーションまたは ENPP1 のダウンレギュレーションが関与していると推測される。実際、ENPP1 と Col10a の間には有意な負の相関が示された。さらに、ENPP1 と Alpl の間には有意な相関は認められなかったが、負の相関の傾向が観察された。一方、OSD では脛骨粗面が隆起する理由として、深層の軟骨組織の石灰化が抑制されていることが報告されている。また、OSD モデルラットでは IL-6 遺伝子が高発現していた。今回の研究では、IL-6 の発現量は CO と UR の間で有意差がないことが示された。これらの結果から、上り坂のランニングでは炎症はほとんど起こらず、脛骨粗面の石灰化が促進されることがわかった。このことから、上り走運動は炎症を発生させず安全に脛骨粗面の石灰化を促進すると考えられる。

今回の研究では、上り坂のランニング運動中に脛骨粗面の石灰化が促進された。この事実は、オスグッド病の予防に貢献する可能性があり、今後さらに正確なランニング条件を明らかにすることが重要である。これまで、オスグッド病の予防法として、運動方法はあまり受け入れられてこなかった。しかし、本研究の結果は、スポーツ障害であるオスグッド病がアップヒルランニングによって予防できることを示唆している。ただし、本研究は 3 週間の実験であるため、その後の炎症性サイトカイン発現量や石灰化状態に時間依存的な変化があるかどうかは不明である。今後は、より長期間にわたってアップヒルランニング運動による脛骨粗面の石灰化や炎症状態を実証する必要があるだろう。最後に結論付けると、上り坂を走る際の大腿四頭筋の収縮は、線維軟骨や脛骨粗面の深層の石灰化を促進すると推測される。

将来の展望として、OSDは膝に発生するスポーツ障害として有名である。近年、OSDの発症は脛骨粗面の石灰化を抑制することが明らかになった。OSDは、過度な下り坂走行時の遠心性収縮によって生じる。しかし、本研究は、上り坂の走行条件は角度を変えただけである。OSDの特徴である脛骨粗面の石灰化が抑制されるという結果は本研究において対照的であった。したがって、大腿四頭筋の積極的な求心性収縮がOSD予防に役立つと推測される。つまり、積極的な求心性運動は、発育途上のアスリートの脛骨粗面の成熟を促進させ、OSDを発症することなく参加することを可能にし、いつOSDが発症するかわからないという不安から思春期のアスリートを解放するのである。

### Ethics approval

本研究は、東洋大学大学院ヒューマンライフデザイン研究科動物実験・研究倫理委員会の承認を得た。(承認番号：第2019-04号)

### References

1. Gawel G, Zwierzchowska A. 2021. Therapeutic interventions in Osgood--Schlatter disease: A case report. *Medicine* 100: e28257.
2. Gholve PA, Scher DM, Khakharia S, Et al. 2007. Osgood--Schlatter syndrome. *Curr Opin Pediatr* 19: 44–50.
3. Purushottam AG, David MS, Saurabh K, Roger W, Daniel WG. Osgood--Schlatter syndrome. *Curr Opin Pediatr* 2007;19:44–50.
4. Falciglia F, Giordano AG, Aulisa A, Poggiaroni A, Guzzanti V. Osgood—Schlatter lesion: histologic features of slipped anterior tibial tubercle. *Int J Immunopath Pharmacol* 2011;24:25-28
5. Hirai Suito, Kaoru Fujikawa, Masafumi Ohsako. Eccentric contractions during downhill running induce Osgood–Schlatter disease in the tibial tuberosity in rats 雑誌名
6. Hannah NL, Gerd S, Daniel WG. Osgood-Schlatter disease: a 2020 update of a common knee condition in children. *Cur. Opin. Pediatr.* 2020;32; 107-112
7. Suito Hirai, Zeng Xueqian, Minamizono Wataru, Yang Chuwei, Yashima Nao, Ohsako Masafumi. The histological influence to periosteum under the tibial tuberosity by increase of mechanical load with aging in rats. *Toyo University for Academic Resources* 58: 263–270.
8. Suito H, Zheng X, Minamizono W, Ohsako M. 2021. Structural changes in attaching

sites of tendon of femoral quadriceps muscle in growing rats. *Toyo University for Academic Resources* 57: 185–195.

9. Marie IH, Laurence R, Evelyne LW et al. Effect of eccentric versus concentric exercise training on mitochondrial function. *Mus. Ner.* 2014;50; 803-811

10. Keita K, Daiki W, Jiayu S, Masanobu W. Mechanism of eccentric contraction-induced damage and nutritional supplementations for mitigating it. *Mus. Res. Cell Motil.* 2022;43;147-156

11. Yunyun Jin, Qian Cong, Jelena Gvozdenovic-Jeremic, Jiajie Hu, Yiqun Zhang, Robert Terkeltaub, Yingzi Yang. Enpp1 inhibits ectopic joint calcification and maintains articular chondrocytes by repressing hedgehog signaling. *Development* (2018) 145, dev164830

12. Robert Terkeltaub. Physiologic and pathologic functions of the NPP nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family focusing on NPP1 in calcification. *Purinergic Signalling* (2006) 2: 371–377

13. J Bertrand, Y Nitschke, M Fuerst, S Hermann, M Schäfers, J Sherwood, G Nalesso, W Ruether, F Rutsch, F Dell’Accio, T Pap. Decreased levels of nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 are associated with cartilage calcification in osteoarthritis and trigger osteoarthritic changes in mice. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1249–1253.

14. Christelle Darrieutort-Laffite, Paul Arnolfo, Thomas Garraud, Annie Adrait, Yohann Couté, Guy Louarn, Valérie Trichet, Pierre Layrolle, Benoit Le Goff, Frédéric Blanchard. Rotator Cuff Tenocytes Differentiate into Hypertrophic Chondrocyte-Like Cells to Produce Calcium Deposits in an Alkaline Phosphatase-Dependent Manner. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 1544

15. Angela RA, Mauro A, Martin JS. Articular fibrocartilage-why does hyaline cartilage fail to repair? *Advanced Drug Del. Rev.* 2019;146;289-305

16. Yücel Ağirdil. The growth plate: a physiologic overview. *Efort Open Reviews* (2020), Vol5, 498-507

17. Masumeh K, John LW. Properties of Cartilage–Subchondral Bone Junctions: A Narrative Review with Specific Focus on the Growth Plate. *SAGE* 2020;13;16-33

18. Alexandra T, Erwan P, Stephane B, Markus AH, et al. Local anisotropy in mineralized fibrocartilage and subchondral bone beneath the tendon-bone interface. *Scientific reports* 2021;11;16534

19. John Apostolakos, Thomas JS Durant, Corey R. Dwyer, Ryan P. Russell, Jeffrey H. Weinreb, Farhang Alaei, Knut Beitzel, Mary Beth McCarthy, Mark P. Cote, Augustus D. Mazzocca. The enthesis: a review of the tendon-to-bone insertion. *Muscles, Ligaments, and Tendons journal* 2014; 4(3): 333-342

20. Carlos R. Ferreira, Ananya Jai Ansh, Catherine Nester, Christine O'Brien, Paul R. Stabach, Sae-Il Murtada, Ethan R. Lester, Gus Khursigara, Liz Molloy, Thomas O. Carpenter, Demetrios T. Braddock. Musculoskeletal Comorbidities and Quality of Life in ENPP1-Deficient Adults and the Response of Enthesopathy to Enzyme Replacement Therapy in Murine Models. *Journal of Bone Mineral Research* (2021), Vol37, 494-504
21. Andrew C. Karaplis, Xiuying Bai, Jean-Pierre Falet, and Carolyn M. Macica. Mineralizing Enthesopathy Is a Common Feature of Renal Phosphate-Wasting Disorders Attributed to FGF23 and Is Exacerbated by Standard Therapy in Hyp Mice. *Endocrinology*, 2012, 153(12):5906–5917
22. A.G.Schwartz et al:Muscle loading is necessary for the formation of a functional tendon enthesis.:55(2013)44-51.
23. H.S. LEE,S.J. MILLWARD-SADLER, M.O. WRIGHT, G. NUKI, and D.M. SALTER:Integrin and Mechanosensitive Ion Channel–Dependent Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Proteins and b-Catenin in Human Articular Chondrocytes After Mechanical Stimulation:JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH:Volume 15,1501-1509,2000
24. Toshihisa Komori:Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation: *Histochemistry and Cell Biology* (2018) 149:313–323
25. FACKSON MWALE,1 ELENA TCHETINA,2 C. WILLIAM WU,3 and A. ROBIN POOLE. The Assembly and Remodeling of the Extracellular Matrix in the Growth Plate in Relationship to Mineral Deposition and Cellular Hypertrophy: An In Situ Study of Collagens II and IX and Proteoglycan. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* Volume 17, Number 2, 2002, 275-283
26. Shawn A. Hallett, Wanida Ono, Noriaki Ono: Growth Plate Chondrocytes: Skeletal Development, Growth and Beyond. *International journal of Molecular Science* (2019) 20: 1-17
27. COOPER, REGINALD R.; MISOL, SINESIO; Stimmel, Penny. Tendon and Ligament Insertion A LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDY. *The Journal of Bone & Joint Surgery*: January 1970 - Volume 52 - Issue 1 - p 1-170
- 28.M. Benjamin, J. R. Ralphs. Fibrocartilage in tendons and ligaments -an adaptation to compressive load. *The journal of Anatomy* 193 (1998), 481-494
- 29.M. Benjamin, T. Kumai, S. Milz, B. m. Boszczyk, A. A. Boszczyk, J.R. Ralphs. The skeletal attachment of tendons -tendon “enthesis”. *Comparative Biochemistry and physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 133 (2002), 931-945
30. William N. Addison, Fereshteh Azari, Esben S. Sørensen, Mari T. Kaartinen, and Marc

