

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—

学籍番号：4A40210001

氏名：水藤飛来

【要旨】

背景：オスグッド病は脛骨前方にある脛骨粗面に発症するスポーツ障害であり、その症状として「脛骨粗面の突出・炎症・疼痛」が報告されている。しかし、オスグッド病の組織学的な所見や病態発症に関わる因子について特定した研究は未だ得られていない。また、オスグッド病は数十年にわたる治療経過をたどることがしばしば見受けられるため、発症を未然に予防することが重要である。オスグッド病は 1903 年に初の症例報告がされたが、現在まで確立された予防法は考案されていない。そこで本研究はオスグッド病の病態解明と予防法を確立するため、脛骨粗面の構造変化を組織学的に観察し、その変化に関わる因子を特定することを目的とした。

実験 1：ラット脛骨粗面の石灰化と骨化には ENPP1 の下方制御と FGF23 の上方制御が関与する

脛骨粗面には、大腿四頭筋の収縮力が膝蓋靭帯を介して伝達される。しかし、発育に伴う機械的刺激の増加が脛骨粗面の構造に及ぼす影響について明らかにされていない。本研究は脛骨粗面が発育に伴いどのように構造を変化させるかについて組織学的に明らかにすることを目的とした。材料として、3 週齢 (3W)、7 週齢 (7W)、13 週齢 (13W) の wistar 系雄性ラット各 8 頭を用いた。その結果、3W と 7W の脛骨粗面には、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が観察されたが、13W の脛骨粗面には深層が観察されず、その部位には骨組織が形成されていた。また、Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) の遺伝子発現は 3W から 7W にかけて下方的に制御され、Fibroblast growth factor 23 (FGF23) は 7W から 13W にかけて上方的に制御されていた。ENPP1 は生体組織の石灰化を抑制する因子であり、FGF23 は脛骨粗面のような筋腱埋入部の石灰化および骨化を促進する。以上のことから、脛骨粗面は発育に伴い石灰化および骨化するが、そこには ENPP1 と FGF23 の遺伝子発現が関連することが示唆された。

実験 2：脛骨粗面の形成に及ぼす基質状態の変化 — 深層軟骨組織における Chondromodulin-1 の局在に着目して —

実験 1 で示されたように、脛骨粗面は発育に伴い石灰化および骨化する。その一方で、脛骨粗面のように深層軟骨組織が骨組織へ置換される過程を軟骨内骨化と呼ばれているが、その制御に Chondromodulin-1 (Chm-1) が関与している。以上のことから、脛骨粗面の成長過程に Chm-1 の発現動態が関与すると思われるが未だ明らかにされていない。材料として、wistar 系雄性ラット 3 週齢 (3W)、7 週齢 (7W)、10 週齢 (10W) の wistar 系雄性ラット各 4 頭を用い、脛骨粗面の構造変化を組織学的に観察した。その結果、3W の脛骨粗面深層はアルシアンブルー PAS 染色によって全体が青色に染色されていたが、発育に伴い青色からピンク色へ変化していた。また、Chm-1 の免疫反応は 3W では広く観察されたが、発育に伴いその反応が消失していた。アルシアンブルーは酸性の基質を青色に、PAS 染色は中性の基質をピンク色に反応させる。また、本研究におけるその変化は Chm-1 の免疫局在と類似していた。以上のことから、深層の軟骨基質は発育に伴い酸性から中性へと変動し、それに伴い Chm-1 が消失していくことで、石灰化および骨化することが示唆された。

実験 3：下り走行運動はラット脛骨粗面にオスグッド病を発症させる

オスグッド病は過剰な膝関節の運動によって発症する。現在まで、オスグッド病の詳細な組織構造や、発症に関わる因子は明らかにされていなかった。そこで本研究は下り走運動による過剰な運動刺激が、ラット脛骨粗面にオスグッド病の構造を再現することを証明し、その発症機序を解明することを目的とした。材料として 6 週齢の wistar 系雄性ラット 24 頭を用い、それらを下り走運動群 (DR、n=12) と対照群 (CO、n=12) に分類した。DR には、予備走行 1 週間、本走行を 3 週間実施させた。その結果、DR の脛骨粗面深層は CO よりも広く示されていただけでなく、脛骨粗面全体の面積もまた高い値が示されていた。さらに、疼痛物質であるサブスタンス P の局在は DR における深層の軟骨細胞に多く反応していたが、CO ではほとんど反応していなかった。加えて、炎症性サイトカインの 1 つである Interleukin-6 (IL-6) の遺伝子発現は DR において有意に高く示されていた。さらに、Prostaglandin E2 (PGE2) の合成に関わる Ptges や Ptgs2 の遺伝子発現もまた、DR において有意に高く示されていた。PGE2 は軟骨組織の石灰化抑制に起因する因子である。以上のことから、下り走運動は脛骨粗面の石灰化を抑制するだけでなく、脛骨粗面を大きく形成し、疼痛物質や炎症性サイトカインの発現を誘発することで、オスグッド病の構造へ変化させることが示唆された。

実験4：ラット脛骨結節の石灰化に及ぼす荷重軽減の影響

脛骨粗面には、膝蓋靭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。実験3で示したように、オスグッド病は、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、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、HSではAlplとMmp3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。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。

実験5：ラット大腿四頭筋の求心性収縮は脛骨粗面の石灰化を促進する

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系統、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。

実験6:ベクトルポテンシャル刺激は軟骨細胞の増殖を促進し、関節軟骨の石灰化プロセスを抑制する二重の効果が期待される

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と考えられる。

【結論】

脛骨粗面は発育に伴い多様な因子によって順次石灰化および骨化することが理解された。また、下り走運動は脛骨粗面の石灰化を抑制することで、ラットにオスグッド病を発症させることが示唆された。対照的に、機械的刺激を減少させると、脛骨粗面の構造を脆弱化させるだけでなく、深層の軟骨基質を破壊することで、石灰化を促進させることが理解された。また、上り走運動は、脛骨粗面に適度な刺激を与えるため、組織の成熟を促進させることが示唆された。