- D. McKee. Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, Up-regulating Osteopontin, and Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 282, NO. 21, pp. 15872–15883
31. Npp1 promotes atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Journal of cellular and molecular medicine* 15, (2011), 2273-2283
32. Sun Yubo, Hanley, Edward N Jr. Calcium-Containing crystals and osteoarthritis. *Current Opinion in Orthopaedics* 18, 2007, 472-478
33. Fiona Roberts, Dongxing Zhu, Colin Farquharson, Vicky E. Macrae. ENPP1 in the Regulation of Mineralization and Beyond. *Trends in Biochemical Science* (2019) Vol44, 676-628
34. Betty A. Maddux, Paolo Sbraccia, Shinobu Kumakura, Shlomo Sasson, Jack Youngren, Alexander Fisher, Steven Spencert, Andrew Grupet, William Henzelt, Timothy A. Stewart, Gerald M. Reaven, Ira D. Goldfine. Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Letters to Nature* (1994), 448-451
35. Rene Buchet, Camille Tribes, Valentine Rouaix, Bastien Doumeche, Michele Fiore, Yuqing Wu, David Magne, Saida Mebarek. Hydrolysis of Extracellular ATP by Vascular Smooth Muscle Cells Transdifferentiated into Chondrocytes Generates Pi but Not PPi. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(6), 2948
36. K. Hoshi, Norio Amizuka, Amimitsu Oda, Yukio Ikehara, Hidehiro Ozawa. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochemistry and Cell Biology* 107 (1997), 183-191
37. Rene Buchet, Jose Luis Millan, David Magne. Multisystemic Functions of Alkaline Phosphatases. *Phosphatase Modulators* 2013; ,27-51

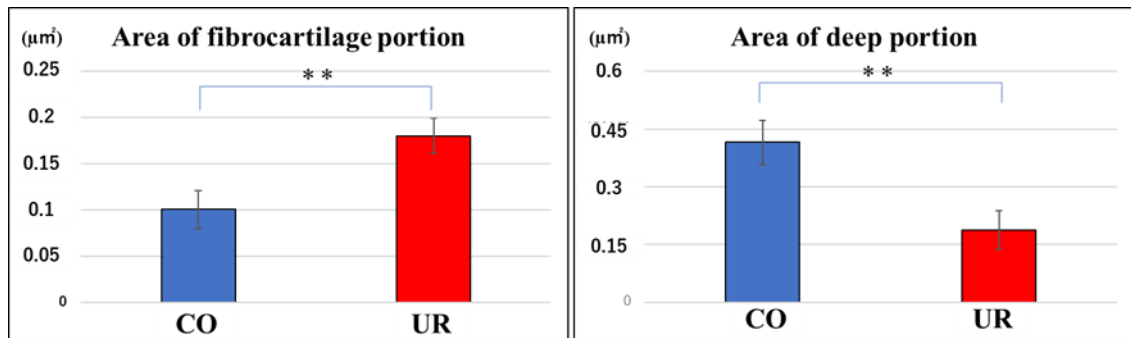


図 1.脛骨粗面における骨形態計測の比較  
a-d; Control (CO), e-h; Uphill Running (UR)

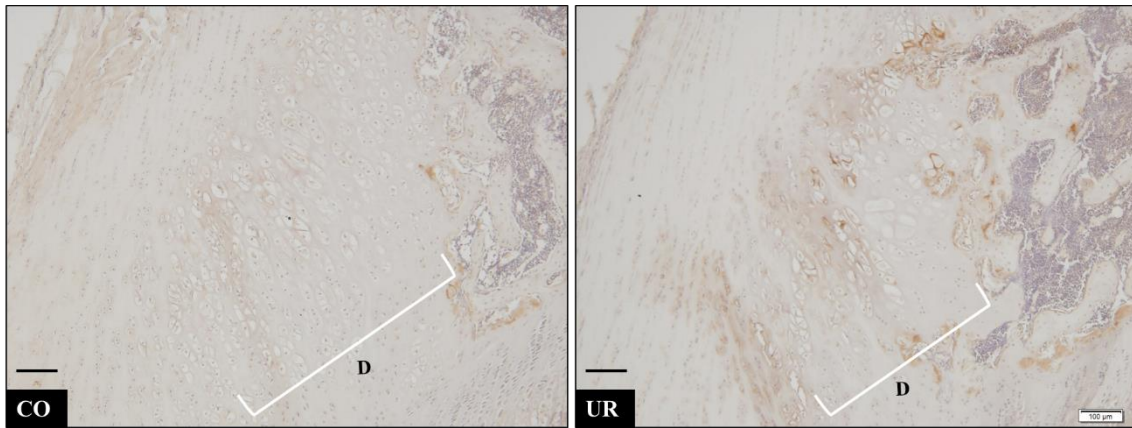


図 2.石灰化軟骨基質の局在

(bar=100 $\mu$ m, 脱灰パラフィン切片, typeXコラーゲン免疫染色)

a-d; Control (CO), e-h; Uphill Running (UR)

D; 深層

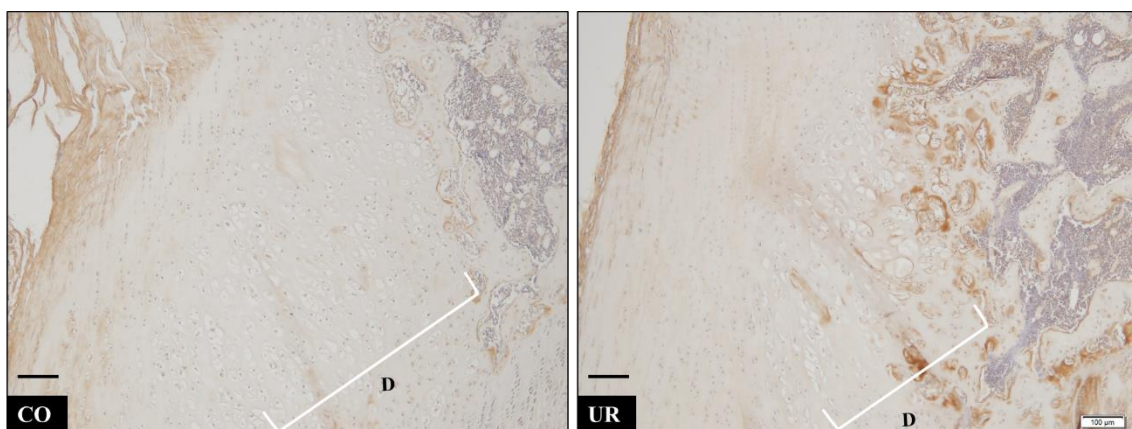


図 3.石灰化促進因子の局在

(bar=100 $\mu$ m, 脱灰パラフィン切片, TNAP 免疫染色)

a-d; Control (CO), e-h; Uphill Running (UR)

D; 深層

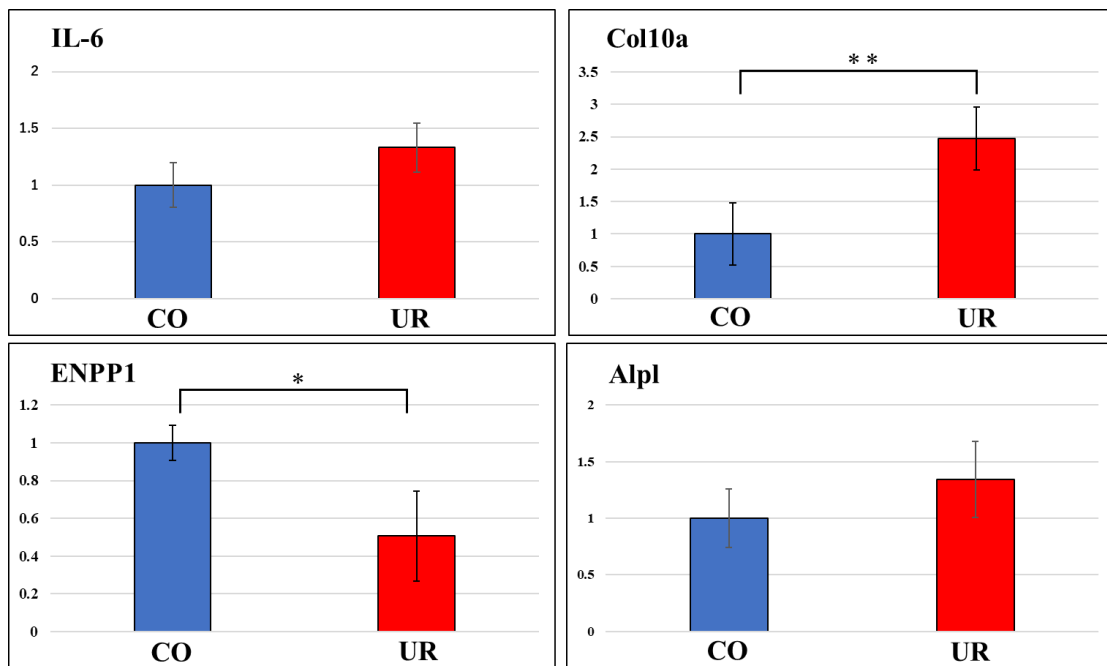


図 4.脛骨粗面内の遺伝子発現の動態  
a-d; Control (CO), e-h; Uphill Running (UR)  
(Housekeeping; *Rn45S*)

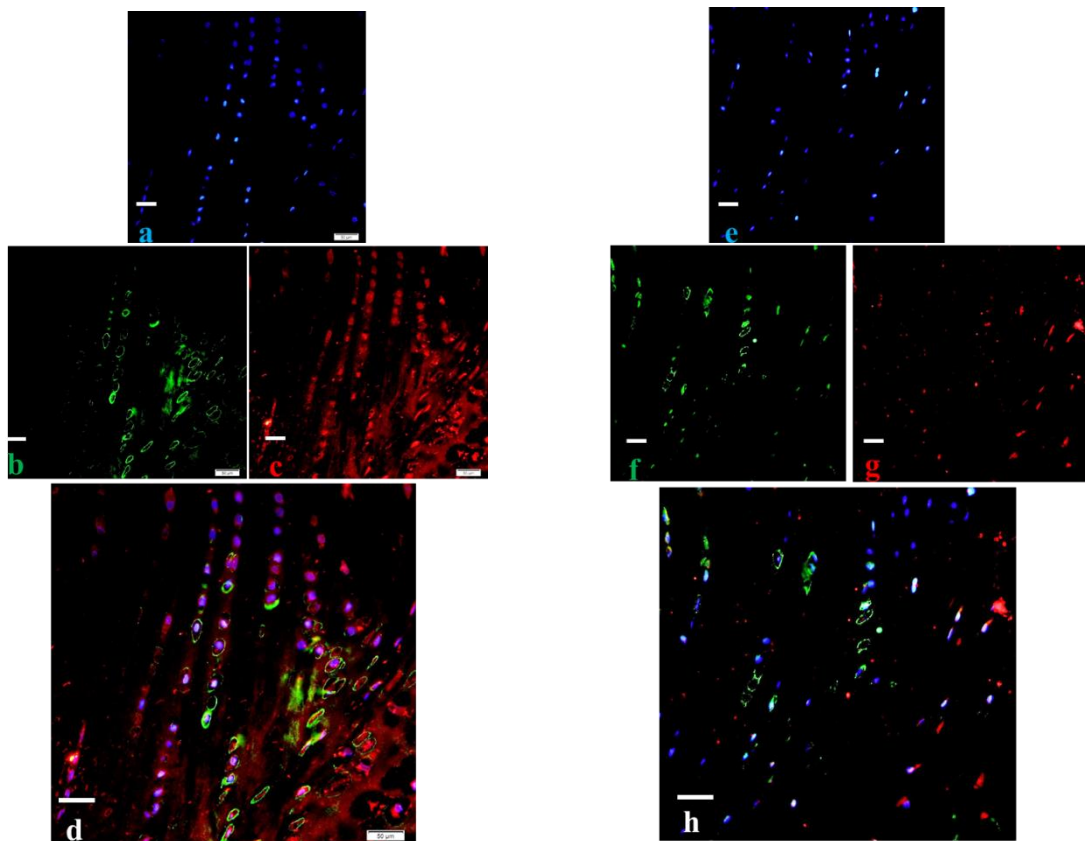


図 5.脛骨粗面線維軟骨部内のコラーゲンタイプの違い  
 (bar=20 $\mu$ m, 脱灰パラフィン切片, 蛍光免疫染色)  
 a-d; Control (CO), e-h; Uphill Running (UR)  
 青; 核、緑; type Xコラーゲン、赤; typeIIコラーゲン

## 第7章

ベクトルポテンシャルは関節軟骨の石灰化を抑制し、軟骨細胞の増殖を促す

### 要約

変形性関節症（OA）とは、脛骨の関節軟骨が一般的に侵される疾患であり、その石灰化が進行を悪化させ、近年その有病率が増加している。ベクトルポテンシャル（VP）は、OAを治療するための新しい理学療法である。VPが関節軟骨に及ぼす影響についてはまだ不明であるため、我々はVPが関節軟骨に及ぼす影響と、OAに対する新たな治療法としての可能性を評価することを目的とした。ここでは、6週齢のWistar系雄性ラット24匹を、対照群（CO、n=12）とVP刺激群（n=12）に分けた（VP条件：電圧67mV、周波数20kHz、電流0.12mA、実験頻度30分/日、5日/週、3週間）。関節軟骨は、表層、内側、深層、石灰化の4層に組織学的に分類できる。本研究においてVP群の関節軟骨の軟骨細胞数は、CO群より多く、石灰化層はVP群の方が薄かった。さらに、MKi67はCO群よりもVP群で高い発現を示し、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ1はCO群で発現が低下した。この結果は、VPが関節軟骨の軟骨細胞増殖に好影響を与え、石灰化を抑制したことを示している。したがって、VP刺激は、OAを予防するための新しい戦略の開発に役立つ可能性がある。

## 背景

変形性関節症（OA）は主に関節軟骨を侵し、加齢、外傷、肥満など様々な要因によって引き起こされる [1, 2, 3]。変形性関節症の患者は、そうでない患者に比べ、一般的に関節軟骨が薄くなっている [4, 5]。予防策として薬物療法や理学療法が採用されているが [6, 7]、これらの戦略は、関節軟骨後の病変を治療することよりも、OA の進行を遅らせることに主眼が置かれている。これはおそらく、関節軟骨の組織学的構造が独特で、神経支配や血管構造が欠如しているためであろう [8]。組織修復には血管新生が重要な役割を果たしており [9]、血管と神経の存在が必要である。しかし、関節軟骨の再生は、OA によって誘発された石灰化のためにしばしば制限される [10]。このプロセスは通常、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジエステラーゼ 1（ENPP1、石灰化を抑制することが知られている）と組織非特異的アルカリホスファターゼ（TNAP、石灰化を促進することが知られている）の相互作用によって制御されている。OA が起こるのは、ENPP1 のダウンレギュレーションと TNAP のアップレギュレーションの結果であり [11, 12]、OA を予防し石灰化を遅らせるためには、関節軟骨の厚さを維持することが重要である。先行研究では、OA が海綿骨量を減少させることを理由として、OA に対する予防策も治療に利用できる可能性が示唆されている [13]。例えば、骨粗鬆症の治療に一般的に使用されるビスフォスフォネートは、炎症性サイトカインの合成と闘い、関節軟骨を保存する能力があるため、OA に対する治療法として検討されてきた [14]。同様に、非ステロイド性抗炎症薬やオピオイドなどの抗炎症薬も、OA を治療するために使用されてきた [15]。しかし、これらの薬剤は生体内の組織構造に悪影響を及ぼす可能性がある。対照的に、物理的刺激（例えば、パルス電磁刺激）は、OA をほとんど、あるいは全く改善しなかった。そのため、別の治療戦略を開発する必要がある [16]。

最近、ベクトル電位（VP）ジェネレーターが開発された。この機会における最大の特徴は、身体に直接接触することなく刺激できることである。一方、OA 治療には経皮的電気神経刺激（TENS）が一般的に用いられているが [17]、その正確な作用機序は不明なままである。最近の研究では、TENS が細胞内外のイオンを刺激し、細胞活動を亢進させることが報告されている [18]。さらに、TENS は電界を発生させることで作動するが、これには VP の存在が必要である [19]。したがって、我々は VP が軟骨組織の構造にも影響を与えるという仮説を立てた。さらに、関節軟骨における軟骨細胞の増殖は、“Ki67”と呼ばれるタンパク質の合成につながる [20]。一般に、細胞増殖は 4 つの段階で起こる：G1 期、S 期、G2 期、M 期であり [21]、非増殖期は G0 期と呼ばれる [21]。最近、漢方薬であるバクチオールが関節軟骨細胞の増殖を誘導することが発見され、OA に対する治療の選択肢を提供する可能性が出てきた。

細胞外マトリックスと軟骨細胞は、関節軟骨の保護に重要な役割を果たしている。細胞外マトリックスはコラーゲン線維と非晶質基質からなり、関節保護の中心的役割を担っている。II型コラーゲン(Col2)は軟骨の主成分であり [22]、非晶質基質は主にアグリカン [23]からなり、保水性でよく知られている。アグリカンは Col2 と結合し、両成分の合成は関節軟骨の健康維持に不可欠である [24]。OA では、軟骨組織のバランスが崩れ、Col2 とアグリカンの合成が減少する [25]。従って、Col2 とアグリカンの分泌は、関節軟骨の OA を予防する保護的役割を担っている。

先に述べたように、OA 患者の関節軟骨では Col2 とアグリカンの合成能力が低下しており、それによって石灰化が制限されている。これまでの研究で、OA を予防するためには軟骨組織の機能を改善することが重要であることが強調されているにもかかわらず、関節軟骨に対する VP の効果に関する科学的証拠はまだ乏しい。そこで本研究では、VP が関節軟骨に及ぼす影響について、組織学的および生化学的証拠を提供することを目的とした。

#### 材料および方法

##### ARRIVE guidelines

本試験は、ARRIVE 2.0 ガイドラインの Essential 10 に従って実施した。各項目の詳細を以下に示す。また、すべての実験が関連するガイドラインおよび規則に従って実施されたことを確認した。

##### Animals

本試験では、6 週齢の雄ラット 24 匹 (Wistar Nippon Bio-Sup. Center, Tokyo, Japan) を用いた。すべてのラットは病原体を含まない特定の条件下で飼育され、新しい環境に慣れるために 1 週間の前処理を受けた。その後、VP 刺激群 (n = 12) と対照群 (CO、n = 12) のいずれかに無作為に割り付けた。収容施設は常に清潔な環境に保たれ、1 ケージあたり最大 4 匹のラットが飼育され、水と餌を自由に摂取できるようにした (オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本)。実験は、海拔約 7 メートルに位置する東洋大学朝霞キャンパスで行われた。実験に関する倫理的承認は、東洋大学大学院ヒューマンライフデザイン研究科動物実験・研究倫理委員会 (東京、日本; 承認番号 2022-36) から得た。

##### Experimental design

まず、研究期間中、厳格な衛生プロトコルが実施された。飼育エリアに入る前と実験中は手の消毒を行った。また、実験中はラテックス手袋を着用した。さ

らに、疾病伝播のリスクを最小限に抑えるため、ケージの衛生管理は熱心に行われた。

VP 発生器（スミダ電機製）を用いて、麻酔下のラットに全身的に VP を刺激した。VP パラメータは以下の通りであった：電圧、60mV；周波数、20kHz；電流、0.12mA；実験頻度、30 分/日、5 日/週、合計 3 週間。実験期間終了後、すべてのラットを炭酸ガスで安楽死させた。右脚は組織学的解析のための標本として、左脚は遺伝子発現解析および組織形態計測のための標本として用いた。VP と電界強度の関係は数式で表すことができるため、電界強度から VP 強度を計算することも、その逆も可能である。この研究では、装置内の電場は 0.22V/m と測定された（電圧 60mV を割って計算）。注目すべきことに、この電界強度は装置設計時に使用された値と一致しており、装置内で VP が生成されていることが確認された。さらに、VP の発生は温度の上昇をもたらさなかった。重要なのは、VP 刺激中の概日リズムの影響を最小限にするため、この実験を一貫して午前 10 時に行ったことである。CO<sub>2</sub> への曝露から意識消失までの時間を早めるため、CO<sub>2</sub> 濃度は容器の容積の 30～70%/分の置換率で徐々に増加させた。呼吸停止後、被験者は最低 1 分間 CO<sub>2</sub> ガスにさらされた。

#### Inclusion and exclusion criteria and randomization

本研究で使用したすべてのラットを解析に含めた。すべてのラットの右肢を組織学的解析に用い（n = 12）、左肢を骨形態測定と遺伝子発現解析に用いた（n = 6）。実験群への動物の割り当ては、1 から 24 までの番号のシャッフルされたセットからカードを引くことを含むランダム化プロセスによって行われた。各群に 12 枚の割り当てカードがあり、ラットは引かれた番号に基づいてそれぞれの群に割り当てられた。実験手順と結果の初期評価は H.S.が行った。その後、これらの結果を 5 人の盲検オペレーター（K.F.、W.M.、N.Y.、H.M.、M.O.）と共有し、適切な分析を行った。

#### Morphological analyses

形態学的分析（n = 6）は、表層、中間層、深層、石灰化層、全層の厚さ、および軟骨細胞数の 6 つのパラメータについて行われた。すべての厚さパラメータの測定は、組織学的観察に基づいて行われた。例えば、関節軟骨の表層には扁平な軟骨細胞が存在し、中層にはプロテオグリカンが高濃度に存在するためメタクロマシーが認められた。対照的に、深層はプロテオグリカン含量が低いことを示す限定的なメタクロマシー反応を示し、石灰化層はトルイジンブルー染色後に明瞭な暗紫色を示した。さらに、関節軟骨の軟骨細胞数は、存在する軟

骨細胞全体を網羅していた。さらに、すべての形態学的解析は、公平性を保つために外注した両グループに対して盲検下で行われた。

#### Non-decalcified specimens

非石灰化標本は、1%トルイジンブルー溶液を用いて 45 秒間染色した。この染色は、脛骨関節軟骨内の石灰化の可視化を容易にするため、標本をリゴラック樹脂 (3801TB12T ; 日新 EM、東京、日本) に包埋した後に行った。さらに、これらの標本は組織学的および形態学的検査の基礎となった。

#### Decalcification of sections

標本はまず、8%エチレンジアミン四酢酸溶液 (349-01863 ; 同仁堂、熊本、日本) を用いて 3 週間かけて脱灰した。その後、パラフィン (415-25791 ; 富士フイルム和光純薬) に包埋し、4 $\mu$ m 厚の切片にスライスした。脱灰した標本は、REM-710 レトラトーム (ヤマト、埼玉、日本) を用いて切片化し、サフラニン O 染色を 5 分間行った後、光学顕微鏡 (BX53F ; OLYMPUS、東京、日本) で観察した。免疫組織化学も行った。すべての標本の観察部位を中央に指定し、骨端板の構造的完全性をモニターしながら正確な薄切片を作成した。

#### Immunohistochemistry

最初に、パラフィン切片をウェットボックスで 1 時間温めた後、キシレンを用いて除去した。その後、ヒアルロニダーゼ (18240-36; Nacalai Tesque, Inc. さらに、非特異的反応を最小にするため、検体を 3%ウシ血清アルブミンでブロックした。抗 ki67 ( $\times 200$ 、M7240、Abcam、Cambridge、英国)、抗 TNAP ( $\times 300$ 、ab65834、Genetex)、抗 ENPP1 ( $\times 300$ 、ウサギ、Genetex)、抗 Col2 ( $\times 300$ 、MA5-12789、Thermo Fisher、東京、日本)、抗 Col10 ( $\times 300$ 、GTX37732、Genetex)。最後に、標本をさらに二次抗体と 25°C で 30 分間インキュベートし、蛍光観察のために DAPI 含有マウント剤でマウントした (Abcam)。組織学的解析、特に Ki67 陽性細胞のカウントは、3 匹のラットから採取したサンプルについて行い、すべての陽性細胞を目視でカウントした。さらに、Ki67 は 250 ミリ秒、DAPI は 3 ミリ秒の標準的な露光時間を適用し、陽性細胞の列挙を目視で行った。光観察では、TNAP と ENPP1 をジアミノベンジジンと併用した。

#### Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR)

脛骨結節内の遺伝子発現量は、CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて算出した。TRIzol (15596026 ; サーマフィッシャーサイエンティフィック、千葉、日本) を用いて、脛骨関節軟骨から全 RNA を抽出した。

RNA の純度 (260/280 比が 1.8~2.0) を保証するために、tRNA を NanoDrop One (Termo Fisher) を用いて分析した。その後、iScript gDNA Clear synthesis kit (172530; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いて cDNA を合成した。cDNA 合成時の tRNA 濃度は 10ng/ $\mu$ l に標準化した。遺伝子発現解析は、TaqMan プローブアッセイを用いて行った。さらに、45S リボソーム RNA をハウスキーピング遺伝子として用いた。PCR 条件は以下の通り：95°C、20 秒の初期変性、95°C、15 秒の変性 40 サイクル、60°C、1 分の最終伸長。Rn45S mRNA を内部コントロールとして用いた。相対発現量は  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法 [26]を用いて算出した。

#### Statistical analysis

統計解析はすべて SPSS ver.26 (SPSS Inc.) 2 群間の差を決定するために t 検定分析を行った。P 値<0.05 を統計的に有意とみなした。。

## 結果

### Calcification in articular cartilage is inhibited by the VP

関節軟骨の組織学的検査では、各層に特徴が認められた。表層では扁平な軟骨細胞が観察され、中層ではトルイジンブルー染色によってメタクロマシアが観察され、プロテオグリカンが高濃度に存在することが明らかになった。対照的に、深層はコラーゲン線維が多いため、メタクロマシアを示さなかった。最後に、石灰化層は他の層とは異なる染色パターンを示し、その独特な組成と性質を示した。

両群の関節軟骨は、組織学的に表層、中間層、深層、石灰化層の4層に分けられた(図 2a および 2b)。VP 群で観察された石灰化層の厚さは、CO 群より薄かった(図 2c および 2d)。表層 ( $P = 0.084$ ) および石灰化層 ( $P = 0.06$ ) の厚さは両群間で有意差はなかったが、中間層 ( $P = 0.004$ )、深層 ( $P = 0.003$ ) および全層 ( $P = 0.008$ ) は、CO 群と比較して VP 群で有意に厚かった(図 3)。その結果、各層の関節軟骨形成率に注目した(図 4)ところ、表層と中間層の形成率に有意差はなかった。しかし、深層の形成率は CO 群で 18.53%であったのに対し、VP 群では 27.93%であった。さらに、石灰化率は CO 群で 22.26%、VP 群で 10.5%であった。これらの所見から、VP 群では石灰化層が薄くなったにもかかわらず、関節軟骨が全体的に厚くなったのは、中層と深層が厚くなったためであると考えられる。

### Articular cartilage thickened by VP

両群とも、中層に軟骨細胞が集中していた。具体的には、内側(図 5a および 5b) および外側(図 5c および 5d) の両方の中間層において、VP 群は CO 群に比べて軟骨細胞の数が多かった。VP 群の関節軟骨の軟骨細胞は、CO 群の軟骨細胞よりも密に分布し、数も多かった。特に、VP 群の軟骨細胞は縦方向に配列していた。さらに、VP 群の軟骨細胞数は CO 群のそれを上回っていた ( $P = 0.007$ ) (図 5e)。その結果、これらの所見から、VP による関節軟骨の厚さの増加は、軟骨細胞集団の増加と関連していることが示唆された。

### Higher chondrocyte activity and calcification suppression induced by VP

石灰化促進因子として知られる TNAP の免疫局在は、CO 群ではマトリックスと軟骨細胞の表層と深層で顕著に観察された(図 6a)。一方、VP 群の TNAP 免疫反応性は中層に弱く観察された(図 6b)。さらに、CO 群では表層や軟骨細胞内ではほとんど反応を示さなかったが(図 6c)、VP 群では軟骨細胞内の表層から深層まで ENPP1 免疫反応性が観察された(図 6d)。さらに、Enpp1 の発現は

CO 群と比較して VP 群で有意に高かったが ( $P = 0.001$ )、組織非特異的アルカリホスファターゼをコードする *Alpl* の発現は有意差を示さなかった ( $P = 0.781$ ) (図 6e および 6f)。したがって、これらの所見は、VP が TNAP 合成をダウンレギュレートし、*Enpp1* をアップレギュレートすることによって石灰化を抑制することを示している。

DAPI 陽性細胞は両群で観察された (図 7a および 7e)。CO 群では深層の Col2 陽性細胞はほとんど認められなかったが、VP 群では CO 群に比べ陽性細胞数の増加が認められた (図 7b および 7f)。一方、CO 群の深層では、軟骨ラクナと軟骨細胞に Col10 の免疫局在が検出された (図 7c)。同様に、VP 群でも軟骨ラクナに Col10 免疫反応性が認められたが、CO 群に比べれば低かった (図 7g)。CO 群のオーバーレイ像では Col10 が強く認められたが、VP 群のオーバーレイ像では Col10 だけでなく Col2 陽性反応も認められた (図 7d および 7h)。

#### Chondrocyte proliferation promoted by VP

4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) 陽性細胞数は、CO 群と比較して VP 群の関節軟骨で多かった (図 8a および 8b)。Ki67 陽性細胞は VP 群では全層に分布していたが、CO 群ではその反応は顕著に弱かった (図 8c および 8d)。これらの所見と同様に、VP 群の DAPI 陽性細胞数 ( $P = 0.012$ ) および ki67 陽性細胞数 ( $P = 0.01$ ) は、CO 群のそれより有意に多かった (図 8e および 8f)。特に、ki67 陽性細胞の割合は VP 群で高く (図 8g)、ki67 をコードする *Mki67* の発現は VP 群で有意に増加した ( $P = 0.006$ ) (図 8h)。これらの結果から、VP は軟骨細胞の増殖を促進するだけでなく、軟骨細胞の増殖機能も維持することが示唆された。

## 考察

構造レベルでは、関節軟骨は通常、表層、中間層、深層、石灰化層の4層に分けられる [27]。深層と石灰化層の境界は「タイドマーク」として知られ、その隆起はOAに特徴的な特徴である [28]。関節軟骨は一度変性すると、寿命が尽きるまで自然に再生することはない。したがって、関節軟骨の厚さとタイドマークを維持することが、OAを予防する最も簡単な方法であると考えられる。われわれの研究では、石灰化層が薄いにもかかわらず、関節軟骨の全体的な厚さは、CO群よりもVP群の方が高いことが明らかになった。このことは、VPがOA予防に有効である可能性を示唆している。さらに、関節軟骨の中間層は軟骨マトリックスを分泌し、非常に活性の高い軟骨細胞を含んでいる [27]。したがって、中間層の軟骨細胞は、関節軟骨の厚さを決定する上で重要な役割を果たし、その構造維持に貢献している。この研究では、様々なタイプの軟骨細胞でVP活性が検出された。特に、VP群の関節軟骨は肥厚を示し、中間層の割合が顕著に高かった。これらの所見は、VPの中間層が軟骨細胞数を増加させることにより関節軟骨を肥厚させることを示している。対照的に、Col2は主に表層に局在し [29]、Col10は石灰化軟骨マトリックスのマーカーとして機能している [30]。通常、未熟な軟骨細胞は非石灰化軟骨マトリックスを合成する [31]。分化が進むにつれて、軟骨細胞は肥大し、その周囲のマトリックスは石灰化する [32]。さらに、未熟な軟骨細胞は主にCol2が存在する場所に存在し、肥大化した軟骨細胞は主にCol10が発現している場所に存在する。興味深いことに、Col10は両群の深層で検出されたが、VP群の深層ではCol10だけでなく、かなりの数のCol2反応も認められた。このことは、VP群の関節軟骨の軟骨細胞は分化の過程で抑制を受けている可能性を示唆している。さらに、中層に類似した軟骨細胞が関節軟骨の深層にも観察された。しかし、この研究では軟骨細胞分化因子が具体的に同定されていないため、より明確な結論を出すにはさらなる調査が必要である。

生体内では、組織はENPP1とTNAPの相互作用によって制御されている。ENPP1は石灰化を抑制するように機能し [33]、一方TNAPは石灰化を促進する [34]。この相互作用は、硬組織石灰化や異所性石灰化を含む様々なタイプの組織石灰化に関与する物質であるハイドロキシアパタイトの形成にかかっている [35, 36]。しかしながら、ハイドロキシアパタイトの形成はピロリン酸によって阻害される。ピロリン酸は主にENPP1 [37] によって合成され、TNAPによって無機リン酸に分解される [38]。ピロリン酸とは対照的に、無機リン酸はハイドロキシアパタイトの沈着を促進する [37]。その結果、ENPP1のダウンレギュレーションおよび/またはTNAPのアップレギュレーションは、*in vivo*での石灰化を促進する。特にOAでは、関節軟骨が石灰化するだけでなく、

ENPP1 のダウンレギュレーションと TNAP のアップレギュレーションが起こる [38, 39]。したがって、関節軟骨の石灰化を遅らせれば、OA を予防できる可能性がある。しかし、関節軟骨の石灰化層は軟骨下骨と連結するために不可欠であるため、石灰化を過度に遅らせることは、関節軟骨の病理学的変化を引き起こす可能性がある [40]。この研究では、石灰化の厚さに有意差は認められなかったが、免疫染色と遺伝子発現から、VP 投与群では石灰化の進行が遅いことが示された。これらの所見から、VP は関節軟骨の石灰化を抑制する可能性はあるが、石灰化の進行は過剰ではなく徐々に起こるため、病的状態を誘発する可能性は低いことが示唆された。さらに、組織形態学的結果は同様であったが、VP 群の石灰化層は CO 群よりも薄かった。さらに、CO 群では強い TNAP 反応性と弱い ENPP1 反応性が観察されたが、VP 群では対照的な結果が示された。このことは、VP 刺激が関節軟骨の石灰化を遅らせる可能性を示唆している。本研究における遺伝子発現所見も同様に重要である。VP 群における *Enpp1* の発現は CO 群に比べ有意に上昇したが、*Alpl* の発現は顕著な変化を示さなかった。したがって、VP 刺激は、*Alpl* の遺伝子発現に影響を与えることなく、ENPP1 を活性化し、TNAP の合成を促進すると考えるのが妥当である。さらに、VP 投与群の関節軟骨は OA 発症の遅延を示し、この病態の発症率が減少していることが示唆された。その結果、VP は ENPP1 を活性化することによって石灰化を遅らせることがわかった。石灰化の側面をさらに調べるために、我々は TNAP の免疫局在の研究に焦点を当てた。CO 群における TNAP の免疫局在は、主に表層と深層のマトリックスに観察された。一方、VP 群の TNAP 免疫局在は中層で弱く観察された。このことから、関節軟骨の石灰化を促進する重要な因子である TNAP の免疫局在は、石灰化領域に関連することが推測される。従って、関節軟骨において、TNAP は石灰化層の上の深層における石灰化の指標として機能する可能性がある。さらに、VP の刺激は ENPP1 を活性化するだけでなく、関節軟骨の石灰化における TNAP の免疫局在にも影響を及ぼすと考えられている。

細胞増殖は通常 4 つのサイクルで起こる： G1、S、G2、M。G1 期には DNA 合成と複製が維持され、その後、S 期の細胞は G2 期に進み、細胞分裂を維持する。その後、M 期に細胞分裂と増殖が行われ、細胞周期は再び M 期から G1 期へと移行する。Ki67 は G1 期から M 期に特異的に合成され、細胞の観察に広く用いられている [41]。したがって、MKi67 の発現は増殖過程を表している。本研究では、VP 群の Ki67 陽性細胞数は CO 群よりも有意に多く、DAPI 陽性細胞も同様の傾向を示した。さらに、CO 群における Ki67 陽性反応率はわずか 10%であったが、VP 群では 52%に達した。さらに、MKi67 発現は CO 群よりも VP 群で有意に高かった。これらの所見は、VP 照射が関節軟骨細胞の増殖を

促進することを示している。さらに、MKi67の結果から、関節軟骨の潜在的な増殖能も上昇しており、軟骨細胞はVP照射後もしばらく増殖を続けていることが示唆された。

この研究にはいくつかの限界がある。第一に、VP刺激が関節軟骨の構造に及ぼす影響を評価することに主眼を置いており、骨、筋肉、腱、靱帯などの他の骨格組織に及ぼす影響については掘り下げていない。今後の研究では、これらの組織に対するVPの影響を検討すべきである。第二に、VP刺激に対する軟骨細胞の感受性は、今回の研究では包括的に検討されていない。VP刺激に対する軟骨細胞の反応に関与する正確なメカニズムと特定の経路を理解することは、貴重な知見をもたらすであろう。

結論として、我々の研究は、VP刺激が関節軟骨細胞の増殖を促進し、関節軟骨の石灰化を遅らせることを証明した。さらに、VP刺激は関節軟骨の機能を活性化する。したがって、これらの知見に基づき、VP刺激はOAを予防する革新的な戦略の開発に役立つ可能性がある。本研究で採用した方法論により、関節軟骨の構造に及ぼす影響を理解することはできたが、最適な治療条件はまだ不明である。したがって、今後、異なるVP照射条件が関節軟骨に及ぼす影響を解析し、最も効果的な条件を決定する予定である。

## Ethics approval

本研究は、東洋大学大学院ヒューマンライフデザイン研究科動物実験・研究倫理委員会の承認を得た。(承認番号：第2019-04号)

## References

## REFERENCES

- [1] Loeser, R. F. Aging and osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 23, 492-496 (2011).
- [2] King, L. K., March, L., & Anandacoomarasamy, A. Obesity & osteoarthritis. *Indian J. Med. Res.* 138, 185-193 (2013).

- [3] Lotz, M. K. & Kraus, V. B. New developments in osteoarthritis. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Res. Ther.* 12, 211 (2010).
- [4] Karvonen, R. L., et al. Factors affecting articular cartilage thickness in osteoarthritis and aging. *J. Rheumatol.* 21, 1310-1318 (1994).
- [5] Cicuttini, F., Hankin, J., Jones, G. & Wluka, A. Comparison of conventional standing knee radiographs and magnetic resonance imaging in assessing progression of tibiofemoral joint osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 722-727 (2005).
- [6] Mehta, S., He, T. & Bajpayee, A. G. Recent advances in targeted drug delivery for treatment of osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 33, 94-109 (2021).
- [7] Dantas, L. O., Salvini, T. F. & McAlindon, T. E. Knee osteoarthritis: key treatments and implications for physical therapy. *Braz. J. Phys. Ther.* 25, 135-146 (2021).
- [8] Lotz, M., Hashimoto, S. & Kühn, K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 389-391 (1999).
- [9] Chiang, H. & Jiang, C. C. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J. Formos. Med. Assoc.* 108, 87-101 (2009).

- [10] Mitsuyama, H., Healey, R. M., Terkeltaub, R. A., Coutts, R. D. & Amiel, D. Calcification of human articular knee cartilage is primarily an effect of aging rather than osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 559-565 (2007).
- [11] Jin, Y., et al. Enpp1 inhibits ectopic joint calcification and maintains articular chondrocytes by repressing hedgehog signaling. *Development* 145, dev164830 (2018).
- [12] Hessle, L., et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 9445-9449 (2002).
- [13] Messent, E. A., Ward, R. J., Tonkin, C. J. & Buckland-Wright, C. Tibial cancellous bone changes in patients with knee osteoarthritis. A short-term longitudinal study using Fractal Signature Analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 463-470 (2005).
- [14] Hayes, K. N., Giannakeas, V. & Wong, A. K. O. Bisphosphonate use is protective of radiographic knee osteoarthritis progression among those with low disease severity and being non-overweight: Data from the osteoarthritis initiative. *J. Bone. Miner. Res.* 35, 2318-2326 (2020).

- [15] Magni, A., et al. Management of osteoarthritis: Expert opinion on NSAIDs. *Pain Ther.* 10, 783-808 (2021).
- [16] Ozgüçlü, E., Cetin, A., Cetin, M. & Calp, E. Additional effect of pulsed electromagnetic field therapy on knee osteoarthritis treatment: A randomized, placebo-controlled study. *Clin. Rheumatol.* 29, 927-931 (2010).
- [17] Reichenbach, S., et al. Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on knee pain and physical function in patients with symptomatic knee osteoarthritis: The ETRELKA randomized clinical trial. *Osteoarthritis Cartilage* 30, 426-435 (2022).
- [18] Ning, T., Zhang, K., Heng, B. C. & Ge, Z. Diverse effects of pulsed electrical stimulation on cells - with a focus on chondrocytes and cartilage regeneration. *Eur. Cell. Mater.* 38, 79-93 (2019).
- [19] Robert, S., Camilo B. R., & Gabriel, T. Electric vector potential formulation in electrostatics: analytical treatment of the gaped surface electrode. *Eur. Phys. J. Plus.* 135, 1-28 (2020).
- [20] Takeuchi, R., et al. Low-intensity pulsed ultrasound activates the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and stimulates the growth of

- chondrocytes in three-dimensional cultures: A basic science study. *Arthritis Res. Ther.* 10, R77 (2008).
- [21] Liu, L., Michowski, W., Kolodziejczyk, A. & Sicinski, P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat. Cell Biol.* 21, 1060-1067 (2019).
- [22] Eyre, D. R. The collagens of articular cartilage. *Semin Arthritis Rheum.* 21, 2-11 (1991).
- [23] Dudhia, J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 2241-2256 (2005).
- [24] Alberton, P., et al. Aggrecan hypomorphism compromises articular cartilage biomechanical properties and is associated with increased incidence of spontaneous osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1008 (2019).
- [25] Bay-Jensen, A. C., Mobasheri, A., Thudium, C. S., Kraus, V. B. & Karsdal, M. A. Blood and urine biomarkers in osteoarthritis - an update on cartilage associated type II collagen and aggrecan markers. *Curr. Opin. Rheumatol.* 34, 54-60 (2022).
- [26] Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402-408 (2001).

- [27] Lyndin, M., et al. Morphofunctional features of articular cartilage structure. *Folia Medica Cracoviensia* 59, 81-93 (2019).
- [28] Cheng, J. H., et al. Pathological, morphometric and correlation analysis of the modified Mankin Score, tidemark roughness and calcified cartilage thickness in rat knee osteoarthritis after extracorporeal shockwave therapy. *Int. J. Med. Sci.* 19, 242-256 (2022).
- [29] Sophia Fox, A. J., Bedi, A. & Rodeo, S. A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1, 461-468 (2009).
- [30] Rucklidge, G. J., Milne, G. & Robins, S. P. Collagen type X: A component of the surface of normal human, pig, and rat articular cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 297-302 (1996).
- [31] Hirai S., Zang X., Yang C., & Masafumi O. ki67 responds to proliferating chondrocyte. *Bull. Graduate School Toyo Univ.* 59, 197-204 (2023).
- [32] Marriott, A., Ayad, S. & Grant, M. E. The synthesis of type X collagen by bovine and human growth-plate chondrocytes. *J. Cell. Sci.* 99 ( Pt 3), 641-649 (1991).
- [33] Cecil, D. L. & Terkeltaub, R. A. Arterial calcification is driven by RAGE in *Enpp1*<sup>-/-</sup> mice. *J. Vasc. Res.* 48, 227-235 (2011).

- [34] Wang, M., et al. Conditional activation of  $\beta$ -catenin signaling in mice leads to severe defects in intervertebral disc tissue. *Arthritis Rheum.* 64, 2611-2623 (2012).
- [35] Speer, M. Y. & Giachelli, C. M. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc. Pathol.* 13, 63-70 (2004).
- [36] Abedin, M., Tintut, Y. & Demer, L. L. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1161-1170 (2004).
- [37] Roberts, F., Zhu, D., Farquharson, C. & Macrae, V. E. ENPP1 in the regulation of mineralization and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 44, 616-628 (2019).
- [38] Vimalraj, S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene* 754, 144855 (2020).
- [39] Bertrand, J., et al. Decreased levels of nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 are associated with cartilage calcification in osteoarthritis and trigger osteoarthritic changes in mice. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1249-1253 (2012).
- [40] Frisbie, D. D., Cross, M. W. & McIlwraith, C. W. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 19, 142-146 (2006).

- [41] Hu, D. P., et al. Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes. *Development* 144, 221-234 (2017).

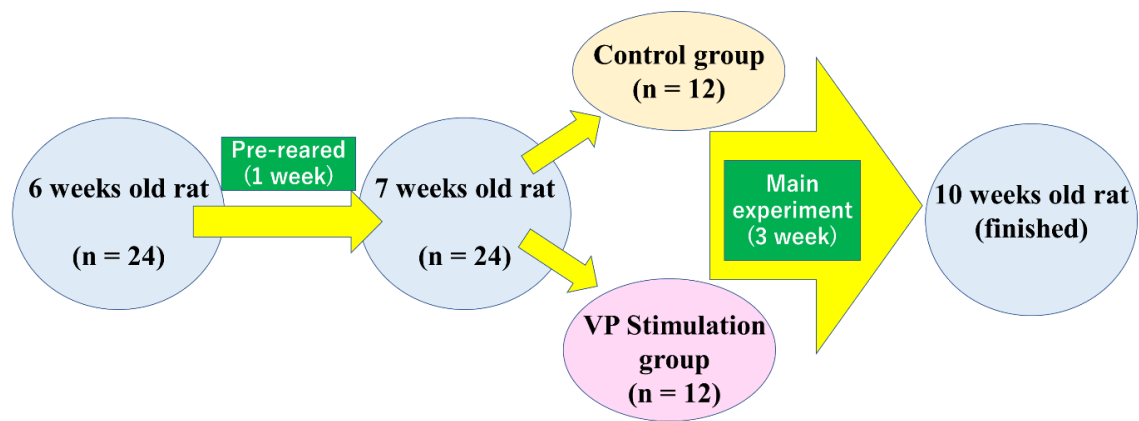


図 1.実験手順

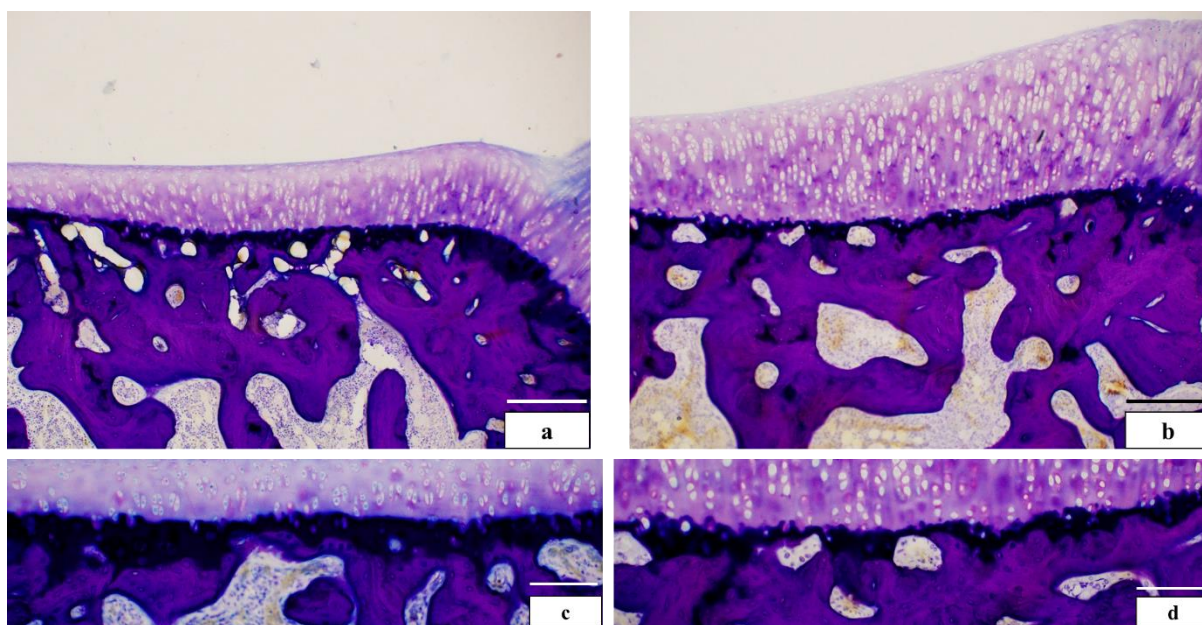


図 2.関節軟骨の構造の比較

(bar=200 $\mu$ m 上段, 100 $\mu$ m 下段、非脱灰リゴラック樹脂研磨標本、トルイジンブルー染色)

a, c; Control group (CO)、b, d; Vector Potential (VP)

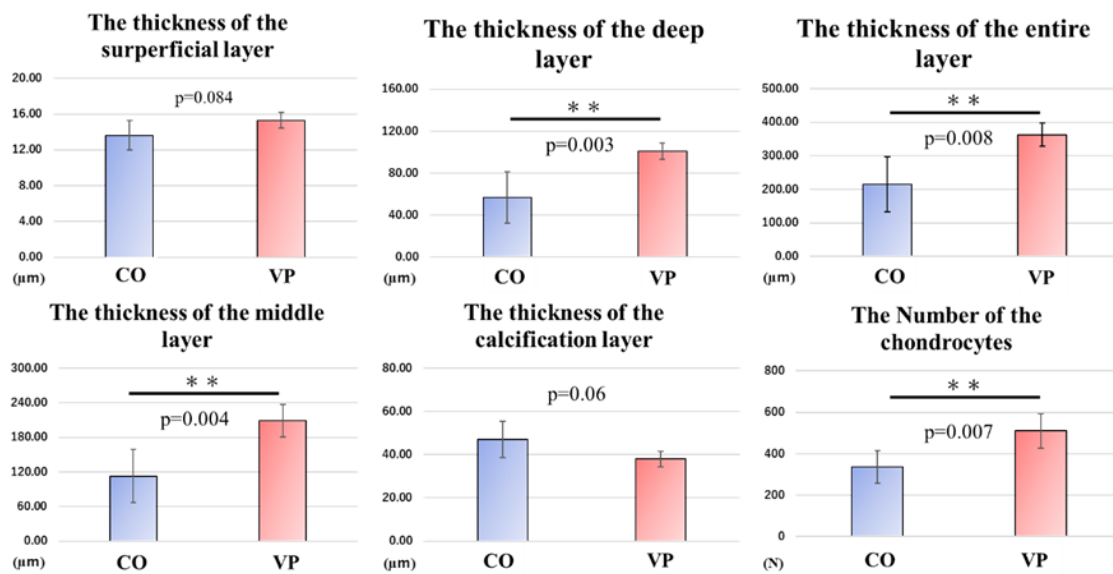


図 3. 関節軟骨の形態計測結果  
(非脱灰リゴラック樹脂研磨標本)

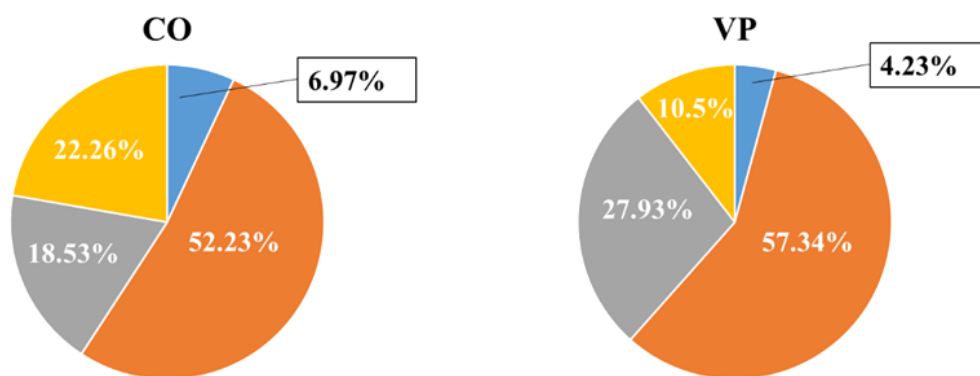


図 4.関節軟骨各層の割合

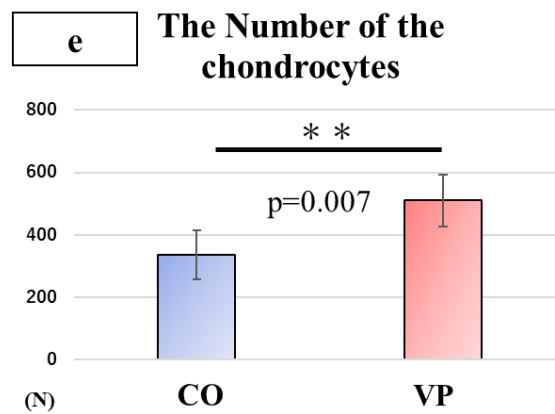
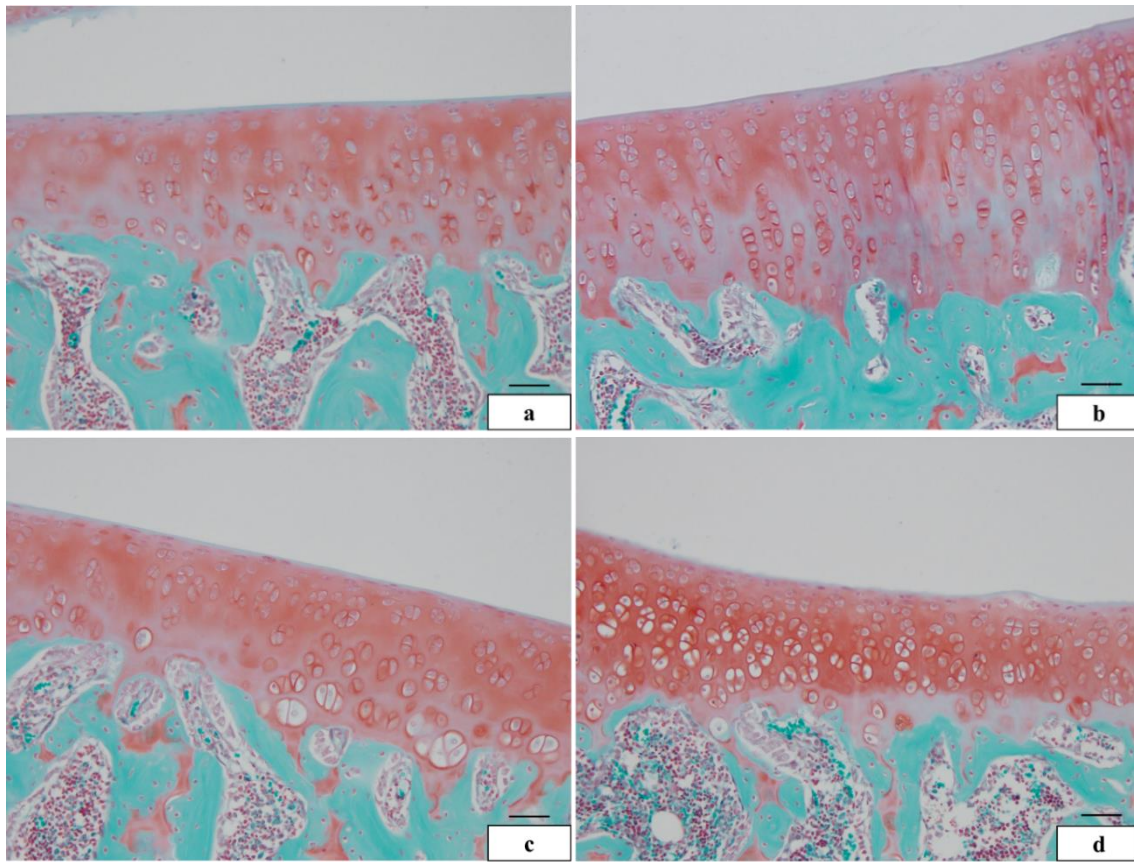


図 5. 関節軟骨の構造の比較

(bar=50 $\mu$ m、脱灰パラフィン切片、サフラニン O 染)

a, b; 内側、c, d; 外側、e; 軟骨細胞の数

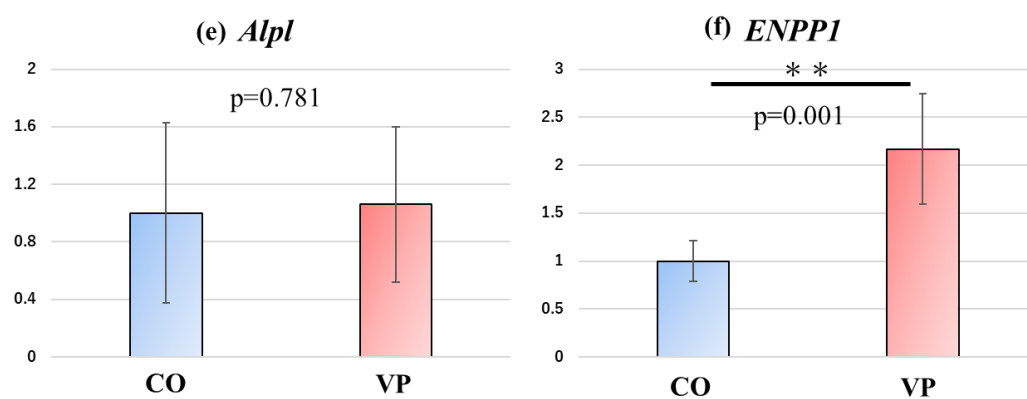
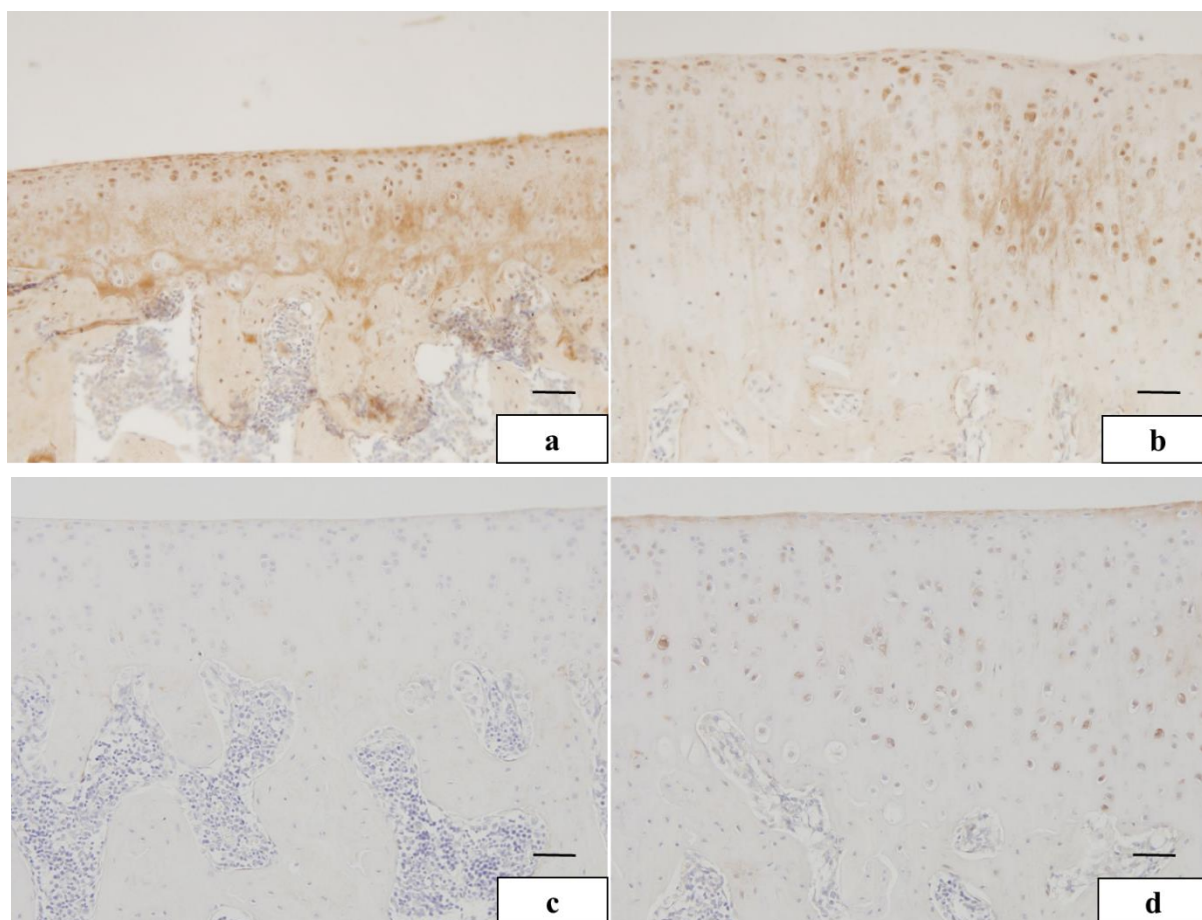


図 6.石灰化因子の発現動態

(bar=50 $\mu$ m、脱灰パラフィン切片、免疫染色)

a, b; TNAP、c, d; ENPP1、e, f; 遺伝子発現の相対定量

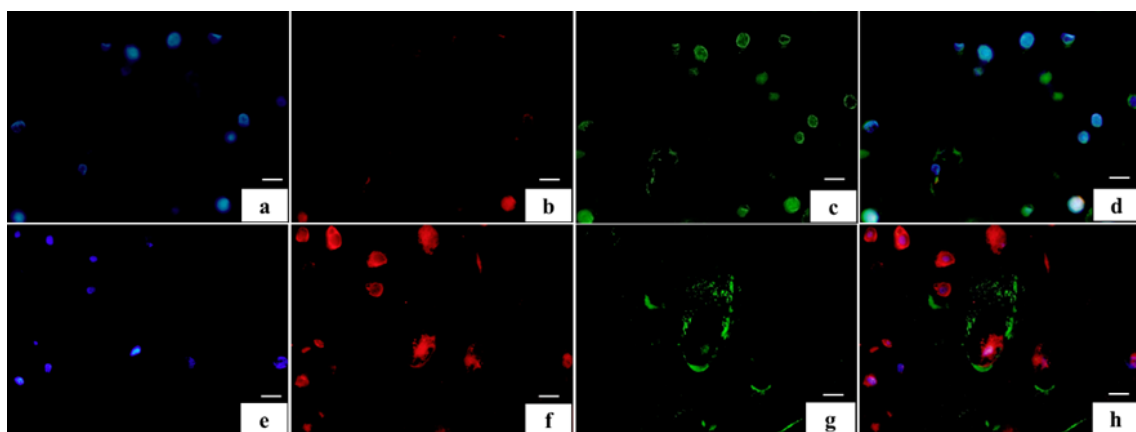


図 7.コラーゲン合成状態の比較

(bar=10 $\mu$ m、脱灰パラフィン切片、蛍光免疫染色)

a-d; CO、e-h; VP

青; 核、赤; Col2、緑; Col10

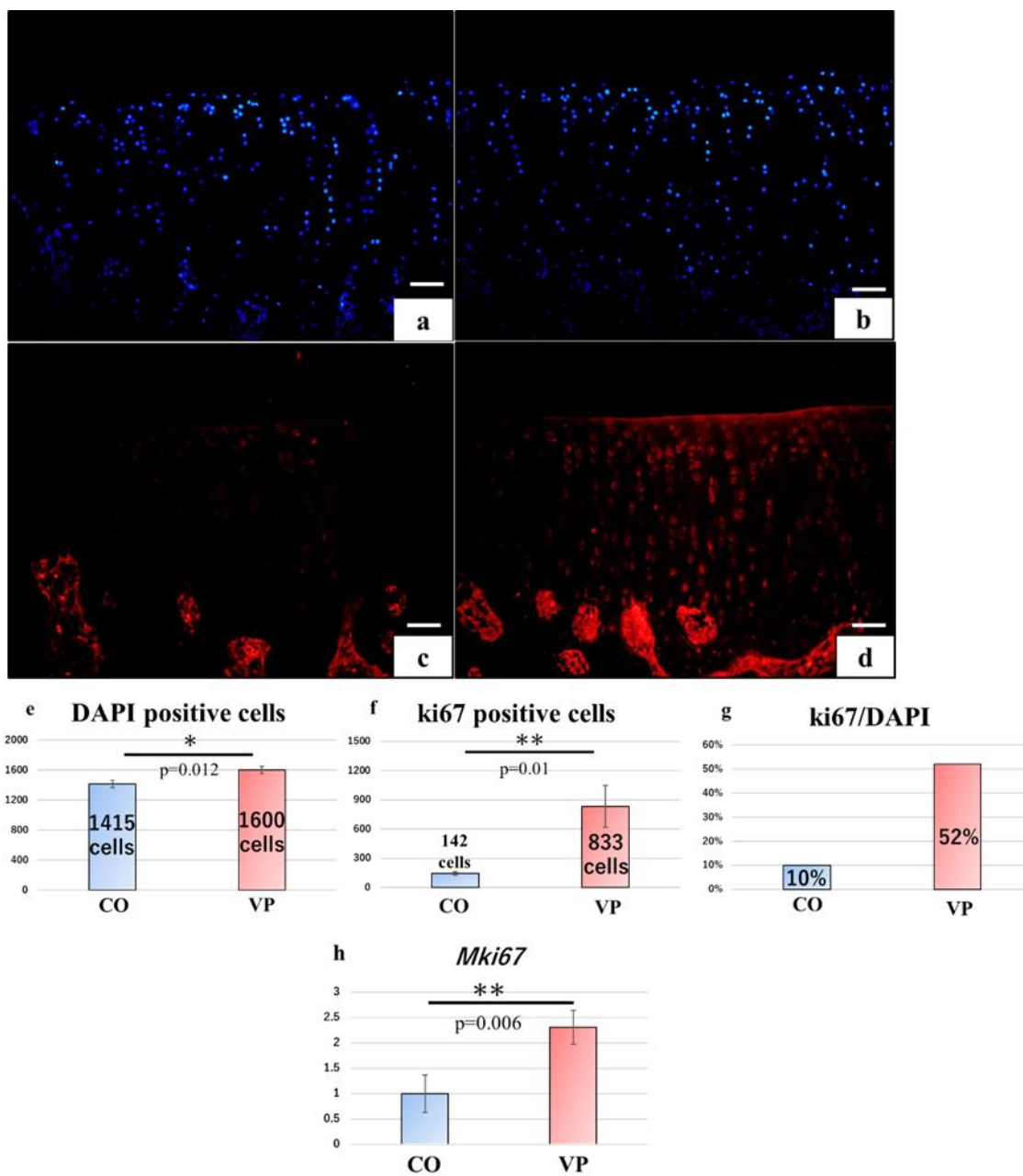


図 8.関節軟骨内の細胞増殖因子の発現状態  
 (bar=100 $\mu$ m、脱灰パラフィン切片、免疫染色)  
 a, c; CO、b, d; VP、h=ki67 の遺伝子発現解析  
 青; 核、赤; ki67

## 第8章

### 結論

脛骨粗面の構造は発育に伴い石灰化および骨化するが、その変化には深層に存在する酸性軟骨基質が消失し、そこに中性多糖類が合成されていくことが示唆された。また、発育初期から発育期における脛骨粗面の石灰化には *Enpp1* の下方制御が、発育期から発育後期における脛骨粗面の骨化には *FGF23* の上方制御が関連することが理解された。

次いで、オスグッド病の組織構造は下り走運動によって再現することが可能であり、オスグッド病の構造変化には脛骨粗面深層の石灰化が抑制されることが考えられる。その機序の一端として、炎症性サイトカインのひとつである IL-6 の発現上昇に誘導されたアラキドン酸カスケードの活性化が関与することが理解された。

現在まで行われてきた治療法のひとつである「運動制限」、いわゆる脛骨粗面への機械的刺激の減少は、脛骨粗面に未成熟な骨組織を形成することが組織学的に理解された。また本研究では、軟骨の保護として働く *Trpv4* の遺伝子発現は不変であるが、軟骨内骨化に必須なメカノセンサーである *Piezo1* の遺伝子発現が上方制御されていた。これらの事実から、軟骨保護機能に影響は及ばないが、軟骨内骨化を正常より促すことが示唆された。加えて、荷重低減は軟骨基質分解を促進するだけでなく、脛骨粗面の骨形成因子である *FGF23* の上方

制御がなされた結果、未成熟な骨組織を形成したと思われる。従って、現在までゴールドスタンダードとして「運動制限」が認められていたが、本研究成果から、それは不適切な治療法であると考えられる。

その治療法の代替案として、上り走運動が脛骨粗面の構造に及ぼす結果について調査した結果、それは脛骨粗面の石灰化を通常より促進することが理解された。その機序の一端には、TNAPの活性化によるタイプXコラーゲンの合成促進が関与することが理解された。

また、ベクトルポテンシャル発生装置は関節軟骨の石灰化を抑制するだけでなく、軟骨細胞の石灰化を抑制することを可能とするため、軟骨組織の再生に貢献できる可能性が示唆された。

なお、本研究は動物実験のみを行っているため、完全にヒト生体への影響を反映できてはいない。今後はヒト生体の脛骨粗面の構造観察を行い、ラットとヒトの組織学的な特徴の違いを検討する予定である。

## 謝辞

本稿の執筆を終えるにあたり、本研究を支援していただいた研究室のメンバーおよび昭和大学歯学部口腔解剖学講座野中直子教授、藤川芳織助教に感謝いたします。最後に、本課程在籍において指導していただいた大迫正文教授および寺島達夫先生、齊藤恭平教授、今有礼教授、に深謝いたします。